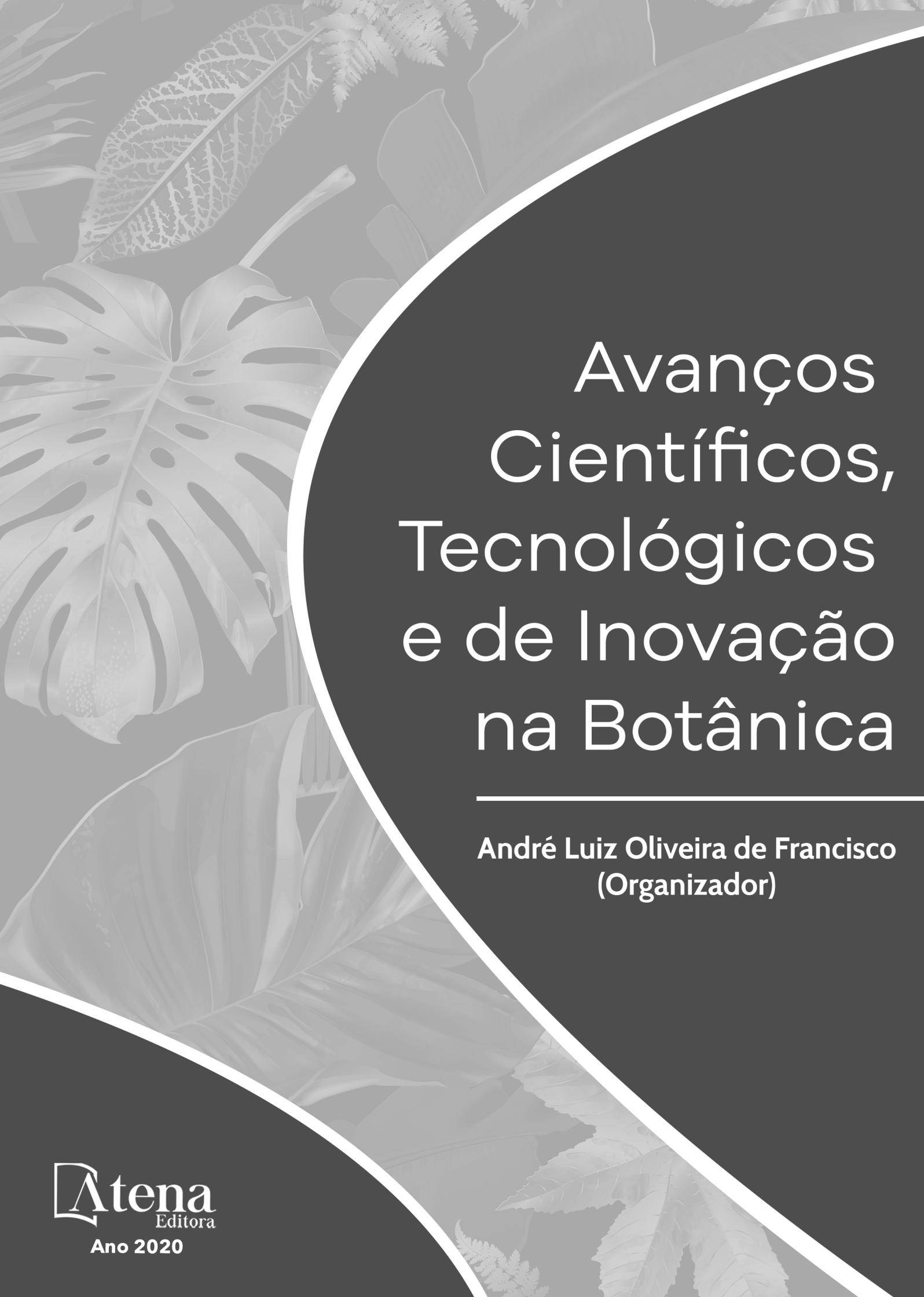




Avanços Científicos, Tecnológicos e de Inovação na Botânica

André Luiz Oliveira de Francisco
(Organizador)



Avanços Científicos, Tecnológicos e de Inovação na Botânica

André Luiz Oliveira de Francisco
(Organizador)

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Lorena Prestes

Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Prof^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof^a Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Prof^a Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Prof^a Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
 Prof^a Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A946	<p>Avanços científicos, tecnológicos e de inovação na botânica [recurso eletrônico] / Organizador André Luiz Oliveira de Francisco. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-985-1 DOI 10.22533/at.ed.851201402</p> <p>1. Biologia vegetal. 2. Botânica – Tecnologia. 3. Meio ambiente – Conservação. I. Francisco, André Luiz Oliveira de.</p> <p style="text-align: right;">CDD 582.1</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
 contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

O livro Avanços Científicos, Tecnológicos e de Inovação na Botânica traz ao leitor temas originais e abordagens diferenciadas, sendo 7 capítulos, nos quais o leitor poderá desfrutar de pontos da biologia vegetal aplicada relacionado a temáticas anatômicas, histológicas, bioquímicas, fisiológicas todas com aplicações em diversos setores da ciência.

A obra tem como objetivo apresentar estudos científicos recentes e inovadores que buscam colocar enfoque em temáticas pouco abordadas (raras), mas com grande aplicabilidade e informações ainda pouco dominadas da biologia vegetal nos ambientes acadêmicos, promovendo atualização do conhecimento e abrindo caminho para novos enfoques e ideias de pesquisa.

A abrangência dos temas promove uma teia de informações que levam a diferentes áreas do conhecimento científico se encontrando em torno do amplo mundo a botânica. Temas como tecnologia de sementes, anatomia e morfologia vegetal, fisiologia vegetal, bioquímica se inter-relacionando num mesmo capítulo a fim de demonstrar dados ainda pouco conhecidos e utilizando-se de técnicas diversas, desde simples como avaliações histológicas a complexas como a cromatografia, levando ao leitor experiências de conhecimento diferenciadas.

A aplicação dos temas estudados é constante nos capítulos presentes na bibliografia, sempre com alcance a diferentes áreas do conhecimento inclusive em um mesmo capítulo. Esta abrangência de áreas na obra amplia a utilidade desta em diferentes ambientes acadêmicos, além de promover a apresentação e integração de temáticas pouco conhecidas entre as áreas do conhecimento.

Neste sentido ressaltamos a importância desta leitura de forma a incrementar o conhecimento da aplicabilidade da botânica e sua inter-relação com áreas do conhecimento correlatas, somando-se a estes, artigos com temas pouco retratadas. Assim tornando sua leitura uma abertura de fronteiras para sua mente com qualidade e didática promovida pela estrutura da Atena Editora. Boa leitura!

André Luiz Oliveira de Francisco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE <i>SIDA rhombifolia</i> L.	
Rafaela Damasceno Sá Cledson dos Santos Magalhães Karina Perrelli Randau	
DOI 10.22533/at.ed.8512014021	
CAPÍTULO 2	11
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E PROPAGAÇÃO DE <i>CYRTOPODIUM FLAVUM</i> (ORCHIDACEAE) UTILIZANDO O SECCIONAMENTO DE PROTOCORMOS	
Suzana Stefanello Fabielle Garcia Zandonadi da Cruz Carina Kozera Samara Zanella	
DOI 10.22533/at.ed.8512014022	
CAPÍTULO 3	24
IDENTIFICAÇÃO DE ISOPRENOIDES NA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS DE <i>MACHAERIUM ACUTIFOLIUM</i> POR CG-EM	
Adonias Almeida Carvalho Jurema Santana de Freitas Lucivania Rodrigues dos Santos Bruno Quirino Araújo Mariana Helena Chaves	
DOI 10.22533/at.ed.8512014023	
CAPÍTULO 4	35
MUDANÇAS NA MORFOLOGIA DOS SILICOFITÓLITOS DE ACORDO COM A SENESCÊNCIA DAS FOLHAS DA ESPÉCIE <i>Brachiaria decumbens</i> WILD	
Heloisa Helena Gomes Coe Raphaella Rodrigues Dias Giliane Gessica Rasbold Sarah Domingues Fricks Ricardo Igo Fernando Lepsch	
DOI 10.22533/at.ed.8512014024	
CAPÍTULO 5	50
ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRONELA (<i>CYMBOPOGON NARDUS</i> L.) RENDLE - (POACEAE): COMPOSIÇÃO, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA	
Stelina Timani Pinheiro Pedro Henrique Ferreira Tomé Mônica Hitomi Okura Nilvanira Donizete Tebaldi Nágilla Daliane Feliciano Edson José Fragiorge	
DOI 10.22533/at.ed.8512014025	

CAPÍTULO 6	64
POLÍMEROS DE PAREDE CELULAR E CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIIS DE ESPÉCIES ARBÓREAS PIONEIRAS E NÃO PIONEIRAS DA FLORESTA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL	
Bernardo Pretti Becacici Macieira	
DOI 10.22533/at.ed.8512014026	
CAPÍTULO 7	78
PRODUÇÃO E VARIAÇÕES QUÍMICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS: UMA BREVE REVISÃO SOBRE OS FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE E A QUANTIDADE	
Ygor Jessé Ramos	
Jéssica Regina Sales Felisberto	
Claudete da Costa - Oliveira	
Elisama Duarte de Pontes	
Daniel de Brito Machado	
Irene Candido Fonseca	
Davyson de Lima Moreira	
DOI 10.22533/at.ed.8512014027	
SOBRE O ORGANIZADOR.....	105
ÍNDICE REMISSIVO	106

CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *SIDA rhombifolia* L.

Data de aceite: 06/02/2020

Data de submissão: 30/11/2019

Rafaela Damasceno Sá

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Laboratório de Farmacognosia

Recife – Pernambuco

<http://lattes.cnpq.br/3712738718018336>

Cledson dos Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Laboratório de Farmacognosia

Recife – Pernambuco

<http://lattes.cnpq.br/7106753958126149>

Karina Perrelli Randau

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Laboratório de Farmacognosia

Recife – Pernambuco

<http://lattes.cnpq.br/5089595850981385>

RESUMO: *Sida rhombifolia* L. é uma espécie da família Malvaceae encontrada no Brasil e popularmente conhecida como guanxuma ou vassoura. Suas folhas são utilizadas na medicina popular para disenteria, gripe, cólica, febre e também como anti-inflamatório. Este estudo teve como objetivo a caracterização

anatômica e histoquímica da lâmina foliar de *S. rhombifolia*. Para a caracterização anatômica, lâminas semipermanentes contendo secções transversais e paradérmicas da lâmina foliar foram analisadas em microscopia de luz. Para a histoquímica, secções transversais de lâminas foliares frescas foram submetidas a diferentes reagentes. A folha é anfiestomática, com estômatos anisocíticos. Possui tricomas estrelados e glandulares em ambas as faces. A nervura central é biconvexa e apresenta feixe vascular colateral, com drusas no floema. As drusas também estão presentes no parênquima da nervura central e no mesofilo. Este é dorsiventral, com células mucilaginosas. Através da histoquímica foram evidenciados compostos fenólicos, triterpenos e esteroides, alcaloides, compostos lipofílicos, lignina e cristais de oxalato de cálcio. Os caracteres observados contribuem para o controle de qualidade da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Farmacobotânica; Malvaceae; Microscopia; Padronização.

ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE LEAF BLADE OF *SIDA rhombifolia* L.

ABSTRACT: *Sida rhombifolia* L. is a species of the Malvaceae family found in Brazil and popularly known as “guanxuma” or “vassoura”. Its leaves are used in folk medicine for dysentery,

flu, colic, fever and also as anti-inflammatory. This study aimed the anatomical and histochemical characterization of the leaf blade of *S. rhombifolia*. For the anatomical characterization, semipermanent slides containing transverse and paradermic sections of the leaf blade were analyzed by light microscopy. For histochemistry, cross-sections of fresh leaf blades were submitted to different reagents. The leaf blade is amphistomatic, with anomocytic stomata. The leaf is amphiestomatic, with anisocytic stomata. It has stellate and glandular trichomes on both sides. The midrib is biconvex and has a collateral vascular bundle, with druses in the phloem. Druses are also present in the parenchyma of the midrib and mesophyll. The mesophyll is dorsiventral, with mucilaginous cells. The histochemistry showed phenolic compounds, triterpenes and steroids, alkaloids, lipophilic compounds, lignin and calcium oxalate crystals. The characters found contribute to the quality control of the species.

KEYWORDS: Pharmacobotany; Malvaceae; Microscopy; Standardization.

1 | INTRODUÇÃO

A família Malvaceae Juss. possui distribuição predominantemente pantropical, incluindo cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies (JOLY, 1985; SOUZA; LORENZI, 2005). As plantas do gênero *Sida* L. ocorrem amplamente como ervas daninhas em pastagens de regiões tropicais e subtropicais do mundo (DINDA *et al.*, 2015). No Brasil, são encontradas 103 espécies, dentre elas *Sida rhombifolia* L. (FLORA DO BRASIL, 2019).

Nativa do continente Americano, *S. rhombifolia* é uma erva que pode ser encontrada em todas as regiões do Brasil infestando áreas de cultivos anuais, perenes e pastagens (LORENZI; MATOS, 2002; SOUZA; LORENZI, 2005; LORENZI, 2008; BIANCO; CARVALHO; BIANCO, 2014).

Possui diversos nomes vulgares, como guanxuma (MESSIAS *et al.*, 2015), malva (FERRÃO *et al.*, 2014), vassourinha de relógio, vassoura, vassourinha (ALMEIDA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2014; MESSIAS *et al.*, 2015), reljóo e relógio (SILVA; ANDRADE, 2006; AGUIAR; BARROS, 2012). De acordo com Lorenzi (2008), o nome relógio é devido à pontualidade com que as flores se abrem e fecham diariamente.

Na medicina popular, as folhas da espécie são indicadas para disenteria (LORENZI; MATOS, 2002; AGUIAR; BARROS, 2012), gripe, cólica, febre (TEIXEIRA *et al.*, 2014) e também como anti-inflamatório (FERRÃO *et al.*, 2014; MESSIAS *et al.*, 2015).

Com relação às suas atividades farmacológicas, a maioria dos estudos avaliaram extratos obtidos das partes aéreas de *S. rhombifolia*. Foram descritas na literatura atividades anti-inflamatória (KUMAR; MISHRA, 1997; RAHMAN *et al.*, 2011; MAH; TEH; EE, 2017); anti-artrite (GUPTA *et al.*, 2009); antimicrobiana (ISLAM; HAQUE; MOSADDIK, 2003; ASSAM *et al.*, 2010); antituberculose (PAPITHA *et al.*, 2013); antimalária (AKELE, 2013); vasorelaxante (CHAVES *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2017), citotóxica (ISLAM; HAQUE; MOSADDIK, 2003; PIEME *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*,

2011; MAH; TEH; EE, 2017), anticolinesterase (MAH; TEH; EE, 2017) e hepatoprotetora (KUMAR; MISHRA, 1997).

A atividade antidiabética e antioxidante foi demonstrada tanto para a planta (DHALWAL; DESHPANDE, PUROHIT; 2007; GHOSH; SUBUDHI; MISHRA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; CHATURVEDI; KWAPE, 2015; FERRO *et al.*, 2019), quanto para o extrato aquoso da mistura de *S. rhombifolia*, *Spilanthes africana* e *Portulaca oleracea* (MOUKETTE *et al.*, 2017).

Diante da importância medicinal da espécie, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização anatômica e histoquímica da lâmina foliar de *S. rhombifolia*, para estabelecer os caracteres úteis na identificação correta dessa espécie.

2 | METODOLOGIA

Para a caracterização anatômica, secções transversais e paradérmicas de lâminas foliares de *S. rhombifolia* foram obtidas à mão livre, usando lâmina comum de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte. Em seguida, todas as secções foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio (50%) para processo de descoloração (KRAUS; ARDUIN, 1997). Após lavagem em água destilada, as secções transversais foram coradas segundo técnica descrita por Bukatsch (1972), com safranina e azul de Astra (2:8, v/v) e as secções paradérmicas foram coradas com azul de metileno (KRAUTER, 1985).

Posteriormente, todas as secções foram montadas em lâminas semipermanentes, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940; SASS; 1951). A análise das lâminas foi conduzida em imagens em software (Toup View Image), obtidas por câmera digital acoplada a um microscópio de luz (Alltion).

Para a caracterização histoquímica, secções transversais de lâminas foliares frescas foram obtidas pelo mesmo método utilizado na caracterização anatômica. Os seguintes reagentes específicos foram utilizados para indicar a presença dos metabólitos: dicromato de potássio (10%) para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940); vanilina clorídrica para taninos (MACE; HOWELL, 1974); tricloreto de antimônio para triterpenos e esteroides (MACE; BELL; STIPANOVIC, 1974); Dragendorff para detectar alcaloides (YODER; MAHLBERG, 1976); Sudan III para substâncias lipofílicas (SASS, 1951); floroglucinol para lignina (JOHANSEN, 1940), Lugol para amido (JOHANSEN, 1940) e ácido clorídrico (10%) para estabelecer a natureza dos cristais (JENSEN, 1962). Controles foram realizados em paralelo aos testes e lâminas histológicas semipermanentes foram preparadas contendo as seções transversais (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951), as quais foram analisadas sob microscópio de luz (Alltion).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sida rhombifolia apresenta, em vista frontal, lâmina foliar anfiestomática, com estômatos anisocíticos (Fig. 1A-B). Segundo Metcalfe e Chalk (1950), o tipo de estômato característico da família Malvaceae é o anomocítico. Alguns trabalhos com *S. rhombifolia* encontraram estômatos anomocíticos (MENDONÇA, 2004; CUNHA *et al.*, 2012), o que vai de acordo com Metcalfe e Chalk (1950). Entretanto, outros estudos com *S. rhombifolia* e também com outras nove espécies de *Sida* reportam a presença de estômatos anisocíticos, o que corrobora os achados no presente estudo (OLATUNJI; BAKARE, 1993; MOHIDEEN; SASIKALA; GOPAL, 2002; PRAMANICK; MAITI; SRIVASTAVA, 2015).

As células epidérmicas apresentam paredes sinuosas em ambas as faces, porém, essa característica é mais acentuada na face abaxial (Fig. 1A-B). Uma característica notável da família Malvaceae é a presença de tricomas estrelados, mas também podem ocorrer tricomas simples, peltados e glandulares (METCALFE; CHALK, 1950). Nas duas faces da lâmina de *S. rhombifolia* foram visualizados tricomas estrelados e glandulares (Fig. 1C-D). Entretanto, eles são mais frequentes na face abaxial, fato também evidenciado por Albert e Victoria Filho (2002) e Hoffmann (2007). Mendonça (2004) encontrou os tricomas estrelados e os glandulares apenas na face abaxial da lâmina. De acordo com Albert (2000), essa divergência pode ser explicada pela diferença no estágio de desenvolvimento foliar quando da coleta das folhas.

Olatunji e Bakare (1993), estudando dez espécies de *Sida* coletadas na Nigéria e Shaheen *et al.* (2009), estudando seis espécies do gênero, mostraram que os tipos de tricomas e a sua distribuição nas faces das lâminas foliares variam nas diferentes espécies, o que auxilia na sua diferenciação.

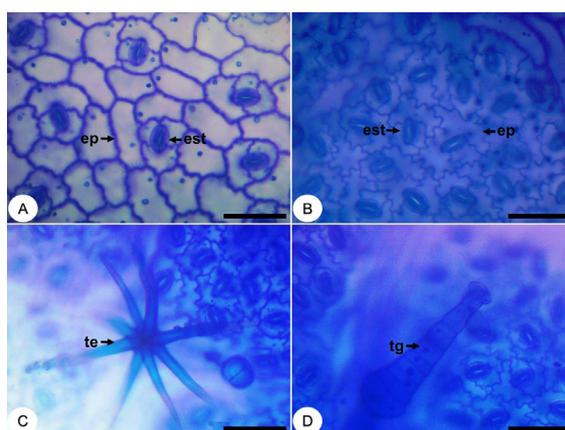


Figura 1 – Seções paradérmicas da lâmina foliar de *Sida rhombifolia* L.

A: face adaxial; B, C e D: face abaxial. Abreviaturas: ep – epiderme; est – estômato; te – tricoma estrelado; tg – tricoma glandular. Barras: A-D = 50 μ m.

A nervura central, em corte transversal, possui uma leve projeção côncava na face superior e é convexa na face inferior (Fig. 2A). Apresenta epiderme unisseriada.

O parênquima paliçádico invade a região superior da nervura, sendo interrompido por uma região de dois a três estratos de colênquima (Fig. 2A).

Na região central da nervura está inserido um feixe vascular colateral (Fig. 2A-B). Este tipo de feixe é comum em espécies de *Sida* (MOHIDEEN; SASIKALA; GOPAL, 2002; PROCÓPIO *et al.*, 2003; PRAMANICK; MAITI; SRIVASTAVA, 2015). Fibras de esclerênquima situam-se próximas ao feixe vascular (Fig. 2B).

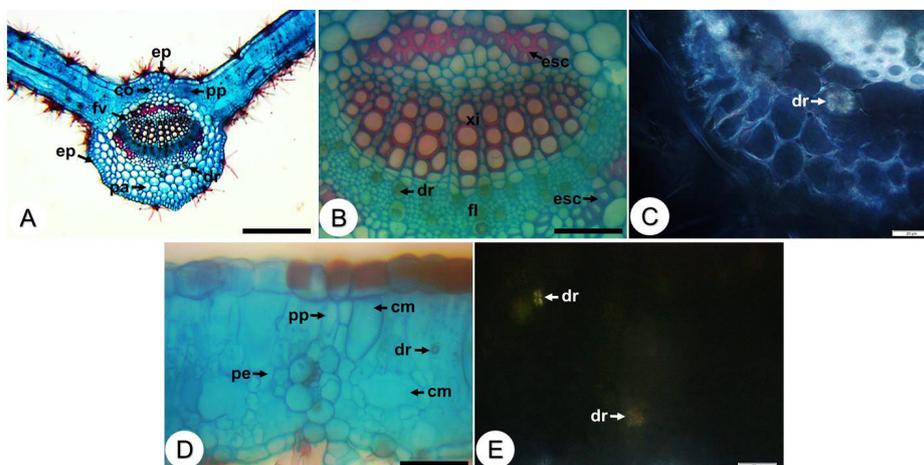


Figura 2 – Secções transversais da lâmina foliar de *Sida rhombifolia* L.

A, B e D: microscopia de luz; C e E: microscopia de polarização. A, B e C: nervura central; D e E: mesofilo. Abreviaturas: cm – célula mucilaginosa; co – colênquima; dr – drusa; ep – epiderme; esc – esclerênquima; fl – floema; fv – feixe vascular; pa – parênquima; pe – parênquima esponjoso; pp – parênquima paliçádico; xi – xilema. Barras: A = 200 μ m; B e D = 50 μ m; C e E = 20 μ m

Drusas são visualizadas no parênquima e no floema (Fig. 2A-C). Em *S. cordifolia*, as drusas foram evidenciadas apenas no floema (PRAMANICK; MAITI; SRIVASTAVA, 2015), enquanto que em *S. glaziovii* elas estão localizadas na bainha do feixe vascular (PROCÓPIO *et al.*, 2003). Em *S. acuta*, as drusas estão situadas nos mesmos locais encontrados no presente trabalho para *S. rhombifolia*, porém, em *S. acuta*, além das drusas, ainda observa-se no parênquima da nervura a presença de células mucilagosas (MOHIDEEN; SASIKALA; GOPAL, 2002), as quais não foram evidenciadas na nervura de *S. rhombifolia*, sendo este um caractere que auxilia na diferenciação das espécies.

Na espécie estudada, as células mucilagosas são encontradas no mesofilo (Fig. 2D). Este é dorsiventral, assim como reportado para outras espécies do gênero (MOHIDEEN; SASIKALA; GOPAL, 2002; PROCÓPIO *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2012; PRAMANICK; MAITI; SRIVASTAVA, 2015). É formado por cerca de três a cinco estratos de parênquima paliçádico e de quatro a seis estratos de parênquima esponjoso, contendo drusas em várias células (Fig. 2D-E).

A Figura 3A-C mostra cortes transversais da lâmina foliar previamente aos testes histoquímicos. Compostos fenólicos foram encontrados na epiderme (Fig. 3D). Triterpenos e esteroides foram visualizados na epiderme e no parênquima paliçádico

(Fig. 3E). Alcaloides (Fig. 3F) e compostos lipofílicos (Fig. 3G) foram encontrados nos tricomas glandulares. Lignina foi evidenciada no xilema e esclerênquima (Fig. 3H). Através da dissolução das drusas com ácido clorídrico (10%) (Fig. 3I-J), demonstrou-se que as mesmas são de oxalato de cálcio. Os testes para taninos e amido foram negativos.

Não foram encontrados na literatura estudos de histoquímica com a planta. A maior parte das investigações fitoquímicas com *S. rhombifolia* e outras espécies de *Sida* encontradas na literatura foram realizadas com as partes aéreas da planta (CHAVES *et al.*, 2013; DINDA *et al.*, 2015). De acordo com alguns trabalhos de revisão sobre o gênero, os grupos químicos predominantes em *Sida* são os alcaloides, flavonoides e ecdisteroides (HALDE; WAKE; PATIL, 2011; DINDA *et al.*, 2015). O principal alcaloide isolado no gênero é a efedrina (PRAKASH; VARMA; GHOSAL, 1981; CHATTERJEE; KUMAR; CHATTOPADHYAY, 2013). Dentre os compostos fenólicos, ácido ferúlico, isoquercetina, quempferol e coniferaldeído foram os componentes majoritários de extratos das folhas de *S. rhombifolia* (FERRO *et al.*, 2019).

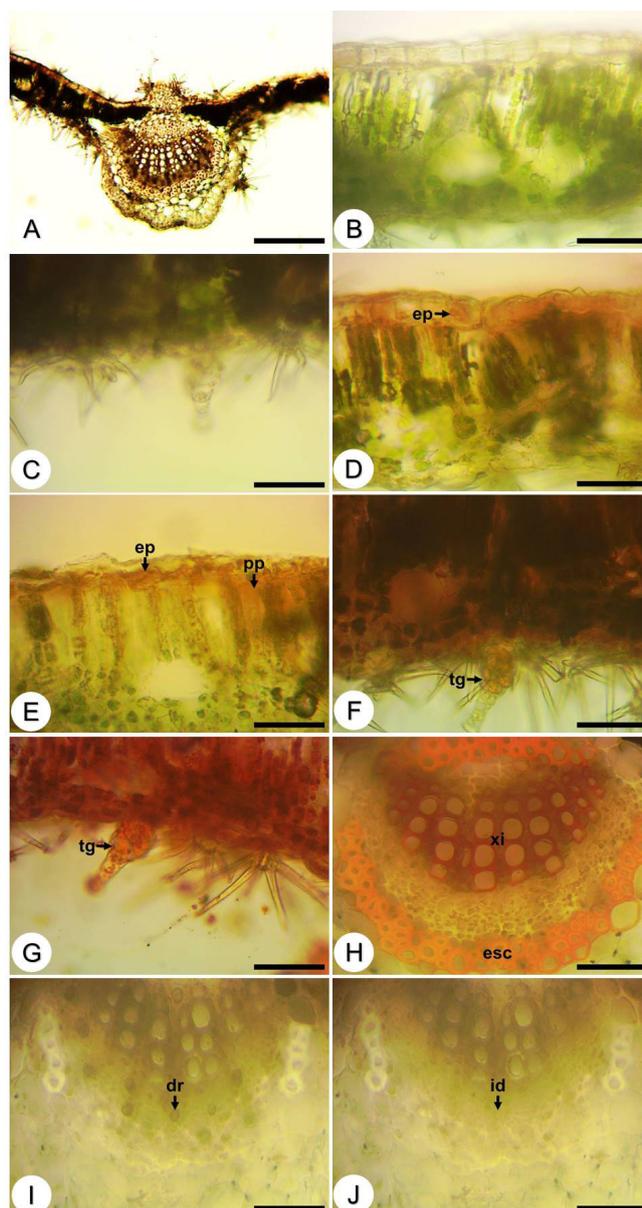


Figura 3 – Histoquímica da lâmina foliar de *Sida rhombifolia* L.

A, B e C: controle; D: dicromato de potássio (10%); E: tricloreto de antimônio; F: Dragendorff; G: Sudan III; H: Floroglucinol; I e J: ácido clorídrico (10%). Abreviaturas: dr – drusa; ep – epiderme; esc – esclerênquima; id – idioblasto; pp – parênquima paliçádico; tg – tricoma glandular; xi – xilema. Barras: A = 200 μm ; B-J = 50 μm .

4 | CONCLUSÃO

Os resultados encontrados determinam características importantes para diferenciar *Sida rhombifolia* de outras espécies do gênero, o que contribui no seu controle de qualidade. Além disso, através da histoquímica, foi possível determinar os locais de síntese ou acúmulo dos metabólitos da espécie.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. C. G. G.; BARROS, R. F. M. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 14, n. 3, p. 419-434, 2012.
- AKELE, B. In vivo antimalarial activity of areal part extracts of *Gardenia lutea* and *Sida rhombifolia*. **Int. J. Res. Pharmacol. Pharmacotherapeutics**, v. 2, p. 234-41, 2013.
- ALBERT, L. H. B. **Características morfológicas da cutícula foliar e efeitos de adjuvantes no controle químico de espécies de guanxumas (*Sida* spp)**. 2000. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2000.
- ALBERT, L. H. B.; VICTORIA FILHO, R. Micromorfologia foliar de espécies de *Sida* spp. (guanxumas). **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 337-342, 2002.
- ALMEIDA, M. Z. *et al.* Species with medicinal and mystical-religious uses in São Francisco do Conde, Bahia, Brazil: a contribution to the selection of species for introduction into the local Unified Health System. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, p. 171-184, 2014.
- ASSAM, A. J. P. *et al.* In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn.(Malvaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 40, 2010.
- BIANCO, S.; CARVALHO, L. B.; BIANCO, M. S. Crescimento e nutrição mineral de *Sida rhombifolia*. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 311-317, 2014.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- CHATTERJEE, A.; KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, S. K. A validated HPLC-PDA method for identification of bioactive alkaloids, ephedrine and cryptolepine in diferente *Sida* species. **Biomed. Chromatogr.**, v. 27, p. 1720-1725, 2013.
- CHATURVEDI, P.; KWAPE, T. E. Attenuation of diabetic conditions by *Sida rhombifolia* in moderately diabetic rats and inability to produce similar effects in severely diabetic in rats. **J. Pharmacopuncture**, v. 18, n. 4, p. 12, 2015.
- CHAVES, O. *et al.* Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L.(Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2769-2777, 2013.

- CHAVES, O. *et al.* Alkaloids and phenolic compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and vasorelaxant activity of two indoquinoline alkaloids. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 94, 2017.
- CUNHA, V. C. *et al.* Anatomia foliar comparativa em espécies de guanxuma. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 341-349, 2012.
- DHALWAL, K.; DESHPANDE, Y. S.; PUROHIT, A. P. Evaluation of in vitro antioxidant activity of *Sida rhombifolia* (L.) ssp. *retusa* (L.). **J. Med. Food**, v. 10, n. 4, p. 683-688, 2007.
- DINDA, B. *et al.* The genus *Sida* L. – a traditional medicine: its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry. **J. Ethnopharmacol.**, v. 176, p. 135-176, 2015.
- FERRÃO, B. H. *et al.* Importância do conhecimento tradicional no uso de plantas medicinais em Buritis, MG, Brasil. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 321-334, 2014.
- FERRO, D. M. *et al.* Integrated extraction approach to increase the recovery of antioxidant compounds from *Sida rhombifolia* leaves. **J. Supercritical Fluids**, v. 149, p. 10-19, 2019.
- FLORA DO BRASIL. **Sida in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9203>>. Acesso em: 24 Nov. 2019.
- GHOSH, G.; SUBUDHI, B. B.; MISHRA, S. K. Anti-hyperglycemic activity of root bark of *Polyathia longifolia* var. *pendula* and aerial parts of *Sida rhombifolia* Linn and its relationship with antioxidant property. **Asian J. Chem.**, v. 23, p. 141-144, 2011.
- GUPTA, S. R. *et al.* Anti-arthritis activity of various extracts of *Sida rhombifolia* aerial parts. **Nat. Prod. Res.**, v. 23, n. 8, p. 689-695, 2009.
- HALDE, U. K.; WAKE, R.; PATIL, N. Genus *Sida*-The plants with ethno medicinal and therapeutic potential. **Golden Res. Thoughts**, v. 1, p. 1-4, 2011.
- HOFFMANN, D. **Morfologia foliar e controle de plantas daninhas em função do sombreamento**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.
- ISLAM M. E.; HAQUE, M. E.; MOSADDIK, M. A. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Sida rhombifolia* (Malvaceae) grown in Bangladesh. **Phytother. Res.**, v. 17, n. 8, p. 973-975, 2003.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry, principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523p.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1985.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.
- KRAUTER, D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. **Mikrokosmos**, v. 74, p. 231-233, 1985.
- KUMAR, R. S. *et al.* Anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Sida rhombifolia* Linn. I. **J. Pharmacol.**, v. 29, n. 2, p. 110, 1997.

- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- MACE, M. E.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. **Phytophatol.**, v. 64, p. 1297-1302, 1974.
- MACE, M. Z.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Can. J. Bot.**, v. 52, p. 2423-2426, 1974.
- MAH, S. H.; TEH, S. S.; EE, G. C. L. Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida rhombifolia*. **Pharm. Biol.**, v. 55, n. 1, p. 920-928, 2017.
- MENDONÇA, C. G. **Características das superfícies foliares de algumas plantas daninhas e estudo da absorção e translocação de 2,4-D em *Memora peregrina* (Miers) Sandwith**. 2004. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- MESSIAS, M. C. T. B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950.
- MOHIDEEN, S.; SASIKALA, E.; GOPAL, V. Pharmacognostic studies on *Sida acuta* Burm.f. **Ancient Sci. Life**, v. XXII, n. 1, 2002.
- MOUKETTE, B. M. *et al.* Antioxidant and synergistic antidiabetic activities of a three-plant preparation used in Cameroon folk medicine. **Int. Sch. Res. Notices**, v. 2017, 2017.
- OLATUNJI, O. A.; BAKARE, O. A. Folial anatomy of the species *Sida* L. (Malvaceae) in Nigeria. **Feddes Repert.**, v. 104, n. 1-2, p. 27-34, 1993.
- OLIVEIRA, A. F. *et al.* Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. **Antioxidants**, v. 1, n. 1, p. 33-43, 2012.
- PAPITHA, N. *et al.* Anti-tubercular activity on leaves and roots of *Sida rhombifolia* L. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 20, p. 135-137, 2013.
- PIEME, C. A. *et al.* In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 29, n. 3, p. 223-228, 2010.
- PRAKASH, A.; VERMA, R. K.; GHOSAL, S. Alkaloidal constituents of *Sida acuta*, *S. humilis*, *S. rhombifolia* and *S. spinosa*. **Planta Med.**, v. 43, p. 384-388, 1981.
- PRAMANICK, D. D.; MAITI, G. G.; SRIVASTAVA, A. Micro-morphological study of 'Bala' plant (*Sida cordifolia* L., Malvaceae) with special reference to its propagation technique. **J. Med. Plants Stud.**, v. 3, n. 4, p. 127-131, 2015.
- PROCÓPIO, S. O. *et al.* Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. V - *Leonurus sibiricus*, *Leonotis nepetaefolia*, *Plantago tomentosa* e *Sida glaziovii*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 403-411, 2003.
- RAHMAN, M. A. *et al.* A algésico ad cytotoxic activities of *Sida rhombifolia* Linn. **Pharmacologyonline**,

v. 2, p. 707-714, 2011.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951. 391p.

SHAHEEN, N. *et al.* Foliar epidermal anatomy and its systematic implication within the genus *Sida* L. (Malvaceae). **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, n. 20, p. 5328-5336, 2009.

SILVA, A. J. R.; ANDRADE, L. H. C. Cultural significance of plants in communities located in the coastal forest zone of the State of Pernambuco, Brazil. **Hum. Ecol.**, v. 34, n. 3, p. 447-465, 2006.

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

TEIXEIRA, A. H. *et al.* Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **Sanare**, Sobral, v. 13, n. 1, p. 23-28, 2014.

YODER, L. R.; MAHLBERG, P. G. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **Am. J. Bot.**, v. 63, p. 1167-1173, 1976.

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E PROPAGAÇÃO DE CYRTOPODIUM FLAVUM (ORCHIDACEAE) UTILIZANDO O SECCIONAMENTO DE PROTOCORMOS

Data de aceite: 06/02/2020
Data de submissão: 25/11/2019

Suzana Stefanello

Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina,
Departamento de Biodiversidade – Palotina -
Paraná

<http://lattes.cnpq.br/0157777453041078>

Fabielle Garcia Zandonadi da Cruz

Faculdade Tecnológica do Vale do Ivaí, Pós-
Graduação em Psicopedagogia - Palotina -
Paraná

<http://lattes.cnpq.br/7312500678784895>

Carina Kozera

Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina,
Departamento de Biodiversidade – Palotina –
Paraná

<http://lattes.cnpq.br/6656047851884712>

Samara Zanella

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Pós-
Graduação em Ciências Ambientais - Toledo –
Paraná

<http://lattes.cnpq.br/3173387617603906>

RESUMO: As sementes de Orchidaceae geralmente possuem baixa taxa de germinação em condições naturais. Desta forma, o cultivo *in vitro* constitui uma eficiente técnica para a sua propagação clonal e o uso de testes rápidos para a avaliação da viabilidade das

sementes uma ferramenta importante para isso. Diferentes explantes podem ser utilizados na micropropagação de orquídeas, dentre eles os protocormos, os quais apresentam grande capacidade regenerativa e quando seccionados desenvolvem “protocorm-like-bodies” (PLBs) que originam plantas completas. Este trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade das sementes e a germinação *in vitro* de *Cyrtopodium flavum*, bem como a sua propagação a partir de segmentos de protocormos seccionados e cultivados na presença de Benzilaminopurina (BAP). A viabilidade das sementes foi avaliada após a coleta dos frutos e após 120 dias de armazenamento através da imersão em tetrazólio (1%) por até 6 horas. A semeadura *in vitro* foi realizada em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$. Transcorridos 200 dias após a semeadura, os protocormos foram seccionados transversalmente em dois segmentos (caulinar e radicular) e inoculados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ suplementado com BAP (0; 1; 2 mg.L $^{-1}$), resultando em seis tratamentos. As culturas foram acondicionadas em B.O.D. a 24°C \pm 2°C e fotoperíodo de 16 horas. Avaliou-se a formação de PLBs e/ou calos por 60 dias. A análise da viabilidade das sementes mostrou que com 4 horas de exposição à solução de tetrazólio as sementes desenvolveram coloração avermelhada. Valores elevados de viabilidade foram verificados após a coleta das cápsulas,

bem como após 120 dias de armazenamento. Maiores percentuais de regeneração de PLBs foram obtidos a partir dos explantes caulinares em meio de cultura suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP. As plantas regeneradas a partir dos PBLs foram aclimatizadas e aos 30 dias de cultivo apresentaram 100% de sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE: Regeneração *in vitro*; Orquídeas, Benzilaminopurina.

IN VITRO GERMINATION AND PROPAGATION OF *CYRTOPODIUM FLAVUM* (ORCHIDACEAE) USING PROTOCORMS SECTIONS

ABSTRACT: Orchidaceae seeds usually have low germination rates under natural conditions. Thus, *in vitro* cultivation is an efficient technique for its clonal propagation and the use of rapid tests to evaluate seed viability is an important tool for that. Different explants can be used in micropropagation of orchids, among them the protocorms, which have great regenerative capacity and when sectioned develop “protocorm-like-bodies” (PLBs) that originate complete plants. The objective of this research was to study the seed viability and *in vitro* germination of *Cyrtopodium flavum*, as well as the propagation from sectioned protocorm segments cultivated in the presence of Benzylaminopurine (BAP). Seed viability was evaluated after collection and also after 120 days of storage by tetrazolium immersion (1%) for up to 6 hours. *In vitro* sowing was performed in MS^{1/2} culture media. 200 days after sowing, the protocorms were cross-sectioned into two segments (stem and root) and inoculated in MS^{1/2} culture media supplemented with BAP (0; 1; 2 mg.L⁻¹), resulting in six treatments. The cultures were packaged in B.O.D. at 24°C ± 2°C and photoperiod of 16 hours. After 60 days the formation of PLBs and/or callus was evaluated. Seed viability analysis showed that after 4 hours of exposure to tetrazolium solution, the seeds developed reddish color. High viability values were verified after capsule collection as well as after 120 days of storage. Higher percentages of PLBs regeneration were obtained from stem explants in culture medium supplemented with 2 mg.L⁻¹ BAP. Plants regenerated from PBLs were acclimatized and at 30 days of cultivation had 100% survival.

KEYWORDS: *In vitro* regeneration; Orchids, Benzylaminopurine.

1 | INTRODUÇÃO

Cyrtopodium flavum Link & Otto ex Rchb.f. (sinônimos: *Cyrtopodium paranaense*; *Cyrtopodium polyphyllum*; *Epidendrum polyphyllum*; *Tylochilus flavus*) é uma orquídea terrícola nativa do Brasil e que também cresce sobre afloramentos rochosos (BARROS et al., 2015). Possui pseudobulbos fusiformes com 6 a 8 folhas, inflorescência paniculada que produz até 130 flores amarelas e ressupinadas, fruto do tipo cápsula com alta taxa de sementes potencialmente viáveis (PANSARIN et al., 2008). É endêmica do Brasil e ocorre em tipologias vegetais do bioma Cerrado e Mata Atlântica (BARROS et al., 2015). A espécie possui elevado potencial como planta ornamental e também indicação para fins terapêuticos, havendo registros da utilização do sumo dos seus

pseudobulbos para a cicatrização de ferimentos e para estancar a perda de sangue em cortes e lesões (VIEIRA et al., 2000). Estudos exploratórios realizados por Silva et al. (2013) revelaram grande diversidade de componentes fitoquímicos nos extratos obtidos a partir das raízes.

As espécies de Orchidaceae, de uma maneira geral, são ornamentais e, devido a isso, possuem grande importância econômica e isso vem favorecendo a realização de coletas indiscriminadas das espécies dos seus ambientes naturais, os quais também vem sofrendo fortemente com a degradação por meio da ação antrópica. Sendo assim, as técnicas de propagação vegetativa, que permitem a produção de mudas em larga escala, podem ser uma excelente opção para atender as demandas comerciais e para programas de conservação que visem à reintrodução destas plantas na natureza (DUTRA et al., 2009; SUZUKI et al., 2012; FERREIRA et al., 2017).

Quanto às sementes de orquídeas, são produzidas em cápsulas e há a formação de uma grande quantidade. Possuem potenciais de viabilidade distintos, variando de acordo com o tipo de polinização e o armazenamento utilizado (BLOSSFELD, 1999). Não são utilizadas para semeadura direta pois não possuem endosperma e necessitam da associação com fungos micorrízicos que forneçam compostos glicídicos para que possam germinar. Ainda assim, apenas um pequeno percentual delas alcança esta etapa (DRESSLER, 1981). Em laboratório, observa-se que com a germinação assimiótica *in vitro*, onde o meio de cultura é suplementado com uma fonte de carboidratos, elevados percentuais de germinação têm sido obtidos (RODRIGUES et al., 2015; MERCADO; CONTRERAS, 2017), caracterizando-se, portanto, como outra forma alternativa de produção de mudas que não causa danos às populações de orquídeas nos ambientes naturais.

A técnica de cultivo *in vitro* é uma ferramenta importante para a produção de mudas de muitas espécies de plantas, incluindo as orquídeas, no entanto ainda depende do estabelecimento de protocolos eficientes (CARDOSO et al., 2018). Um aspecto importante para assegurar a eficácia da germinação *in vitro* e a obtenção de novas plantas, é a avaliação da qualidade das sementes. Uma alternativa rápida, eficaz e de baixo custo para isso é o teste do tetrazólio, que avalia a viabilidade das sementes para fins de semeadura e reflete a atividade das desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular (HOSOMI, 2009). Para as orquídeas este teste ainda necessita de mais estudos que possam otimizar os resultados, como a necessidade de pré-condicionamento e adequação do tempo de exposição ao tetrazólio (SOARES et al., 2014).

Na micropropagação de orquídeas diferentes tipos de explantes podem ser utilizados como, por exemplo, os protocormos (GOMES et al., 2015) os quais podem ser seccionados e induzir a formação de “protocorm-like-bodies” (PBLs) sob a influência de reguladores de crescimento, principalmente das auxinas e citocininas (FRANCESCHI, 2013). A técnica é conhecida como “thin cell layer” (TCL) e consiste na excisão de diferentes órgãos da planta que são seccionados transversal ou longitudinalmente

(NHUT et al., 2006). A importância da utilização dos protocormos como explantes reside na alta capacidade regenerativa dos mesmos, que é devida a sua elevada atividade meristemática (KRAUS et al., 2006). A lâmina de tecido seccionada é exposta a uma maior superfície de contato com o meio de cultura indutor propiciando maior taxa proliferativa (TEIXEIRA DA SILVA; DOBRANSZKI, 2013).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade e a germinação *in vitro* de sementes de *Cyrtopodium flavum* e avaliar o efeito da utilização de concentrações de Benzilaminopurina sobre segmentos de protocormos seccionados transversalmente, visando estabelecer um protocolo de micropropagação para a produção de mudas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal, viabilidade das sementes e germinação *in vitro*

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Palotina. PR. Para os experimentos foram utilizadas cápsulas maduras antes da deiscência e oriundas de polinização natural de *Cyrtopodium flavum* coletadas na restinga herbáceo-arbustiva da Praia de Pontal do Sul, Pontal do Paraná, PR. As cápsulas coletadas foram utilizadas para testes de viabilidade das sementes e para semeadura *in vitro*. Uma parte das cápsulas foi utilizada após a coleta e outra foi mantida em temperatura ambiente por 120 dias.

As cápsulas foram lavadas externamente com detergente neutro e água corrente e, em câmara de fluxo laminar, foram submetidas a assepsia com etanol 70% durante três minutos e hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 20 minutos. Em seguida, foram realizadas três lavagens consecutivas em água destilada esterilizada em autoclave.

A análise da viabilidade das sementes foi efetuada através do teste do tetrazólio. As sementes foram separadas em porções de 10 mg e utilizadas para avaliar o efeito do pré-condicionamento em sacarose 10% antes da exposição à solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (1%). Para fins de comparação, o controle foi realizado utilizando amostras de sementes sem o pré-acondicionamento com sacarose. Alíquotas de 10 mg de sementes foram colocadas em tubos de ensaio e acrescidas de 1,5 mL da solução de sacarose 10% por 12 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de sacarose foi retirada, as sementes lavadas duas vezes com água destilada e foi adicionado 1,5 mL do tetrazólio. Os tubos foram colocados em banho-maria a 40°C, no escuro, sendo coletadas amostras das sementes a cada hora, por um período de 6 horas.

A percentagem de viabilidade foi determinada montando-se uma lâmina com 100 μ L da solução de tetrazólio. Realizou-se a contagem de 50 sementes com 5

repetições, totalizando 250 sementes. As lâminas foram analisadas em microscópio sendo consideradas viáveis aquelas sementes que apresentaram o embrião totalmente corado de vermelho. A captura das imagens foi realizada com câmera ToupView 3.0 (Toup Tek Photonics, China) acoplada ao microscópio.

A semeadura *in vitro* foi realizada utilizando-se 500 mg de sementes, as quais foram imersas em 100 mL de água destilada. Coletou-se uma alíquota de 500 μ L desta solução que foi disposta sobre o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de macronutrientes ($MS\frac{1}{2}$), sacarose (30 g.L^{-1}), ágar ($6,5\text{ g.L}^{-1}$) e distribuída em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Foram utilizados cinco frascos para a semeadura.

Os cultivos foram acondicionados em B.O.D. com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. O acompanhamento da germinação foi realizado semanalmente buscando identificar a germinação e o crescimento inicial dos protocormos.

O mesmo procedimento descrito acima foi adotado para a análise da viabilidade de sementes e germinação *in vitro* de sementes mantidas no Laboratório em temperatura ambiente durante 120 dias (em frascos de vidro sem tampa), que compreendeu os meses de inverno (maio a agosto de 2015), contudo não foi realizado o acompanhamento da variação de temperatura durante o período.

2.2 Indução da regeneração a partir do seccionamento de protocormos

Protocormos obtidos através da germinação com 200 dias após a semeadura foram utilizados como explantes para avaliar a regeneração de plantas. Eles foram seccionados transversalmente em dois segmentos (caulinar e radicular) e colocados em placas de Petri com o lado interno do corte em contato com o meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ acrescido de sacarose (30 g.L^{-1}), ágar ($6,5\text{ g.L}^{-1}$) e suplementado com BAP (0; 1 e 2 mg.L^{-1}). O seccionamento foi realizado sobre uma solução estéril de ácido ascórbico (100 mg.L^{-1}) visando evitar a oxidação fenólica.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (duas regiões e três concentrações de BAP). A unidade experimental consistiu de uma placa de Petri com quatro segmentos de cada região, com quatro repetições por tratamento. A avaliação visual das respostas morfogênicas foi realizada semanalmente e aos 60 dias de cultivo, foi avaliado o percentual de explantes que regeneraram PLBs. O material foi então transferido para meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ isento de substâncias reguladoras para acompanhamento do crescimento e da formação de plantas completas. Os cultivos foram acondicionados em B.O.D. sob condições controladas, com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.3 Aclimatização

As plantas regeneradas (com aproximadamente 3 a 4 cm de altura) foram utilizadas para avaliar a aclimatização, sendo dispostas em bandeja plástica transparente (10 x

20 cm), com furos na parte superior, contendo substrato a base de casca de pinus, carvão e isopor. Nos primeiros 30 dias de cultivo, os frascos permaneceram a sombra, com a tampa fechada buscando manter a umidade.

As plantas foram irrigadas manualmente, uma vez por dia, utilizando um borrifador. A taxa de sobrevivência e altura média foi avaliada aos 30 dias. Após este período as plantas foram transferidas para vasos individuais sem tampa com o mesmo substrato, sendo irrigadas uma vez por dia.

2.4 Análise Estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5%, com a utilização do aplicativo computacional SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014).

3 I . RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Viabilidade das sementes e germinação *in vitro*

A análise da viabilidade das sementes de *Cyrtopodium flavum* revelou que somente a partir de 3 horas de exposição à solução de tetrazólio as sementes começaram evidenciar coloração avermelhada, intensificando a cor vermelha no período de 4 horas e mantendo desempenho similar com 5 e 6 horas de exposição (Figura 1A, 1B e 1C). O tempo necessário para a coloração das sementes varia entre as espécies. Hosomi (2009) também relatou que o período de 3 horas de exposição ao tetrazólio 1% não foi eficiente e dificultou a identificação das sementes viáveis de *Cattleya leopoldii* e *Cattleya walkeriana* por conta da fraca coloração adquirida e recomendou o uso da solução de tetrazólio por 6 horas ou mais, com pré-condicionamento das sementes por 24 horas em solução de sacarose, a qual foi importante para ativar o metabolismo dos embriões.

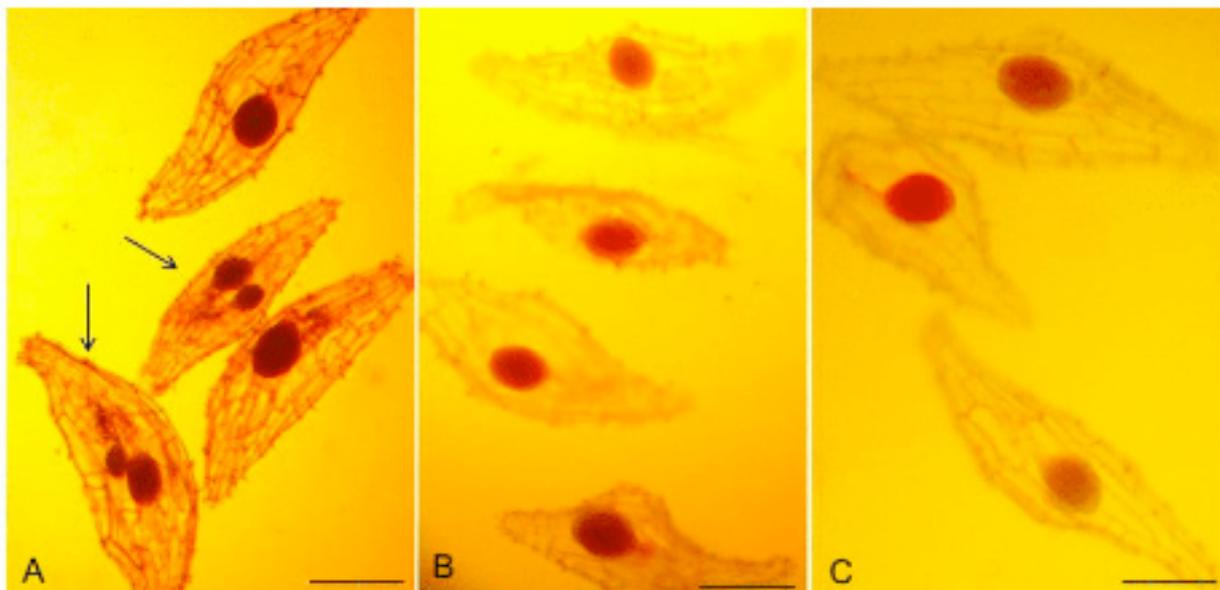


Figura 1. Sementes de *Cyrtopodium flavum* submetidas ao teste do tetrazólio. A) Pré-condicionadas com água e 2 horas em tetrazólio; B) pré-condicionadas com sacarose e 4 horas em tetrazólio; C) pré-condicionadas com água e 6 horas em tetrazólio. Sementes com 2 embriões (seta). Barra=10 μ m.

As sementes apresentaram percentuais similares de viabilidade (superiores a 80%) após a coleta e também com a permanência por 120 dias em temperatura ambiente, sem o pré-condicionamento com sacarose (Tabela 1). Diferenças significativas na viabilidade entre os dois períodos ocorreram quando houve o pré-condicionamento das sementes com sacarose, com valores superiores após a coleta. A viabilidade das sementes com 120 dias de armazenamento e pré-condicionadas em solução com sacarose foi significativamente inferior aquelas sem a permanência com sacarose. A interação entre os dois fatores foi significativa. Segundo Homosi (2009) o pré-condicionamento com sacarose permitiu a coloração mais homogênea e facilitou a visualização das sementes de *Catleya* utilizadas em seu estudo, além de permitir um maior equilíbrio osmótico entre a semente e o meio externo.

Algumas sementes apresentaram dois embriões (Figura 1 a) o que também foi relatado por Pasarin et al. (2008) que observaram poliembrião em 5% das sementes, bem como elevada taxa de sementes potencialmente viáveis (superior a 90%) em frutos desenvolvidos em condições naturais.

Pré-condicionamento	Viabilidade após	Viabilidade após	Média
	a coleta	120 dias	
	(%)	(%)	
Sem sacarose	84,4 aA	84,0 aA	84,2 A
Com sacarose	80,8 aA	71,2 bB	76 B
Média	82,6 A	77,6 B	
CV (%) = 5,96			

Tabela 1. Percentual médio de viabilidade das sementes de *Cyrtopodium flavum* após a coleta e mantidas por 120 dias em temperatura ambiente, pré-condicionadas ou não em solução de sacarose (10%), com 6 horas de exposição a solução de tetrazólio.

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. CV=Coeficiente de Variação.

O processo de germinação iniciou com a ruptura da testa, que foi observada duas semanas após a semeadura *in vitro*. Dutra et al. (2009), de modo similar, também evidenciaram a ruptura da testa de sementes de *Cyrtopodium punctatum* após duas semanas de cultivo, porém com sementes mantidas na ausência de luz. Com 30 dias já se observaram os primeiros protocormos no estágio 1 de desenvolvimento que corresponde ao embrião intumescido e clorofilado de acordo as descrições de Arditti (1992) e Suzuki et al. (2010). As sementes de orquídea apresentam modelos de desenvolvimento únicos e que são divididos em fases ou estádios (ARDITTI, 1992; SUZUKI et al., 2010). O protocormo alonga e forma a primeira folha (estádio 2), forma duas ou mais folhas (estádio 3) e finalmente desenvolve raízes originando uma planta completa (estádio 4).

Decorridos 75 dias após a semeadura, a maior parte dos protocormos apresentavam-se esféricos no estágio 1. Alguns protocormos em estágio 2 com formação da primeira folha já puderam ser observados aos 120 dias e próximo aos 200 dias de cultivo alguns dos protocormos apresentavam mais de uma folha (estádio 3). De modo similar, os resultados de Jorge et al. (2015) apontaram que 90 dias após a semeadura grande parte das sementes de *Cattleya warneri* (90,8 e 41,9%) presentes em meios de cultura MS e MS $\frac{1}{2}$, respectivamente, encontravam-se no estágio 1. Porém, as respostas germinativas podem apresentar variações entre as espécies de orquídea (SUZUKI et al., 2010).

3.2 . Indução da regeneração a partir do seccionamento de protocormos/PLBs

A regeneração de PLBs ocorreu em todas as concentrações de BAP testadas, com ambos os explantes testados (caulinares e radiculares) e diferiu significativamente (Tabela 2). Não houve interação entre os dois fatores, indicando que as duas variáveis são independentes. A melhor resposta em relação às concentrações de BAP na

indução de PBLs foi observada quando os explantes caulinares foram cultivados em meio de cultura suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP (75%), diferindo significativamente daquelas obtidas com 1 mg.L⁻¹ de BAP (41,7%) e na ausência de BAP (37,5%).

BAP mg.L ⁻¹	Caulinar %	Radicular %	Média geral
0	37,5 bA	41,7 aA	37,5 a
1	41,7 bA	33,3 aA	37,5 a
2	75,0 aA	37,5 aB	56,25 a
Média geral	52,5 A	37,5 A	
CV (%) = 35,4			

Tabela 2. Percentagem média de regeneração de PLBs formados em explantes caulinares e radiculares retirados de protocormos de *Cyrtopodium flavum* cultivados em meio de cultura suplementado com BAP (0; 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP).

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. CV=Coeficiente de Variação.

Os explantes caulinares foram significativamente superiores (75%) aos radiculares (37,5%) proporcionando os maiores percentuais médios de PBLs quando o meio de cultura foi suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP. Inicialmente, os segmentos cultivados em meio de cultura com BAP formaram um aglomerado de PLBs (Figura 2A e 2B), lembrando a estrutura de um calo e posteriormente originaram plantas completas (Figura 2C e 2D). A adição de N6-Benziladenina (sinonímia de BAP) também foi eficiente na regeneração de PBLs a partir de protocormos de *Brasilidium praetextum* (FRANCESCHI, 2013) e de *Brasilidium forbesii* (GOMES et al., 2015), ambas orquídeas epífitas endêmicas da Floresta Atlântica.

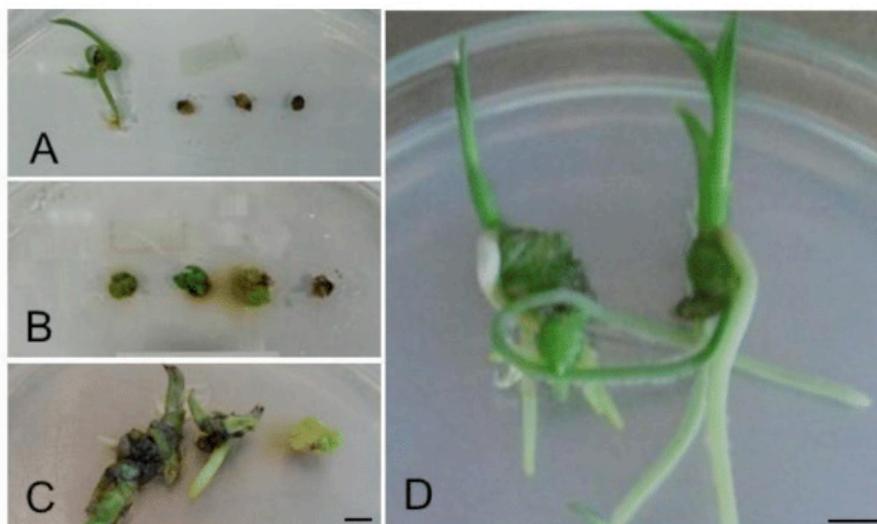


Figura 2. Respostas morfológicas dos explantes seccionados dos protocormos de *Cyrtopodium flavum* e cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ 2. Caulinares sem BAP (A) e com 2 mg.L $^{-1}$ de BAP (B) aos 30 dias; radiculares com 2 mg.L $^{-1}$ de BAP aos 60 dias (C) e caulinares sem BAP aos 75 dias. Barra=0,5 cm.

3.3 Aclimatização

As plantas regeneradas foram aclimatizadas em substrato e apresentaram 100% de sobrevivência aos 30 dias após a retirada das condições *in vitro* (Figura 3A). Ocorreu a formação de novas folhas e raízes indicando que as plantas responderam bem as condições *ex vitro*. Quando as plantas foram aclimatizadas apresentavam em média 4 cm e após 180 dias, as maiores apresentavam tamanho próximo a 20 cm (Figura 3B).

A umidade mantida dentro das embalagens com tampa deve ter favorecido o sucesso na sobrevivência neste período inicial. Contudo, novos estudos devem ser realizados buscando quantificar a aclimatização em períodos de tempo maiores. Franceschi (2013) também relatou eficiência nas percentagens de sobrevivência (94%) de *Brasilidium praetextum*, porém em um período de 90 dias de cultivo *ex vitro*, com irrigação manual duas vezes ao dia e uma vez ao dia após esse período.

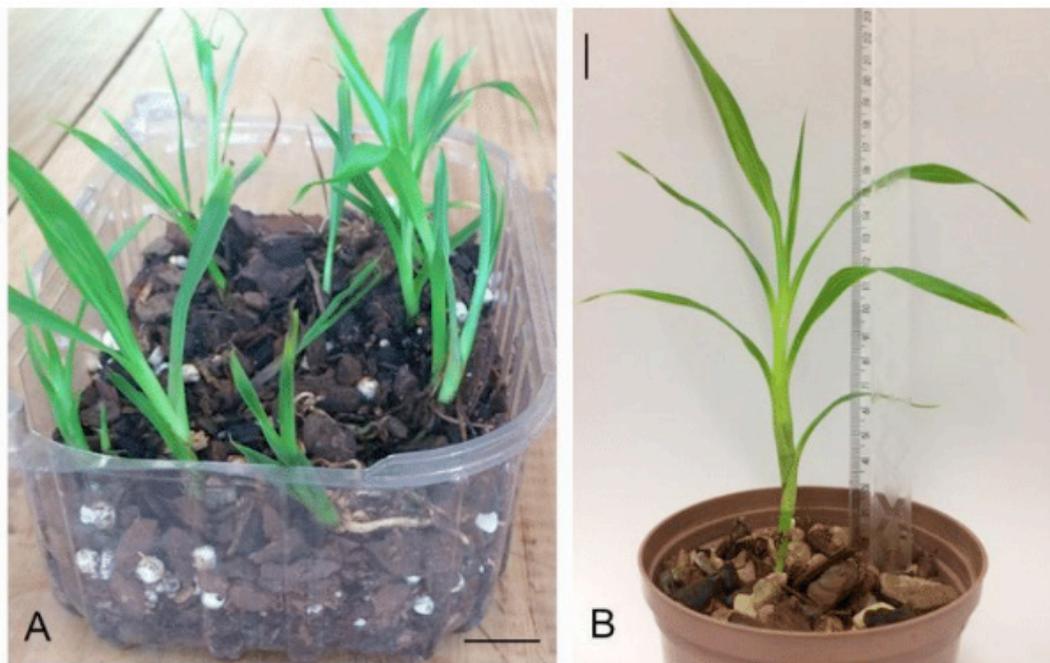


Figura 3. Plantas de *Cyrtopodium flavum* aclimatizadas: a) 30 dias após o transplante em substrato; b) 180 dias após a aclimatização. Barra: 2 cm.

4 | CONCLUSÕES

A análise da viabilidade das sementes mostrou que com 4 horas de exposição à solução de tetrazólio as sementes desenvolveram coloração avermelhada. Valores elevados de viabilidade foram obtidos após a coleta das cápsulas, bem como após 120 dias após o armazenamento dos frutos. A germinação *in vitro* iniciou com ruptura da testa e aos 30 dias foram observados os primeiros protocormos entumescidos e clorofilados.

Recomenda-se o uso de explantes caulinares seccionados transversalmente de protocormos e cultivados em meio de cultura suplementado com 2 mg.L^{-1} de BAP para a formação de aglomerados que originarão plantas completas.

A técnica utilizada neste estudo é eficaz para a micropropagação de *Cyrtopodium flavum* a partir de sementes germinadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992, 530p.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FOESTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. 2015 *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11444>> Acesso em: 21 nov. 2019.

BLOSSFELD, A. **Orquidologia, orquidofilia e orquicultura**. Jaboticabal: FUNESP, 1999. 89 p.

CARDOSO, J.C.; SHENG GERALD, L.T.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A. Micropropagation in the twenty-

first century. In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-ALEJO, N. (Org.). **Methods in molecular biology**. 4. ed. New York: Springer New York, 2018, v. 1815, p. 17-46.

DRESSLER, R.L. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge, 1981.

DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for na endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 96, n.3, p. 235-243, 2009.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.6**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2014.

FERREIRA, W.M.; VASCONCELOS, M.C.; SILVA, C.C.N.; OLIVEIRA, H.R.; SUZUKI, R.M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. **Iheringia**, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.

FRANCESCHI, C. R. B. **Conservação de sementes e micropropagação de orquídeas da Mata Atlântica utilizando a técnica “thin cell layer”**. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GOMES, L.R.P.; FRANCESCHI, C.R.; RIBAS, L.L.F. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.

HOSOMI, S. T. **Germinação, viabilidade e armazenamento de sementes de *Cattleya* (Orchidaceae)**. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, 2009.

JORGE, J.; JURAS, M.C.R.; SUZUKI, R.M. Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n.3, p. 134-141, 2015.

KRAUS, J.E.; KERBAUY, G.B.; MONTEIRO, W.R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 177-184, 2006.

MERCADO, S.A.S.; CONTRERAS, N.A.V. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb.f. (Orchidaceae). **Acta Agronômica**, v. 66, n. 4, p. 544-548, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p.473-497, 1962.

NHUT, D.T.; HAI, N.T.; DON, N.T.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; VAN, K.T.T. Latest applications of Thin Cell Layer (TCL) culture systems in plant regeneration and morphogenesis. In: TEIXEIRA DA SILVA, J.A. (Ed.) **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues**. 1 ed., v.2. Isleworth: Global Science Books, p. 465-471, 2006.

PANSARIN, L.M.; PANSARIN, E.R.; SAZIMA, M. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. **Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 650-659, 2008.

RODRIGUES, L.A.; PAIVA NETO, V.B.; BOSRETTO, A.G.; OLIVEIRA, J.F.; TORREZAN, M.A.; LIMA, S.F.; OTONI, W.C. *In vitro* propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb.f. (Orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n, 3, p. 10-17, 2015.

SILVA, A. G.; BOLDRINI, R. F.; KUSTER, R. M. Os sumarés da medicina tradicional brasileira, ou, as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). **Natureza Online**, v.

11, n. 3, p. 152 -154, 2013.

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; TATARA, M.B.; SORGATO, J.C.; LEMES, C.S.R. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste do tetrazólio. **Semina**, v. 35, n. 5, p. 2275-2284, 2014.

SUZUKI, R.M.; ALMEIDA, V.C; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p. 719-730, 2010.

SUZUKI, R.M.; MOREIRA, V.C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 5, p.500-511, 2012.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; DOBRANSZKI, J. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 922-943, 2013.

VIEIRA, A.C.M.; SOARES, A.P.C.; LAINETTI, R. Pharmacognostic study of Sumaré – *Cyrtopodium paranaense* Schltr. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 81, p. 11-13, 2000.

IDENTIFICAÇÃO DE ISOPRENOIDES NA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS DE *MACHAERIUM ACUTIFOLIUM* POR CG-EM

Data de aceite: 06/02/2020

Adonias Almeida Carvalho

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piripiri)
Piripiri – Piauí
Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Jurema Santana de Freitas

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Bruno Quirino Araújo

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí
Programa de Pós-Graduação em Química,
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – Espírito Santo

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

RESUMO: O estudo fitoquímico da fração hexânica das folhas de *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae) resultou no isolamento de uma mistura composta por quatro esteroides: colesterol (1), campesterol

(2) sitosterol (3) e estigmasterol (4) e um triterpenoide: lupeol (5). As estruturas destes compostos foram identificadas por CG-EM, considerando o tempo de retenção, padrão de fragmentação e por comparação com dados da literatura. Este é o primeiro relato de identificação dos compostos 1, 2 e 4 no gênero *Machaerium*.

PALAVRAS-CHAVE: triterpenoide, esteroides, estudo fitoquímico, *Machaerium acutifolium*, Fabaceae

IDENTIFICATION OF ISOPRENOIDS FROM HEXANIC FRACTION OF LEAVES OF *MACHAERIUM ACUTIFOLIUM* BY CG-EM

ABSTRACT: The phytochemical study of the hexane fraction of the leaves of *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae) resulted in the isolation of the M1 mixture and identification of four steroids: cholesterol (1), campesterol (2) sitosterol (3) and stigmasterol (4) and one triterpenoid: lupeol (5). The structures of these compounds were identified by GC-MS, considering retention time, fragmentation pattern and by comparison with literature data. This is the first report of identification of compounds 1, 2 and 4 in the genus *Machaerium*.

KEYWORDS: triterpenoid, steroids, phytochemical study, *Machaerium acutifolium*, Fabaceae

1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Machaerium* é constituído por aproximadamente 262 espécies, pertence à família Fabaceae-Papilionoideae, tem origem tropical (LEWIS et al., 2005), sendo conhecido do sul do México a América do Sul. Espécies deste gênero contém flavonoides, isoflavonoides, alcaloides, triterpenoides, esteroides, derivados de ácidos graxos, dentre outros e apresentam diversas atividades biológicas tais como citotóxica, antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória e antioxidante (AMEN et al., 2015). Entre as espécies conhecidas, somente 15 foram estudadas fitoquimicamente (AMEN et al., 2015).

Machaerium acutifolium Vogel (sinonímia *M. muticum* Benth) apresenta ocorrência comum da Amazônia até São Paulo e Mato Grosso do Sul, principalmente na área de cerrado (LORENZI, 1998), porém é encontrada também na Bahia, Piauí e Maranhão (POLIDO; SARTORI, 2007). Esta espécie é conhecida popularmente por jacarandá do campo, jacarandá caroba e jacarandá bico de pato, sendo utilizada na medicina tradicional, pela população indígena do sudeste do Pará, como anticoncepcional, para tratar menstruação dolorosa e dor de estômago (BARBOSA; PINTO, 2003; POVH et al., 2007; ROSA et al., 2014). O estudo realizado por Ollis et al. (1978) com a madeira do tronco de *M. acutifolium* resultou no isolamento e identificação de (+)-medicarpina (pterocarpano) e dos fenólicos pinosilvina monometil éter e petroestireno.

Isoprenoides é uma classe de produtos naturais constituída por terpenoides e esteroides os quais têm em comum blocos de construção de 5 carbonos com esqueleto equivalente ao isopreno, denominados de difosfato de dimetilalila (DMAPP) e difosfato de isopentenila (IPP). Esta classe de metabólitos é amplamente distribuída em espécies vegetais, inclusive da família Fabaceae (DEWICK, 2009). Os esteroides atuam como constituintes da membrana celular vegetal, reforçando suas estruturas, e também como intermediários na biossíntese de outros metabólitos (EBRAHIMZADEH; NIKNAM; MAASSOUMI, 2001).

Os esteroides contêm um sistema de anel tetracíclico peridroiclopentanofenantreno e possuem de 27 a 29 carbonos em suas estruturas. São considerados triterpenoides modificados pela perda das metilas em C-4 e C-14, sendo biossintetizados por meio da rota do mevalonato (DEWICK, 2009). A biossíntese de esteroides em animais e fungos, bem como, em plantas e algas está ligada a um precursor comum, o óxido de esqualeno. Em animais e fungos, a ciclização do óxido de esqualeno gera o lanosterol que por sua vez conduz ao colesterol. Em plantas e fungos, a ciclização do óxido de esqualeno gera o cicloartenol com formação dos fitoesteróis, inclusive o colesterol (DIENER et al. 2000; SILVA et al., 2007; DEWICK, 2009). A Figura 1 mostra a sequência simplificada da rota de biossíntese dos esteroides.

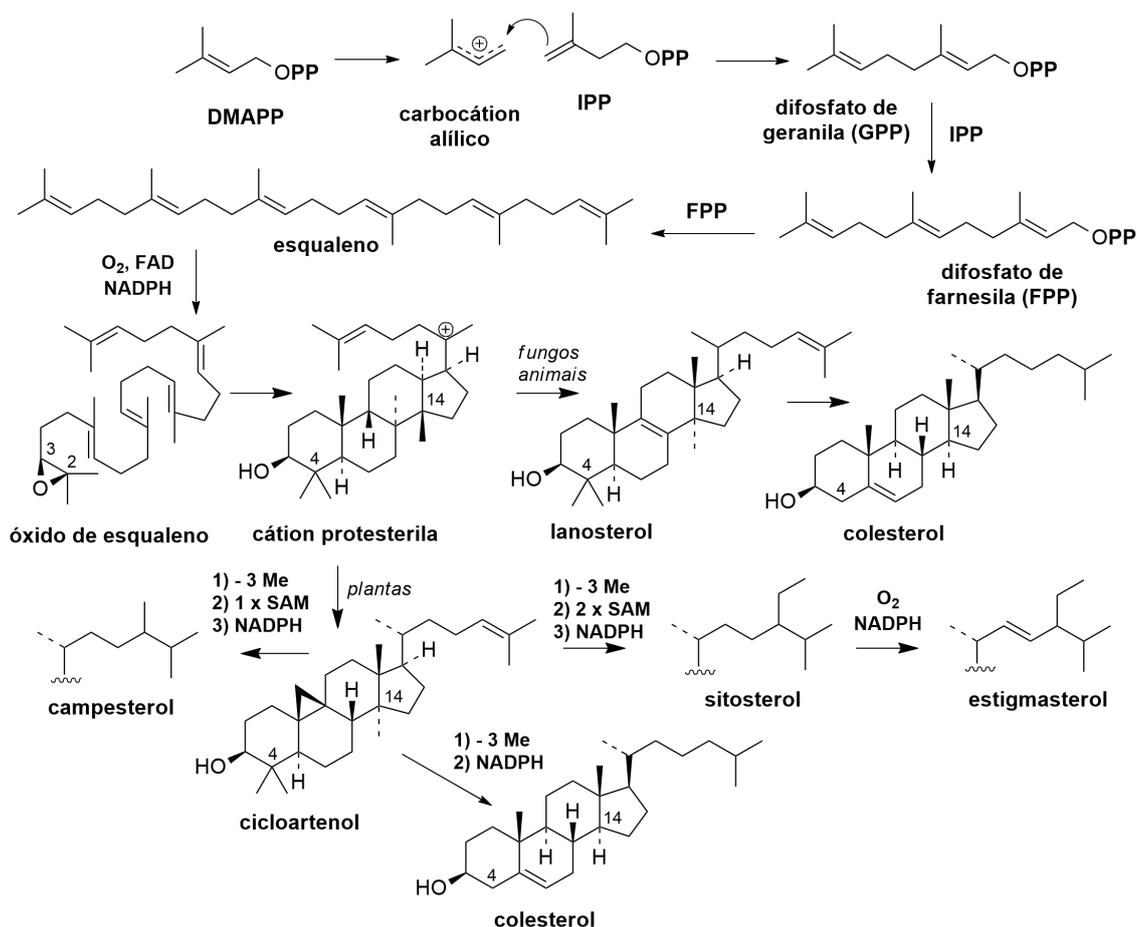


Figura 1. Rota biossintética dos esteroides. Adaptado de DEWICK, 2009.

Com o intuito de explorar o potencial químico de plantas do cerrado do Piauí e contribuir com o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Machaerium*, este estudo teve como objetivo realizar o isolamento por cromatografia e a identificação por CG-EM de constituintes químicos da fração hexânica das folhas de *M. acutifolium*.

2 | METODOLOGIA

As folhas de *M. acutifolium* foram coletadas em março de 2017, no município de Jatobá do Piauí, estado do Piauí, nas coordenadas S 04° 51' 006" e W 42° 05' 057", altitude 90 m. A espécie foi identificada pela bióloga Dra. Ruth Raquel Soares de Farias e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí – UFPI, com o número de registro TEPB 31568 e cadastro de acesso SisGen nº AAB530D.

O material vegetal foi seco, moído (1400 g) e submetido a extração por maceração exaustiva com etanol (95%). A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo e liofilizada, obtendo-se 74,7 g (5,3%) de extrato etanólico das folhas. Uma alíquota de 64 g do extrato foi suspensa em 1200 mL de MeOH/H₂O (1:2, v/v) e submetida a partição, resultando nas frações hexânica (FHFMa, 33,5 g, 52,3%), acetato de etila (FAEFMa, 5 g, 7,8%) e aquosa (FAFMa, 25,5 g, 39,8%).

FHFMa (10 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída

com hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade, fornecendo 102 frações, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas em 20 grupos.

O grupo FHF-32 (476,9 mg) foi submetido a cromatografia em Sephadex LH-20 com eluição em hexano/CH₂Cl₂ (1:4) fornecendo M1 (122,4 mg) constituída pelos compostos **1-5**. A cromatoplaça de M1, eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada a solução de sulfato cérico, apresentou uma mancha azul que mudava para roxo com a continuação do aquecimento. Este perfil em CCD é característico de compostos de natureza esteroideal (CHAVES, 1997).

M1 foi derivatizada com *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) de acordo com Prytyk et al. (2003). A uma alíquota de 1,0 mg da amostra foi adicionado 250 µL de piridina tratada e 50 µL de BSTFA. A mistura reacional foi aquecida por 1 hora a 55 °C. Após o término da reação, adicionou-se 1,0 mL de AcOEt e a fase orgânica com os derivados sililados foi analisada em cromatógrafo GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da Shimadzu, coluna SLB-5MS (30 m×0,25 mmx 0,10 µm), fase estacionária difenildimetilpolissiloxano (5% de difenil e 95% de dimetilpolissiloxano) e hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). O detector de massas operou com ionização por elétrons (EI) 70 eV, modo *scan* no intervalo de *m/z* 50 a 600 Da (Daltons). Para análise foi usada a seguinte programação: temperatura inicial de 71 °C por 2 min, com taxa de aquecimento de 6 °C min⁻¹ até 315 °C, mantido por 30 min. As temperaturas do injetor e interface foram 290 °C e 310 °C, respectivamente. A identificação dos constituintes foi realizada por comparação com dados da literatura (DIEKMAN; DJERASSI, 1967).

M1 foi ainda analisada sem derivatização em um sistema GC-MS 7890/MSD (Agilent Technologies) equipado com coluna capilar DB5 (J&W, 30 m x 320 µm x 0.25 µm) e amostrador automático. Injeção de 1 µL de amostra (5 mg/mL em CH₂Cl₂) no modo split 1:40 e temperatura do injetor a 250 °C. O gás de arraste foi hélio com fluxo constante de 1 mL min⁻¹. A programação de temperatura da coluna foi temperatura inicial de 200 °C permanecendo por 4 min, taxa de aquecimento de 6 °C min⁻¹ até 290 °C permanecendo por 15 min. O tempo total de corrida foi de 34 min. A temperatura da interface foi de 280 °C. O espectrômetro de massas no modo varredura (Scan) com energia de 70 eV e faixa de massas de 50 a 500 Da. A identificação dos constituintes químicos foi realizada por comparação do tempo de retenção e espectros de massas da literatura e biblioteca computacional (NIST08) (ASSIMOPOULOU; PAPAGEOORGIOU, 2005; WYLLE, 1977).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico da fração hexânica obtida da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium* resultou isolamento de uma mistura (M1) constituída pelos compostos **1-5**, sendo **1-4** esteroides e **5** um triterpenoide pentacíclico de esqueleto lupano (Figura 2). A identificação estrutural destes compostos foi realizada

por meio da análise em CG-EM de M1 com e sem derivatização.

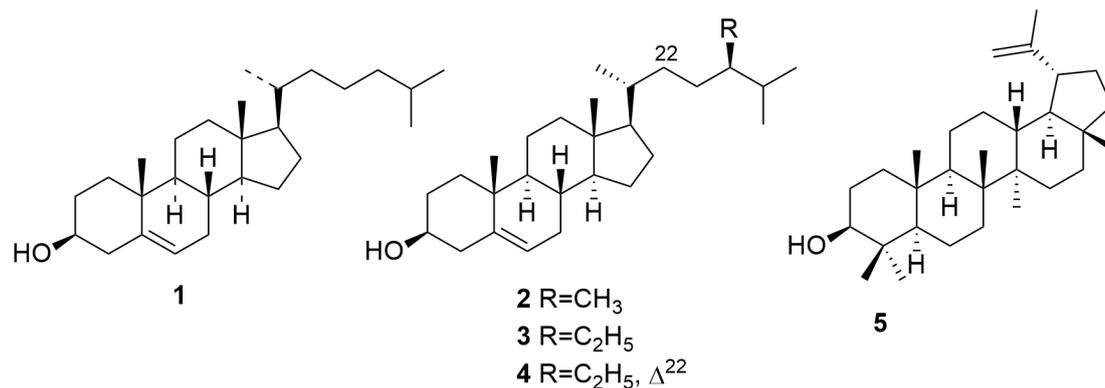


Figura 2. Fórmulas estruturais dos compostos identificados na fração hexânica das folhas de *M. acutifolium*.

M1 foi submetida a uma reação com o reagente sililante BSTFA fornecendo os derivados sililados pela substituição do hidrogênio da hidroxila por TMS. Nesta reação os sítios próticos dos compostos a serem derivatizados são bloqueados, havendo uma redução de interações dipolo-dipolo, elevando a volatilidade dos compostos, permitindo assim a análise por CG-EM (PESSOA et al., 2012) (Figura 3).

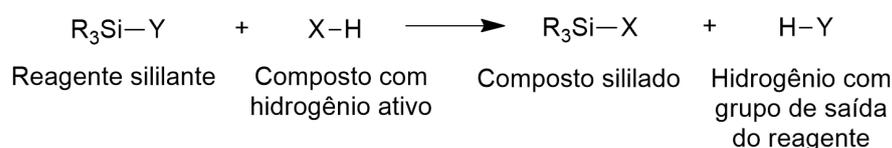


Figura 3. Representação genérica da reação de sililação com TMS.

O cromatograma de íons totais de M1 derivatizada (M1-d) apresentou quatro bandas (Figura 4). A comparação dos espectros de massas correspondentes com os relatados na literatura, permitiu identificar quatro esteroides: colesterol (1), campesterol (2), sitosterol (3) e estigmasterol (4). O constituinte com maior abundância relativa é o estigmasterol com 90,13% (Tabela 1).

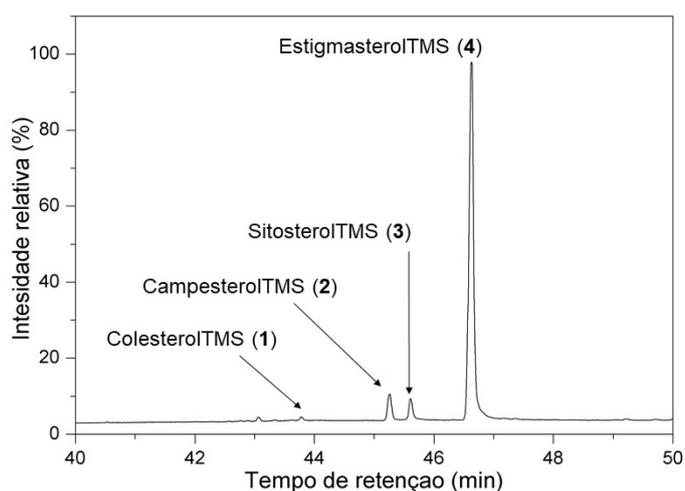


Figura 4. Cromatograma de íons totais dos derivados sililados de M1-d.

Composto	T _R (min)	Área (%)	M ⁺⁺	[M-G] ⁺⁺			
				CH ₃	TMSOH	TMSO-C ₃ H ₄	R
ColesterolTMS (1)	43,785	0,60	458	443	368	329	345
CampesterolTMS (2)	45,260	5,50	472	457	382	343	345
SitosterolTMS (3)	45,610	3,77	486	371	396	357	345
EstigmasterolTMS (4)	46,630	90,13	484	469	394	355	345

Tabela 1. Compostos identificados como derivados sililados em M1-d por CG-EM. G: CH₃, TMSOH, TMSO-C₃H₄, cadeia lateral (R)

Os espectros de massas dos compostos identificados em M1-d apresentam picos de íons moleculares acrescidos de 73 Da, referente a massa do TMS. Os picos m/z [M-15]⁺, [M-90]⁺, [M-129]⁺ e 345 são característicos de esteroides sililados com TMS e correspondem a perda de grupos metila (CH₃), trimetilsilanol (TMSOH), propeniltrimetilsilil (TMS-C₃H₄) e da cadeia lateral respectivamente, enquanto o fragmento m/z 129 é característico da fragmentação no anel A, conforme Figura 5 (DIEKMAN; DJERASSI, 1967).

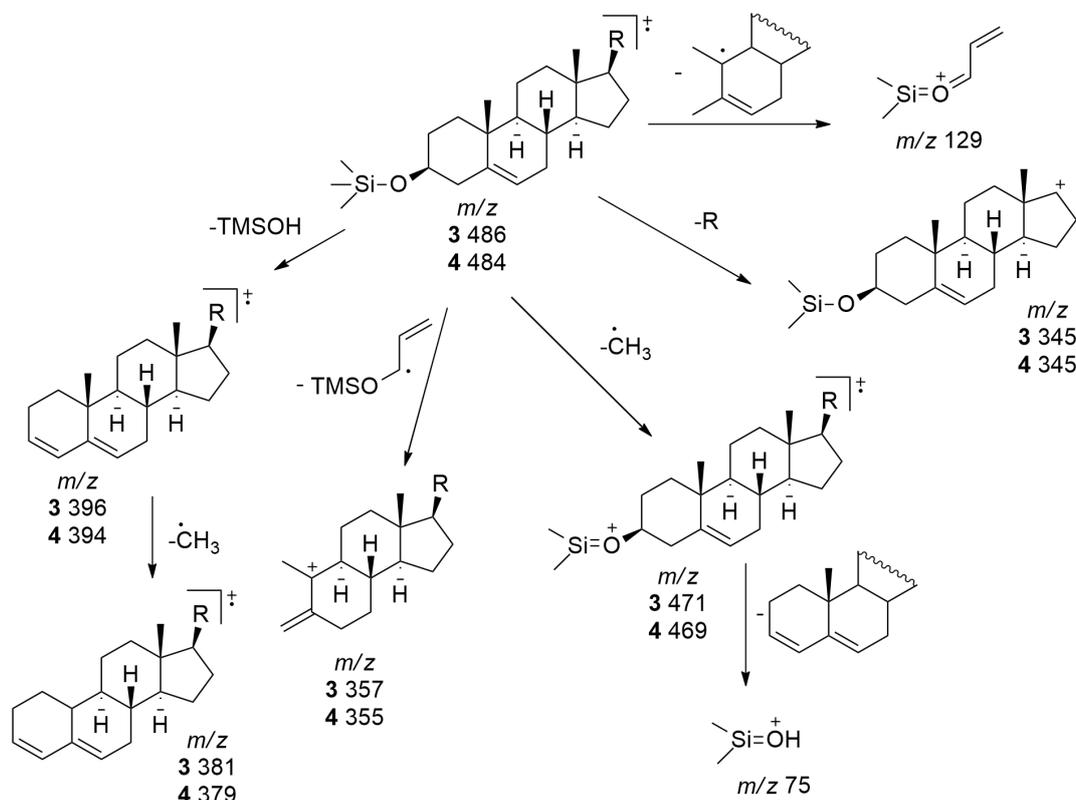


Figura 5. Proposta de fragmentação de esteroides siliados sitosterolTMS (3) e estigmasterol (4). Adaptado de Diekman; Djerassi, 1967.

M1 também foi analisada por CG-EM sem derivatização. O cromatograma de íons totais apresentou quatro bandas (Figura 6), sendo possível identificar, por comparação dos espectros de massas correspondentes com os relatados na literatura e com os da biblioteca do aparelho (NIST08), os esteroides **2-4**, previamente identificadas na amostra derivatizada e o triterpenoide lupeol (**5**) que ainda não havia sido identificado na análise anterior. Os tempos de retenção e área percentual das bandas cromatográficas de M1, sem derivatização, são apresentadas na Tabela 2.

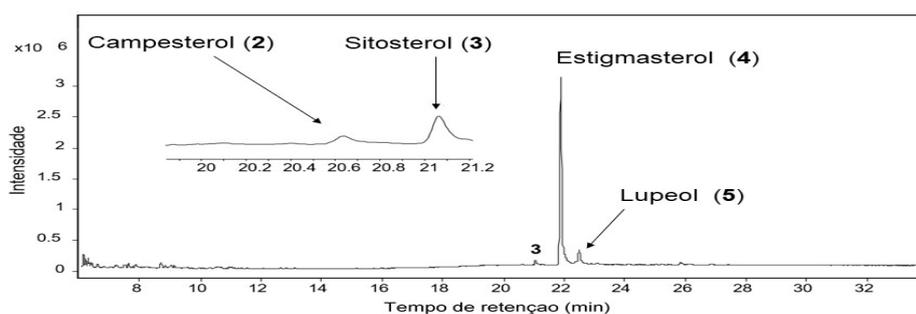


Figura 6. Cromatograma de íons totais de M1 sem derivatização.

Compostos	T _R (min)	Área (%)	Mach (NIST)	M ⁺	m/z
campesterol (2)	20,6	0,95	606	400	382, 367, 273, 255 e 145
sitosterol (3)	21,9	91,38	919	414	396, 381, 273, 255 e 145
estigmasterol (4)	21,1	1,83	766	412	394, 379, 273, 255 e 145
lupeol (5)	22,5	5,84	713	426	207, 218, 203, 191 e 189

Tabela 2. Compostos identificados em M1 sem derivatização por CG-EM.

Os esteroides possuem padrão de fragmentação semelhante, caracterizado pelas perdas consecutivas de água e metila, bem como da cadeia lateral seguida da perda de água e clivagem do anel C por Retro Diel-Alder, conforme Figura 7 (WYLLE, 1977). A presença do lupeol (5) é sugerida pelos fragmentos m/z 207, 203 e 189, característicos de triterpenoides de esqueleto lupano, conforme mostrada na Figura 8 (ASSIMOPOULOU; PAPAGEOORGIOU, 2005).

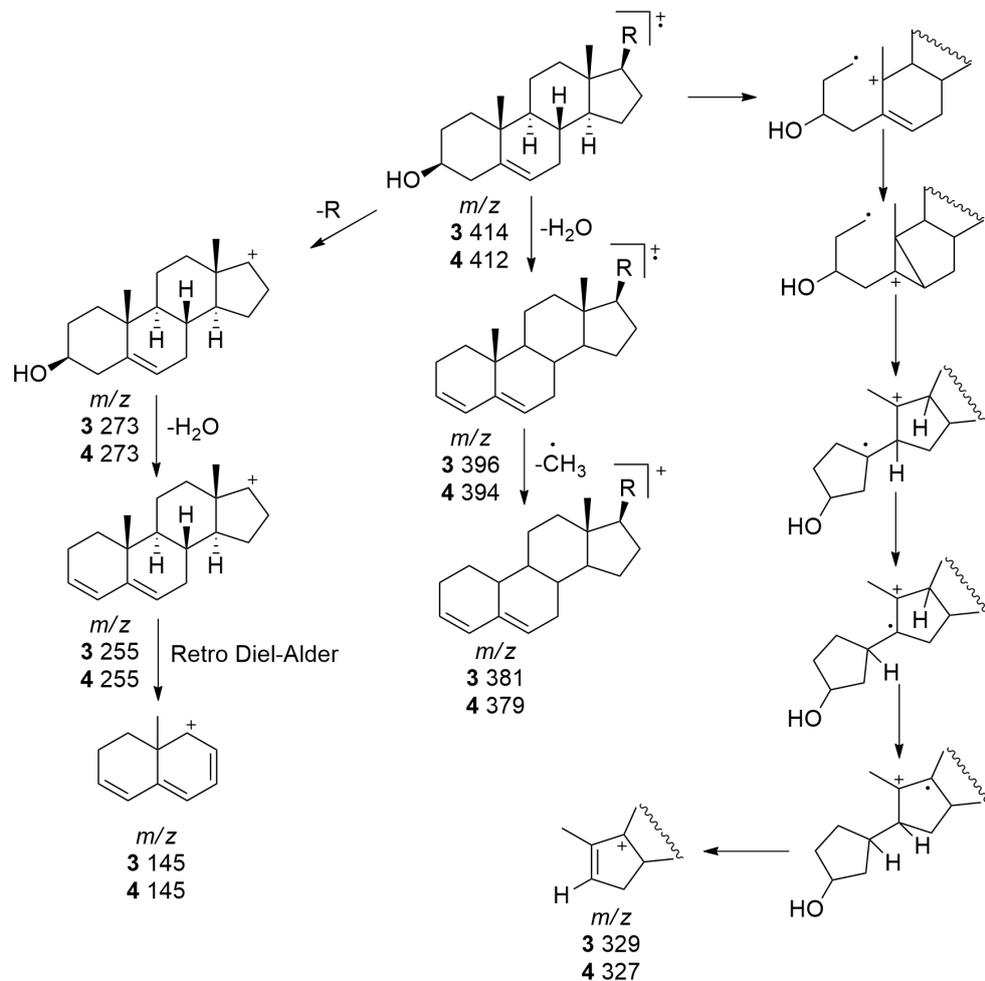


Figura 7. Proposta de fragmentação de esteroides sitosterol (3) e estigmasterol (4). Adaptado de Wylle, 1977.

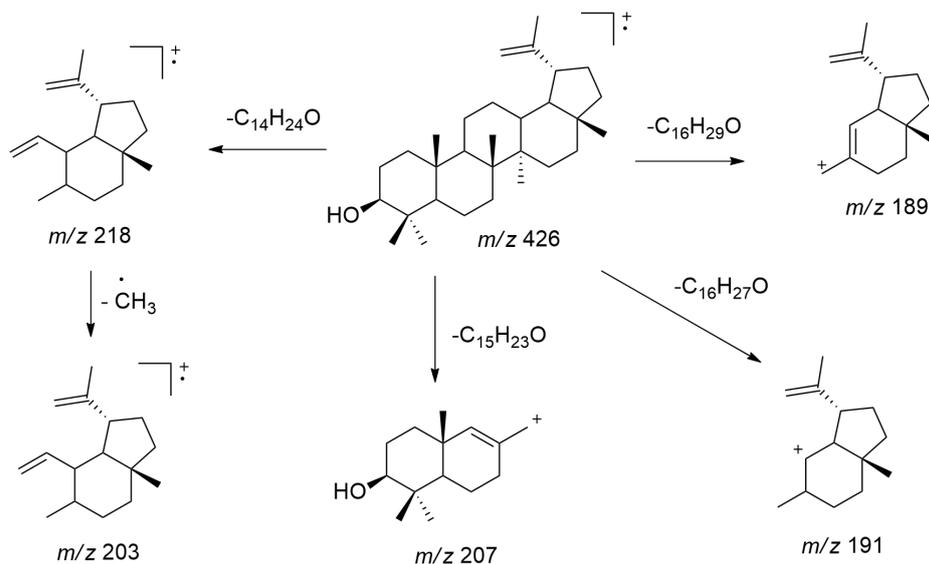


Figura 8. Proposta de fragmentação para o lupeol (5). Adaptado de Assimopoulou; Papageorgiou, 2005.

A análise por CG-EM de M1 antes e depois da reação de siliilação com BSTFA mostrou-se complementar, permitindo identificar um número maior de compostos.

O esteroide sitosterol e o triterpenoide lupeol já haviam sido identificados no

gênero *Machaerium*, enquanto colesterol, campesterol e estigmasterol estão sendo relatados pela primeira vez neste gênero (AMEN et al., 2015).

4 | CONCLUSÃO

O estudo da fração hexânica das folhas de *M. acutifolium* por cromatografia gasosa hifenada com espectrometria de massas permitiu a identificação de quatro esteroides: colesterol (1), campesterol (2), sitosterol (3) e estigmasterol (4) e um triterpenoide: lupeol (5). Este é o primeiro relato dos compostos colesterol, campesterol, e estigmasterol no gênero *Machaerium*.

5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e INCTBioNat (465637/2014-0) pelo apoio financeiro e pelas bolsas de J. S. Freitas, L. R. Santos e M. H. Chaves (302470/2018-2).

REFERÊNCIAS

AMEN, Y. M. et al. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Egypt**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.

ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia species*. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p 285–311, 2005.

BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 47-49, 2003.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "Química orgânica". **Química Nova**, v. 20, n.5, p. 560-562, 1997.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2009, 539 p.

DIEKMAN, J.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. **Journal Organic Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 1005-1012, 1967.

DIENER, A. C. et al. Sterol methyltransferase 1 Controls the Level of Cholesterol in Plants. **The Plant Cell**, v. 12, p. 853-870, 2000.

EBRAHIMZADEH, H.; NIKNAM, V.; MAASSOUMI, A. A. The sterols of *Astragalus* species from Iran: GLC separation and quantification. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 4, p. 393-404, 2001.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. **Legumes of the World**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577p.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998, 2v.

OLLIS, W. D. et al. Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*, **Phytochemistry**, v. 17, p. 1379-1381, 1978.

PESSOA, G. P. et al. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012

POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) no pantanal brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007.

POVH, J. A.; PINTO, D. D.; CORRÊA, M. O. G.; ONO, E. O. Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 447-449, 2007.

PRYTZYK, E. et al. Flavonoids and trypanocidal activity of *Bulgarian propolis*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 88, p.189-193, 2003.

SILVA, H. R. et al. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

WYLLIE, S. G. Electron Impact Induced Fragmentation of Cholesterol and Related C-5 Unsaturated Steroids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 4, 1977.

MUDANÇAS NA MORFOLOGIA DOS SILICOFITÓLITOS DE ACORDO COM A SENESCÊNCIA DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Brachiaria decumbens* WILD

Data de aceite: 06/02/2020

Data de submissão: 17/11/2019

Heloisa Helena Gomes Coe

Faculdade de Formação de Professores da UERJ,
Departamento de Geografia
São Gonçalo - RJ

Raphaella Rodrigues Dias

Programa de Pós-graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra, Departamento de Geologia,
Universidade Federal Fluminense
Niterói – RJ

Giliane Gessica Rasbold

Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá
Maringá – PR

Sarah Domingues Fricks Ricardo

Programa de Pós-graduação em Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ

Igo Fernando Lepsch

Departamento de Solos da ESALQ, Universidade de São Paulo
Piracicaba - SP

RESUMO: Fitólitos são biomineralizações da sílica amorfa, formadas pela absorção

radicular do ácido silícico da solução do solo. Essas partículas aumentam a proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos. A morfologia dos fitólitos e sua posição em *Brachiaria decumbens* foi caracterizada e descrita. Amostras de raiz, caule, folhas de várias idades e sementes foram coletadas em Montes Claros, Minas Gerais, e técnicas específicas foram aplicadas para extração de fitólitos e observação microscópica. Feixes vasculares de diferentes tamanhos dispostos ao longo do mesófilo da planta foram verificados. Apêndices como tricomas, que são possivelmente estruturas de proteção, e sinuosidade das células epidérmicas foram identificados como fornecendo adaptação mecânica adicional à entrada e saída de água. A planta apresentou fitólitos típicos de gramíneas, tanto de células curtas (*bilobate*, *polylobate* e *rondele*) quanto de células longas (*elongate echinate*), bem como estômatos silicificados. Não foram observadas células bulliformes e tricomas silicificados. Cada parte da planta possui o mesmo padrão de produção de fitólitos, sem variação significativa nos morfotipos e em suas proporções, diferindo apenas na quantidade, que é maior nas folhas mais velhas. As formas dos fitólitos apresentaram diferenças sutis, provavelmente devido ao tempo de deposição de sílica nas células.

PALAVRAS-CHAVE: *Brachiaria decumbens*;

Panicoideae; morfologia da planta; fitólitos; folhas senescentes.

CHANGES IN MORPHOLOGY OF PHYTOLITHS ACCORDING TO LEAF SENESCENCE IN THE LEAVES OF BRACHIARIA DECUMBENS WILD

ABSTRACT: Phytoliths are biomineralizations of amorphous silica, formed through root absorption of silicic acid from the soil solution. These particles increase plant protection against biotic and abiotic stresses. The morphology of the phytoliths and their position in *Brachiaria decumbens* was characterized and described. Samples of root, stem, leaves of various ages and seeds were collected in Montes Claros, Minas Gerais and specific techniques were applied for phytolith extraction and microscope observation. Vascular bundles of different sizes arranged throughout the mesophyll of the plant were verified. Appendices such as trichomes, which are possibly protective structures, and sinuosity of the epidermal cells were identified as providing additional mechanical adaptation to water input and output. The plant presented typical grass phytoliths, both short-cell (bilobate, polylobate and rondel) and long-cell elongate echinate morphotypes, as well as silicified stomatal complex cells. Silicified bulliform cells and silicified trichomes were not observed. Each part of the plant has the same pattern of phytolith production, without significant variation in morphotypes and their proportions, differing only in quantity, which is higher in older leaves. Phytolith shapes presented subtle differences, probably due to silica deposition time in the cells.

KEYWORDS: *Brachiaria decumbens*; Panicoideae; plant morphology; phytoliths; senescent leaves.

1 | INTRODUÇÃO

Fitólitos são partículas microscópicas (<60-100 µm), de opala biogênica (SiO₂.nH₂O) formadas através da polimerização do ácido silícico e subsequente precipitação da sílica amorfa dentro ou entre as células das plantas vivas (Piperno, 1988). Essas partículas são resultado de um processo de biomineralização, pelo qual as células dos tecidos vegetais servem como uma estrutura ou molde, no qual se precipitam íons e moléculas (Coe et al., 2014). Os fitólitos são bons *proxies* para a análise de ambientes passados, pois são bem preservados em condições oxidantes e permitem inferir condições ambientais como densidade arbórea, estresse hídrico e aridez (Coe et al., 2014).

As plantas absorvem ácido monossilícico [Si(OH)₄] pelas raízes, passando pelo xilema, preferencialmente em ambientes onde o pH do solo está entre 2 e 9. De acordo com Coe et al. (2014), à medida que a planta realiza evapotranspiração, sua pressão interna se torna cada vez mais negativa em relação ao meio ambiente, aumentando a absorção de água do solo (ativa ou passiva) pelas raízes.

A produção de fitólitos é influenciada por características genéticas e fenológicas,

estando o grau de produção e desenvolvimento de fitólitos relacionado às condições climáticas, natureza e teor de água do solo, idade e parte da planta e, mais significativamente, disponibilidade de sílica para a planta. (Coe et al., 2014); membros da família Poaceae, por exemplo, têm uma produção muito alta de fitólitos.

A senescência também desempenha um papel importante na deposição de sílica, especialmente nas folhas, pois as partes mais antigas da planta têm um teor significativamente maior do que as mais jovens (Blackman, 1968, 1969; Lanning e Eleuterius, 1985; Wyttenbach et al., 1991; Hodson et al., 1996; Hodson e Sangster, 1998). Por exemplo, o teor de sílica nas folhas de Bambusoideae (Poaceae) senescente pode atingir cinco vezes o das folhas jovens (Motomura et al., 2004). Quanto mais velha a folha, mais água é consumida, mais Si(OH)_4 é absorvido e mais fitólitos são formados. Essas células silicificadas aumentam a proteção da folha contra herbívoros, tornando as folhas mais velhas menos palatáveis do que as mais jovens, como é comumente observado em pastagens.

O gênero *Brachiaria*, cujo nome faz uma alusão aos seus racemos armados, é uma gramínea perene ou anual; ereta ou decumbente; entouceirada, rizomatosa, com enraizamento nos nós inferiores em contato com o solo, denso pubescente, de coloração geralmente verde-escura, de 30 a 90 centímetros de altura. Suas espiguetas são solitárias, raramente aos pares, subsésseis, organizadas em duas linhas; as lemas férteis possuem arestas reduzidas e tombadas (Hitchcock, 1935; Lorenzi, 2000).

Brachiaria decumbens Stapf. é uma gramínea forrageira utilizada na alimentação de animais em várias regiões brasileiras, possuindo adaptação em solos ácidos com baixa fertilidade (Santos e Monteiro, 1999). A morfologia de *B. decumbens* é bem variável, mesmo entre as suas variedades cultivadas. Em geral, os colmos de *B. decumbens* são geniculados, ramificados, hirtusos ou glabros, sendo os nós sempre glabros e de coloração mais escura. Entrenós inferiores curtos e entrenós superiores mais longos. No sistema basal ocorrem dois tipos de rizomas (1) curtos, duros e nodosos e (2) alongados, também duros, de tipo estolonífero (Nicolau et al., 2010).

As folhas são em bainhas estriadas, mais compridas que os entrenós, envolvendo completamente o colmo. Possui lígulas em forma de densa cortina de cílios com cerca de 1 mm de altura. As lâminas são lanceoladas ou linear-lanceoladas, de base arredondada e ápice acuminado, com até 18 cm de comprimento por 1,5 cm de largura; hirtusas em ambas as faces; margens espessas, finamente crenuladas em certos trechos (Nicolau et al., 2010).

Este estudo tem como objetivo caracterizar e descrever os fitólitos presentes na *Brachiaria decumbens* Stapf (subfamília Panicoideae), sua morfologia e posição nas diferentes partes da planta, contribuindo para a compreensão do desenvolvimento morfológico dos fitólitos de acordo com a idade da planta. A espécie foi selecionada devido a sua importância econômica e ecológica, seu rápido crescimento e alta produção de fitólitos.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de folhas, sementes, raízes e caules de *Brachiaria decumbens* foram coletadas para análise na fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrícolas da Universidade Federal de Minas Gerais (Montes Claros, MG) no mês de setembro de 2014. As folhas foram classificadas de acordo com faixa etária relativa, desde a mais recente, recém-formada (F-0), até a mais adulta, já senescente (F-9), na base das hastes (Figura 1), a fim de observar variações no processo de silicificação foliar. Os demais órgãos coletados foram analisados para investigar se a produção de fitólitos difere da das folhas ou segue o mesmo padrão de silicificação.

Primeiramente, foram coletadas 20 folhas para cada idade, de acordo com a posição, para medição e cálculo do comprimento médio. Posteriormente, folhas, raízes, sementes e caules foram lavados com solução de hexametáfosfato de sódio e água destilada e seca em estufa a 65°C, para limpar as amostras, removendo vestígios de solo, poeira e outros contaminantes para impedir a proliferação de fungos e bactérias.

Extração de fitólitos por via seca: As amostras foram tratadas no laboratório do Instituto de Ciências Agrícolas da Universidade Federal de Minas Gerais (Montes Claros, MG). A extração dos fitólitos foi realizada por calcinação, conforme metodologia de Parr (2001). Três gramas de material vegetal seco foram pesados, lavados com água destilada, transferidos para cadinhos de porcelana e aquecidos em um forno a 550°C por 12 h. Após o resfriamento, o conteúdo foi transferido para os tubos Falcon, foram adicionados 10 mL de HCl a 10% e aquecidos em banho-maria a 70°C por 20 minutos, ou até a reação parar (após centrifugação, este passo foi repetido duas vezes). Posteriormente, 10 mL de H₂O₂ a 15% foram adicionados e aquecidos em banho-maria a 70°C por 20 minutos, ou até a reação parar (após centrifugação, este passo foi repetido duas vezes). Em seguida, 1 mL de álcool a 70% foi adicionado e as amostras secas em uma câmara de aquecimento a 65°C. O material seco foi pesado e transferido para microtubos rotulados.

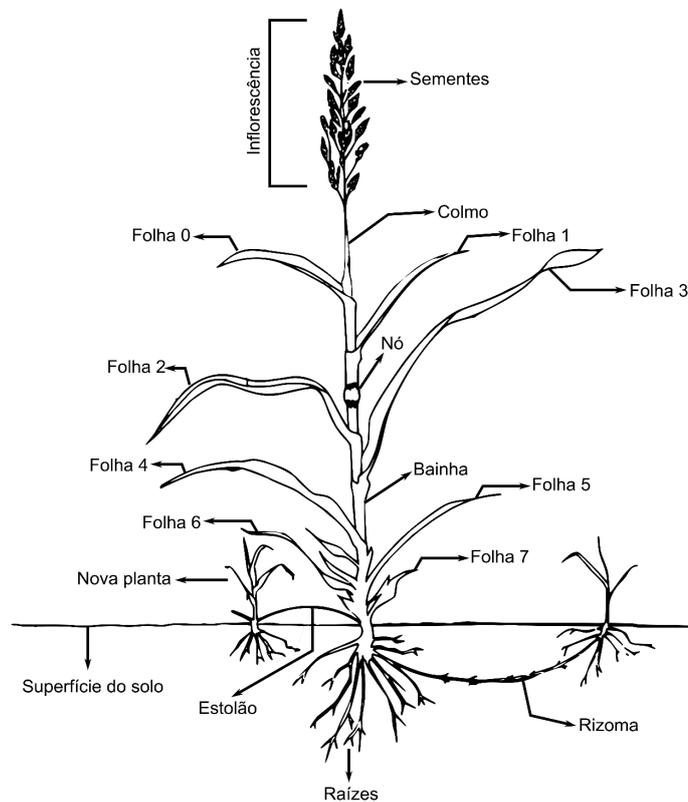


Figura 1: Esquema representado as principais partes da gramínea estudada (destaque para exemplo da posição das folhas de acordo com a idade). Fonte: adaptado de Dias et al., 2019.

Extração de fitólitos por via úmida: As amostras foram tratadas no laboratório de Geografia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (São Gonçalo, RJ). Porções do tecido vegetal foram separadas das amostras de folhas (F-0 a F-5), raízes, sementes e caules (3g de cada). O tratamento químico seguiu Medeanic et al. (2008), utilizando 20 mL de uma solução de ácido nítrico a 65% (HNO_3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), na proporção de 1 parte de ácido nítrico para 4 partes de ácido sulfúrico. O material foi aquecido por três horas a 250 °C em frascos de Erlenmeyer e, após o resfriamento, foram adicionados 10 ml de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As amostras foram transferidas para tubos Falcon e lavadas com água destilada até atingir o pH neutro.

Clarificação do tecido vegetal: As amostras de folhas (F-0 a F-9) foram clarificadas com hipoclorito de sódio. Uma ou duas folhas foram colocadas em uma placa de Petri e hipoclorito de sódio foi adicionado até cobrir as folhas. Após o clareamento, as folhas foram lavadas em água destilada e colocadas em lâmina com auxílio de pinça, mantendo a estrutura o mais intacta possível. As superfícies abaxial e adaxial de cada folha foram analisadas.

Microscopia: Todo o material obtido nas etapas descritas acima foi colocado em lâminas para microscópio óptico. Foi utilizado óleo de cravo para lâminas temporárias e Entellan® para as permanentes. As lâminas foram observadas, usando ampliação de 630x, sob um microscópio óptico de polarização Zeiss Axio Scope A1 do Laboratório de Microscopia Ótica e Morfoscopia UERJ/FFP (LAMOM). A quantificação e classificação

dos fitólitos foram realizadas registrando todos os morfotipos encontrados, até atingir pelo menos 200 fitólitos classificáveis. As fotografias foram tiradas usando o software Axiovision. Todas as lâminas estão depositadas no LAMOM. Os fitólitos foram classificados de acordo com Twiss (1969, 1992), Mulholland (1989), Fredlund e Tieszen (1994), Kondo et al. (1994), Alexandre et al. (1997); Strömberg (2004), Mercader et al. (2009) e nomeados de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura dos Fitólitos 1.0 (Madella et al., 2005).

Análises estatísticas: Foi realizada uma análise de regressão linear para a porcentagem de fitólitos em relação à idade das folhas da *Brachiaria decumbens*, a fim de verificar a presença de uma relação linear positiva entre as variáveis de acúmulo de fitólitos e a idade da folha. Para testar se existe uma relação entre as dimensões do fitólito e a idade das folhas, foi escolhida a morfologia predominante do fitólito (*bilobate*) para as folhas (ocorrência > 35%). A haste e o comprimento das morfologias foram medidos (n = 15). Essa medida resultou em um teste Anova One-Way calculado no software Bioestat® para determinar se a variabilidade desses fitólitos em relação à idade das folhas seria estatisticamente significativa. A hipótese nula foi de que não há diferença significativa na faixa de tamanho dos fitólitos *bilobate*, tanto na haste quanto no comprimento, para as idades das folhas.

3 | RESULTADOS

Quantificação dos fitólitos

As folhas mais velhas apresentam maior quantidade de fitólitos que as folhas mais jovens. As sementes têm menos conteúdo de fitólitos do que outros órgãos (Tabela 1). O acúmulo de Si (Tabela 1) começa quando a folha ainda está enrolada no estágio mais jovem (F0), com a massa de fitólitos aumentando rápida e progressivamente à medida que a folha se expande (até F6). O conteúdo de fitólitos continua a aumentar mesmo após o estágio de senescência (F7 a F9).

Parte da planta	Comprimento médio da folha (cm)	Desvio padrão	Fitólitos por via seca (%)
Raíz	-	-	3,3
Colmo	-	-	2,7
Semente	-	-	1,7
Folha 0	10,2	0,26	0,48
Folha 1	12,5	0,33	0,66
Folha 2	15,0	0,24	0,91
Folha 3	17,8	0,31	1,25
Folha 4	24,0	0,27	1,95
Folha 5	27,3	0,22	2,71
Folha 6	32,0	0,35	3,03
Folha 7	27,2	0,29	3,18
Folha 8	13,1	0,25	3,45
Folha 9	9,0	0,28	3,57

Tabela 1: Valores médios de comprimento das folhas e concentração de fitólitos em *Brachiaria decumbens*

A análise de regressão linear (Figura 2) mostra uma alta correlação ($r^2 > 0,95$) entre a idade relativa das folhas e a quantidade de fitólitos.

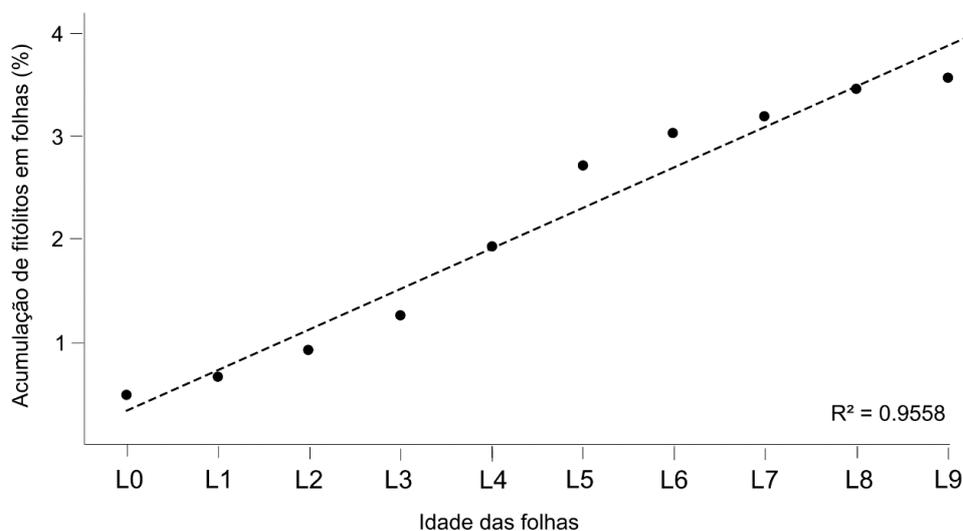


Fig. 2: Análise de regressão linear da porcentagem de fitólitos em relação à idade foliar em *Brachiaria decumbens*. Fonte: adaptado de Dias et al., 2019

Tipos de fitólitos

Folhas

Os seguintes tipos de silicificação foram encontrados em todas as folhas: *bilobate*, *polylobate*, *cross*, *elongate echinate both sides*, *elongate echinate one side*, *elongate psilate* e estômatos silicificados”. *Bilobate* foi o morfotipo de fitólito predominante nas folhas, com mais de 39% de ocorrência em todas as diferentes idades foliares, especialmente em F0, onde corresponde a mais de 63% entre todos os morfotipos. Os

fitólitos de células curtas (*bilobate* e *cross*) são os mais predominantes em todas as idades foliares, com mais de 55% de ocorrência. Entretanto, a assembleia fitolítica foi composta pelos mesmos morfotipos em todas as folhas e as proporções relativas de cada uma delas foram bastante semelhantes (Tabela 2, Figuras 3 e 4).

	<i>Bilobate</i>	<i>Cross</i>	<i>Polylobate</i>	<i>E. echinate</i>	<i>E. psilate</i>	Estômato
Folha 0	63,0	27,0	4,4	3,5	1,5	0,6
Folha 1	50,0	27,2	3,3	12,1	6,7	0,8
Folha 2	38,9	33,8	5,0	15,9	5,0	1,5
Folha 3	47,4	16,5	3,0	16,5	15,3	1,2
Folha 4	44,6	10,8	4,6	28,2	11,3	0,5
Folha 5	47,5	13,7	4,7	24,0	7,8	2,2
Folha 6	53,7	10,6	0,4	30,4	2,8	2,1
Folha 7	48,7	13,3	0,9	28,6	7,0	1,5
Folha 8	43,4	13,7	0,8	33,6	7,4	1,1
Folha 9	45,9	8,7	1,4	35,6	3,1	5,3
Raízes	28,3	2,4	0,0	30,1	39,2	0,0
Sementes	25,4	27,0	0,0	22,8	12,7	12,2
Colmo	28,3	2,4	0,0	30,1	39,2	0,0

Tabela 2: Porcentagem dos morfotipos de fitólitos encontrados em folhas, raízes, colmo e sementes de *Brachiaria decumbens*

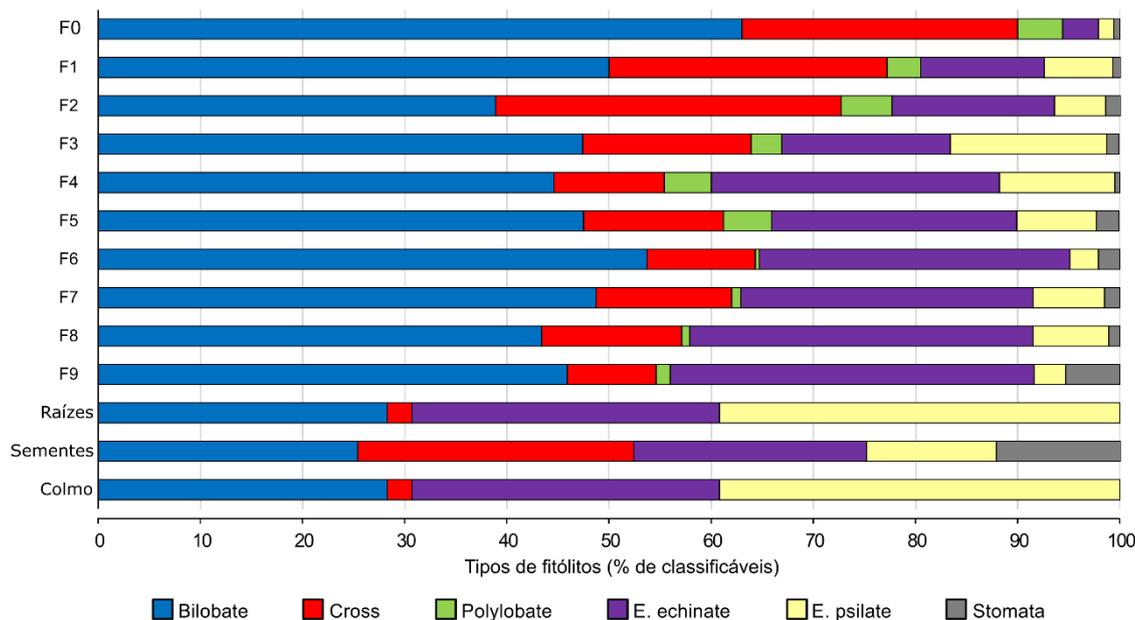


Fig. 3: Porcentagem de morfotipos de fitólitos encontrados nas folhas de diferentes idades, raízes, sementes e colmos de *Brachiaria decumbens*. Fonte: adaptado de Dias et al., 2019

Os complexos estomáticos são intercalados com os *bilobates*. O restante da epiderme foliar é preenchido por células longas silicificadas (Figura 4). Nas imagens de folhas clarificadas, foi possível observar as bordas, a organização dos fitólitos e os tricomas. Existem também numerosos tricomas na epiderme foliar e no colmo, embora

não sejam silicificados e estejam localizados nas aréolas entre as veias.



Fig. 4: Microfotografias dos morfotipos de fitólitos observados em *Brachiaria decumbens*: **A-J)** *bilobate short-cell*; **K-L)** *cross short-cell*; **M-N)** *polylobate*; **O-P)** *elongate long-cell*; **Q)** *elongate echinate*; **R)** estômato silicificado. Fonte: Dias et al., 2019

Os fitólitos *bilobate* estão localizados em toda a epiderme foliar, paralelos às veias. A idade das folhas parece afetar a morfologia dos fitólitos, com algumas silicificações incompletas e formas distorcidas nas folhas mais jovens, enquanto nas folhas senescentes os fitólitos já concluíram o processo de silicificação celular. No entanto, os resultados da análise de variância não foram significativos ($F = 0,888834534$ para comprimento e $F = 0,666279$ para haste), em um intervalo de confiança de $p > 0,05$ ($p = 0,536125$ ep = $0,738217$ para comprimento e haste, respectivamente). Isso indica que a hipótese nula que não previu diferença estatística significativa entre o tamanho dos fitólitos *bilobate* e a idade das folhas pode ser aceita (Tabelas 3, 4 e Figura 5).

Idade das folhas	Comprimento do <i>bilobate</i> (μm)					Haste do <i>bilobate</i> (μm)				
	Média	Min	Max	Desvio padrão	Var	Média	Min	Max	Desvio padrão	Var
Folha 0	14,1	6,3	25,9	5,0	24,6	7,3	2,8	13,7	2,7	7,5
Folha 1	12,3	9,9	18,1	2,3	5,3	6,3	2,8	9,7	2,5	6,1
Folha 2	14,1	7,7	21,2	4,4	19,4	6,8	1,4	15,0	3,9	15,3
Folha 3	13,9	9,8	21,1	3,0	8,9	6,4	4,3	9,4	1,6	2,5
Folha 4	13,8	5,7	21,8	4,3	18,2	6,6	2,5	13,8	3,1	9,8
Folha 5	15,6	7,6	28,0	4,9	24,0	8,3	4,3	15,4	3,6	12,9
Folha 6	15,3	7,9	30,1	5,4	29,4	7,3	2,0	11,8	2,7	7,3
Folha 7	14,4	8,9	25,2	4,1	16,5	7,6	1,7	1,6	3,5	12,3
Folha 8	15,7	11,4	25,0	3,9	15,4	7,0	1,9	10,3	2,6	7,0
Folha 9	14,7	9,6	17,8	2,6	7,0	6,6	5,1	9,1	1,2	1,4

Tabela 3: Estatística descritiva das medidas de comprimento e haste dos fitólitos *bilobate* de acordo com a idade da folha em *Brachiaria decumbens*

Comprimento do <i>bilobate</i>						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	135,010	6	15,0011	0,88983	0,53612	1,94734
Dentro dos grupos	2360,17	5	16,8583		5	8
Total	2495,18	6				

Haste do <i>bilobate</i>						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	49,2656	6	5,47396	0,66627	0,73821	1,94734
Dentro dos grupos	1150,20	1	8,21572		7	8
Total	1199,46	7				

Tabela 4: Resultados do One-Way ANOVA. SQ. Soma dos quadrados; GL. Graus de liberdade; MQ. Média quadrada (variância).

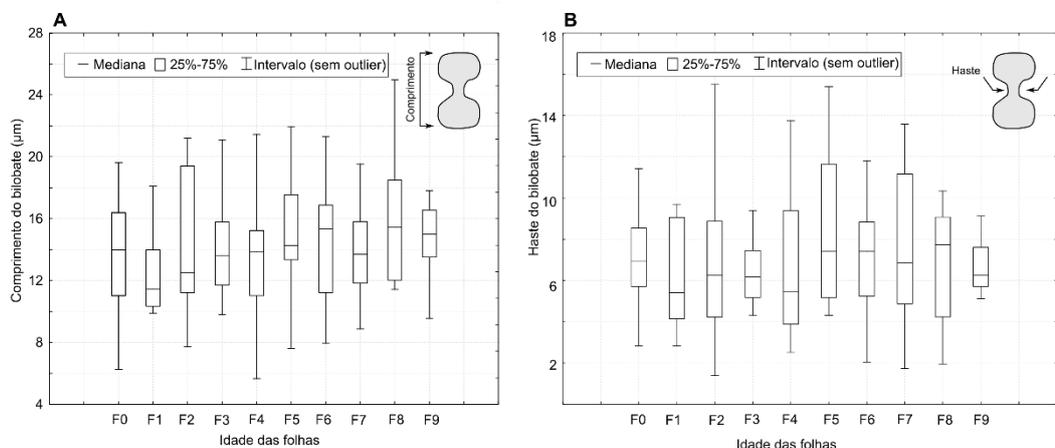


Fig. 5: Variações das dimensões dos *bilobate* encontradas nas folhas, separadas por idade em *Brachiaria decumbens*: A) Comprimento; B) Haste. Fonte: adaptado de Dias et al., 2019

Raízes

Nas raízes (Tabela 2 e Figura 3), fitólitos de células longas, como o *elongate echinate* e *psilate*, predominaram (quase 70% do total), embora também tenham sido observados os tipos *cross* e *bilobate*.

Sementes

Nas sementes (Tabela 2 e Figura 3), predominam os fitólitos de células curtas, como os tipos *cross* e *bilobate* (cerca de 52% do total), embora também tenham

sido observados tipos *elongate echinate* e *psilate*. Os fitólitos *elongate echinate* têm sinuosidade mais pronunciada e menor comprimento em comparação com os encontrados em outras partes da planta. Os fitólitos *bilobate* apresentaram formato arredondado e tamanho reduzido nas sementes. Muitos estômatos silicificados também foram encontrados, sendo estes também de tamanho reduzido.

Colmo

O colmo de *Brachiaria decumbens* é um alto produtor de fitólitos, semelhantes aos encontrados nas folhas (Tabela 2 e Figura 3), com predominância de fitólitos de células longas (quase 70%) e *bilobate* de células curtas (cerca de 28 %) Não há tricomas no colmo, pois eles são restritos à bainha das folhas.

4 | DISCUSSÃO

O acúmulo de Si aumenta progressivamente à medida que a idade das folhas avança e tem sido destacado como uma possível causa de menor palatabilidade, indicando possivelmente que a silicificação é uma defesa induzível contra herbívoros (McNaughton e Tarrants, 1983). Nas folhas de bambu chinês, o acúmulo de sílica continua mesmo após a expansão total das células da lâmina foliar (Motomura et al., 2008), o que é corroborado pelos resultados do presente estudo.

Embora exista uma relação positiva entre o aumento da acumulação de sílica com a idade das folhas ($r^2 > 0,95$) (Figura 2), não houve diferenças estatísticas significativas (análise de variância, $p > 0,05$) (Tabela 4) em relação ao tamanho dos fitólitos *bilobate* entre diferentes idades foliares. Isso sugere que, embora a planta acumule mais sílica, as dimensões do fitólito são fixas. O peso total do fitólito aumenta progressivamente com a idade das folhas.

Nossos resultados indicam que não há variação na frequência de um morfotipo fitólito específico entre as folhas; independentemente da idade das folhas, *Brachiaria decumbens* produz os mesmos morfotipos em todas as folhas em proporção semelhante (Tabela 2 e Figura 3). Resultados similares foram encontrados por Ponzi e Pizzolongo (2003) em *Triticum aestivum* cv. Ofanto.

A silicificação em Poaceae ocorre principalmente na epiderme. Nas folhas das gramíneas, esse fenômeno varia de uma espécie para outra, bem como dentro do mesmo indivíduo, de acordo com a idade e posição na folha. Essa variação também foi observada fora de Poaceae. Por exemplo, Wyttenbach et al. (1991), investigando quatro classes sucessivas de idade de folhas do abeto da Noruega (*Picea abies*), encontraram um aumento linear das concentrações de Si de acordo com a idade das mesmas.

De acordo com Wilding et al. (1977) e Prychid et al. (2003), a composição da sílica amorfa muda para uma forma cristalina à medida que envelhece. Vários fatores ecológicos, incluindo clima, variabilidade do solo, condições de umidade e idade da

planta, afetam o desenvolvimento do corpo silicoso, regulando as concentrações de sílica dissolvida disponíveis para as plantas (Piperno, 1988). Em muitas espécies, as folhas de plantas mais antigas contêm maiores quantidades de sílica do que suas contrapartes mais jovens, possivelmente devido a alterações celulares necessárias para obter sílica e a uma maior disponibilidade dos locais de deposição (Bezeau et al., 1966; Blackman, 1968, 1969; Lanning e Eleuterius, 1985). O conteúdo de sílica das plantas aumenta com o envelhecimento dos tecidos, onde pode atingir concentrações cinco vezes maiores do que nos tecidos jovens (Wytttenbach et al., 1991; Hodson et al., 1996; Hodson e Sangster, 1998; Carnelli et al., 2001).

5 | CONCLUSÃO

A produção de fitólitos em *Brachiaria decumbens* é abundante e há alta deposição de sílica em toda a planta. O teor de fitólitos aumenta proporcionalmente à idade das folhas. Outros órgãos vegetais (raiz, colmo e sementes) também exibem produção de fitólitos, variando pouco os morfotipos encontrados. Apesar do aumento da massa total de fitólitos ao longo do tempo, nenhuma diferença substancial foi encontrada na proporção de morfotipos produzidos ou no tamanho dos fitólitos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, A., MEUNIER J. D., LÉZINE, A. M., VINCENS, A., SCHWARTZ, D. Phytoliths: indicators of grassland dynamics during the late Holocene in intertropical Africa. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 136(1-4), p. 213-229, 1997.
- BALL, D. M., HOVELAND, C. S., LACEFIELD, G. D. **Southern forages**. Fourth ed. Lawrenceville, Georgia: International Plant Nutrition Institute (IPNI), 322p., 2007.
- BEZEAU, L. M., JOHNSTON, A., SMOLIAK, S. Silica and protein content of mixed prairie and fescue grassland vegetation and its relationship to the incidence of silica urolithiasis. **Canad. J. Pl. Sci.**, 46, p. 625–631, 1966.
- BLACKMAN, E. The Pattern the Sequence of Opaline Silica Deposition in Rye (*Secale cereale* L.). **Annals of Botany**, 32, p. 207-218, 1968.
- BLACKMAN, E. Observations on the Development of the Silica Cells of the Leaf Sheath of Wheat (*Triticum aestivum*). **Canadian Journal of Botany**, 32, p. 827-838, 1969.
- CARNELLI, A. L., MADELLA, M., J. THEURILLAT, J. P. Biogenic Silica Production in Selected Alpine Plant Species and Plant Communities. **Annals of Botany**, 87, p. 425-434, 2001.
- COE, H. H. G., OSTERRIETH, M., HONAINÉ, M. F. Phytoliths and their Applications. In: Coe, H.H. G.; Osterrieth, M. (ed.). **Synthesis of Some Phytolith Studies in South America (Brazil and Argentina)**. New York: Nova Science, p. 1– 26, 2014.
- DIAS, R. R., COE, H. H. G., LEPSCH, I. F., RICARDO, S. D. F., SILVA, L. M. V., ALVARENGA, A. C., RASBOLD, G. G. Morphological Variation of Phytoliths According to Leaf

- Senescence and Position in the Organs of *Brachiaria decumbens*. **FLORA**, v.151478, p.1-6, 2019.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, 50, p. 641–664, 1999.
- FREDLUND, G. G., TIESZEN, L. L. Modern phytolith assemblages from the North American Great Plains. **J. Biogeogr.**, 21, p. 321 – 335, 1994.
- HENRIET, C., DRAYE, X., OPPITZ, I., SWENNEN, R., DELVAUX, B. Effects, distribution and uptake of silicon in banana (*Musa* spp.) under controlled conditions. **Plant and Soil**, 287(1-2), 359–374, 2006.
- HITCHCOCK, A. S. **Manual of the grasses of the United States**. United States Department of Agriculture. Washington, D. C., USA, 1052 p., 1935.
- HODSON, M. J.; WILLIAMS, S. E.; SANGSTER, A. G. Silica deposition in the needles of the Gymnosperms. I. Chemical analysis and light microscopy. In: PINILLA, A., JUAN-TRESSERRAS, J., MACHADA, M. J., eds. **First European Meeting on Phytolith Research**. Madrid: Consejo Superior de Investigacion Cientificas, p. 158-159, 1996.
- HODSON, M.J.; SANGSTER, A.G. Mineral deposition in the needles of white spruce [*Picea glauca* (Moench.)]. **Annals of Botany**, 82, p. 375–385, 1998.
- KONDO, R., CHILDS, C., ATKINSON, I. **Opal Phytoliths of New Zealand**. Manaaki Whenua Press, 85 p., 1994.
- LANNING, F. C., ELEUTERIUS, L. N. Silica and Ash in Tissues of Some Plants Growing in the Coastal Area of Mississippi, USA. **Annals of Botany**, 56 (2), 157–172, 1985.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa, Brasil, 2880 p., 2000.
- MADELLA, M., ALEXANDRE, A., BALL, T. International Code for Phytolith Nomenclature 1.0. **Annals of Botany**, 96, p.253-260, 2005.
- McNAUGHTON, S. J., TARRANTS, J. L. Grass leaf silicification: natural selection for an inducible defense against herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 80, p. 790–791, 1983.
- MEDEANIC, S., CORDAZZO, C. V., CORRÊA, I. C. S., MIRLEAN, N. Os Fitólitos em Gramíneas de Dunas do Extremo Sul do Brasil: Variabilidade Morfológica e Importância nas Reconstruções Paleoambientais Costeiras. **Gravel** 6(2), p.1-14, 2008.
- MERCADER, J., BENNETT, T., ESSELMONT, C., SIMPSON, S., WALDE, D. Phytoliths in woody plants from the Miombo woodlands of Mozambique. **Annals of Botany**, 104, p.91–113, 2009.
- MOTOMURA, H., FUJII, T., SUSUKI, M. Silica deposition in relation to ageing of leaf tissues in *Sasa veichii* (Carriere) Rehder (Poaceae, Bambusoideae). **Annals of Botany**, 93, p.235–248, 2004.

- MOTOMURA, H., HIKOSAKA, K., SUZUKI, M. Relationships between Photosynthetic Activity and Silica Accumulation with Ages of Leaf in *Sasa veitchii* (Poaceae, Bambusoideae). **Annals of Botany**, 101, p.463–468, 2008.
- MULHOLLAND, S.C. Phytolith Shape Frequencies in North Dakota Grasses: a Comparison to General Patterns. **Journal of Archaeological Science**, 16, 489–511, 1989.
- NICOLAU, B. A. P., ALVARENGA, T. M., FONSECA e SILVA, F., SOARES JÚNIOR, F. J. Morfoanatomia foliar de *Brachiaria decumbens* Stapf, coletada na zona rural de Lavras, estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Científica UDO Agrícola**, 10(1), p.1-6, 2010.
- PARR, J. F., LENLFER, C. J., BOYD, W. E. A Comparative Analysis of Wet and Dry Ashing Techniques for the Extraction of Phytoliths from Plant Material. **Journal of Archaeological Science**, 28, p.875–886, 2001.
- PIPERNO, D. R. **Phytoliths Analysis: an archaeological and geological perspective**. San Diego: Academic Press, 1988.
- PONZI, R., PIZZOLONGO, P. Morphology and distribution of epidermal phytoliths in *Triticum aestivum* L. **Plant Biosystems**, 137 (1), p. 3-10., 2003.
- PRYCHID, C. J., RUDALL, P. J., GREGORY, M. Systematics and Biology of Silica Bodies in Monocotyledons. **The Botanical Review**, 69(4), p.377–440, 2003.
- SANTOS, A. R.; MONTEIRO, F. A. Produção e perfilhamento de *Brachiaria decumbens* Stapf. em função de doses de enxofre. **Scientia Agricola**, 56(3), 1999.
- SILVA, L. M. V., LEPSCH, I. F., SAMPAIO, R. A., ALVARENGA, A. C., RODRIGUES, M. N., MORÃO, R. P., RUAS, A. C. P., KORNDORFER, G. H. Quantidades de silício e de sílico-fitólitos presentes em diversas faixas etárias de folhas de *Brachiaria decumbens* Wild da região norte de Minas Gerais. **XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia**. Vitória, ES, 2014.
- STROMBERG, C. A. E. Using phytolith assemblages to reconstruct the origin and spread of grass-dominated habitats in the great plains of North America during the late Eocene to early Miocene. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 207, p.239-275, 2004.
- TWISS, C. Dust deposition and opal phytoliths in the Great Plains. **Transactions of the Nebraska Academy of Sciences**, XI, p.73–82, 1969.
- TWISS, C. Predicted world distribution of C3 and C4 grass phytoliths. In: G. RAPP, J., MULHOLLAND, S. C. (Ed.). **Phytolith Systematics**. New York: Plenum Press, 1992.
- WILDING, L. P., SMECK, N. E., DREES, L. R. Silica in soils: Quartz, cristobalite, tridymite and opal. In Minerals in soil environments. **Soil Science Society of America**, Madison, p.471–552, 1977.
- WYTTENBACH, A., TOBLER, L., BAJO, S. Silicon concentration in spruce needles. **Angewandte**, 16, p.253- 258, 1991.

ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRONELA (*CYMBOPOGON NARDUS L.*) RENDLE - (POACEAE): COMPOSIÇÃO, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA

Data de aceite: 06/02/2020

Stelina Timani Pinheiro

stelina.timani@gmail.com

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus
Uberaba / Minas Gerais.

Pedro Henrique Ferreira Tomé

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus
Uberaba / Minas Gerais.

Mônica Hitomi Okura

Universidade Federal do Triângulo
Mineiro – Campus
Uberaba / Minas Gerais.

Nilvanira Donizete Tebaldi

Universidade Federal de
Uberlândia – Campus Umuarama
Uberlândia / Minas Gerais.

Nágilla Daliane Feliciano

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus
Uberlândia / Minas Gerais.

Edson José Fragiorge

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus
Uberaba / Minas Gerais.

bebidas e cosméticos para evitar ou reduzir a deterioração lipídica e a contaminação por micro-organismos. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição físico-química, atividades antioxidante e antibacteriana de óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus* L.). Os ensaios foram realizados no laboratório de microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, no campus de Uberaba, MG, em parceria com os laboratórios de controle de qualidade das empresas Laborphys Análises Físico-químicas e Microbiológicas e Luvik do Brasil. Foram coletadas amostras de quatro fabricantes no Brasil. Os parâmetros das análises físico-químicas e cromatográficas, cor, densidade, índice de refração, índice de acidez e cinzas sulfatadas, foram conduzidos de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz, 2008. A atividade antioxidante foi realizada, utilizando os métodos de redução do radical livre DPPH• de acordo com as metodologias de Sousa et al. (2007) e Lopes-Lutz et al. (2008) com algumas modificações e o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizado de acordo com as metodologias de Kulisic et al. (2004) e Lopes-Lutz et al. (2008). A atividade antibacteriana foi segundo metodologia da Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, document M07-A9. As cepas padronizadas foram *Enterobacter aerogenes* ATCC 13.048,

RESUMO: Os óleos essenciais podem ser empregados na indústria de alimentos,

Escherichia coli ATCC 25.922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Bacillus cereus* ATCC 11.778, *Pectobacterium* spp. (UFU-C8), *Pantoea ananatis* (UFU-D14), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (UFU-B7) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9.027). Os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais de *C. nardus*, foram o citronelal (22,161% a 77,806%) e geraniol (0,061% a 28,506%). Os parâmetros como cor e índice de refração estavam de acordo com a Farmacopéia Britânica. Densidade relativa, índice de acidez e cinzas sulfatadas encontraram-se dentro das especificações dos fabricantes. As amostras apresentaram atividades antioxidante e antibacteriana contra às Bactérias Gram positiva e Gram negativas que foram testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Concentração inibitória mínima; Compostos secundários; Compostos bioativos.

ESSENTIAL OILS OF CITRONELLA (*CYMBOPOGON NARDUS* L.) RENDLE - (POACEAE): COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

ABSTRACT: Essential oils can be used in the food industry, drinks and cosmetics to prevent or reduce lipid deterioration and contamination by microorganisms. The aims of this study were to evaluate the physical-chemical composition, the antioxidant and antibacterial activities of the citronella (*Cymbopogon nardus*). The tests were performed in the microbiology laboratory of the Federal Institute of Education, Science and Technology of the Triângulo Mineiro, on the *campus* of Uberaba-MG, in partnership with the laboratories of quality control of Laborphys Physical-chemical and microbiological analysis and Luvik of Brazil. Samples were collected from four manufacturers in Brazil. The parameters of the physical-chemical analyzes and chromatography, color, density, refraction index, acidity index and sulphated ash were conducted according to the methodology of the Adolfo Lutz Institute, 2008. The antioxidant activity was performed by using the methods of reducing free radical DPPH● according to the methodologies of Sousa et al. (2007) and Lopes-Lutz et al. (2008) with some modifications and the test of oxidation of the system β -carotene/linoleic acid was performed according to the methodologies of Kulisic et al. (2004) and Lopes-Lutz et al. (2008). The antibacterial activity was according to the methodology of Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, document M07-A9. The standard strains were *Enterobacter aerogenes* ATCC 13,048, *Escherichia coli* ATCC 25,922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13,076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25,923, *Bacillus cereus* ATCC 11,778, *Pectobacterium* spp. (UFU-C8), *Pantoea ananatis* (UFU-D14), *Xanthomonas campestris* PV. *campestris* and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9,027). In the chromatographic analyzes, the majority constituents found in essential oils of *C. nardus*, were the citronellal (22.161% to 77.806%) and geraniol (0.061% to 28.506%). The parameters such as color and refraction index were in accordance with the the British Pharmacopoeia. Relative density, acidity index and sulfated ash were found within manufacturers' specifications.

The samples presented antioxidant and antibacterial activities against Gram positive and Gram negatives bacteria that were tested.

KEYWORDS: Minimum Inhibitory Concentration; secondary compounds; bioactive compounds.

1 | INTRODUÇÃO

A humanidade é impulsionada por necessidades de uso. A dor fez com que o homem buscasse o analgésico, a doença, o remédio. Portanto, é fácil inferir que o uso de partes de plantas e animais no combate às doenças seja tão antigo quanto a própria humanidade (OLIVEIRA; AKISUE, 2009). O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo (SIMÕES et al., 2010). Segundo Guimarães (2010) devido a ampla biodiversidade existente no mundo, as plantas podem contribuir para a descoberta de novos antibióticos por apresentam um amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra algumas bactérias e fungos (SILVA, 2010). Partes da planta como raiz, caule, folha podem fornecer substâncias ativas que serão empregadas na obtenção de um medicamento (ROSA, BARCELOS E BAMPI, 2012). Para Kelsey, Ronald e Rodrigues (1984), os óleos essenciais são fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas contra micro-organismos, sendo comprovada em diversos estudos realizados em países com flora diversificada (SILVA et al., 2010; CARVALHO et al., 2013) APUD GREATTI et al, 2014).

O aparecimento de micro-organismos resistentes aos agentes antimicrobianos existentes tem incentivado a busca por novas substâncias com atividades antimicrobianas (MENDES et al., 2011). Nos últimos anos ocorreu um aumento na busca por medicamentos alternativos, o que propiciou um avanço nas pesquisas relacionadas aos efeitos farmacológicos de plantas medicinais (OLIVEIRA, 2010).

Segundo Castro et al. (2007) o *Cymbopogon nardus* L. Rendle (capim citronela), é uma planta originada do Ceilão e da Índia, pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*. De acordo com Andrade et al. (2012), seu óleo essencial é extraído das folhas recém cortadas e seus componentes majoritários os monoterpenos acíclicos, citronelal (47,12%), geraniol (18,56%), e citronelol (11,07%).

Diante do exposto o objetivo desse trabalho foi avaliar a composição físico-química, antioxidante e a atividade antibacteriana de óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus* L.), demonstrando que o óleo de citronela é uma alternativa de utilização nas indústrias de alimentos, bebidas, produtos de higiene pessoal e cosméticos para evitar ou reduzir a deterioração lipídica e a contaminação por micro-organismos.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A matéria-prima foi adquirida por meio de doação proveniente de quatro empresas diferentes, e os componentes químicos principais foram informados através de literatura e laudos técnicos disponibilizados pelos fabricantes. A fabricação das amostras variou de dezembro de 2015 a agosto de 2016. As mesmas foram armazenadas em embalagens de plástico adequadas, protegidas da luz e umidade. Foram transportadas em condições adequadas em temperatura entre 15 – 30°C. O volume mínimo de amostra foi 500 mL.

2.2 Caracterização química e quantificação dos principais constituintes do óleo essencial

2.2.1 Cromatograma

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu GCMS-QP2010) utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (Restek, Bellefonte, IL, USA) com 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme e fase estacionária composta por poli (5% difenil 95% dimetil) siloxano. O programa de temperatura foi o mesmo descrito na seção anterior, e o gás de arraste utilizado foi o Hélio (He), a um fluxo de 1,2 mL/min. Parâmetros de operação do EM: temperatura da interface: 220,0 °C; modo de ionização por impacto eletrônico a 70 eV; faixa de massa: 35-350 m/z (0,5 scan/s). As amostras foram previamente dissolvidas em Diclorometano (CH₂Cl₂) (1:100 v/v) e 1 µL da solução resultante foi injetado no modo split (1:10). Os componentes individuais foram identificados inicialmente por comparação dos respectivos espectros de massas com aqueles disponíveis na base de dados NIST 05 e por comparação dos índices de retenção (IR) relativos uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos C₇-C₃₀ com valores descritos na literatura (ADAMS, 2001).

2.2.2 Cor

Avaliação instrumental da cor foi determinada pelo método instrumental de leitura em ponto único, superfície horizontal e sua região equatorial, em triplicata, utilizando-se o colorímetro digital portátil Konica Minolta® Chroma Meter CR400 após calibração com placa de porcelana branca (CR-A43). O equipamento foi programado para executar leituras considerando o observador-padrão 2º e o iluminante D65 (correspondente à luz do dia) padronizados pela Commission Internationale de L'Éclairage em 1931. Os valores de L* (Luminosidade) a*, b*, C* (Croma ou Saturação da Cor) e °h (Ângulo Hue, ou seja, Tonalidade ou Matiz) foram mensurados e o espaço de cor adotado para a interpretação dos resultados foi o CIELAB Minolta (1994).

2.2.3 Densidade, índices de refração e acidez e cinzas sulfatadas

Os parâmetros de densidade, índice de refração, acidez e cinzas sulfatadas foram realizados de acordo com as metodologias descritas no Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

2.2.4 Avaliação *in vitro* de atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos óleos essenciais foi avaliado pelas metodologias do consumo do radical DPPH• e da inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Para fins de comparação foram empregados os padrões timol e ácido ascórbico, por possuírem atividade antioxidante reconhecida e o antioxidante sintético BHT. Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo calculada a média dos resultados.

2.2.5 Capacidade de sequestrar o radical livre DPPH•

A avaliação da atividade antioxidante diante do consumo de DPPH• foi realizada de acordo com as metodologias de Sousa et al. (2007) e Lopes-Lutz et al. (2008) com algumas modificações.

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações (500; 300; 100; 50; 25; 10; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para a avaliação, foram adicionados em um tubo de ensaio 2,7 mL da solução estoque de DPPH•, seguido da adição de 0,3 mL da solução de óleo essencial. Paralelamente, foi preparado o branco, sendo este uma mistura de 2,7 mL de metanol e a solução metanólica dos compostos avaliados. Após 60 minutos foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) no comprimento de onda de 515 nm (TEPE et al., 2005). A atividade antioxidante foi calculada de acordo com Sousa et al. (2007).

Para a obtenção da Cl_{50} , foram plotados gráficos com os valores de %I do DPPH• versus as concentrações analisadas. Para fins de comparação foram testados os padrões timol e ácido ascórbico, por possuírem atividade antioxidante reconhecida. A curva analítica foi construída utilizando as concentrações 50; 25; 10; 5; 2,5; $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido ascórbico e para o timol utilizou-se as mesmas concentrações dos óleos.

2.2.6 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o ensaio do β -caroteno/ácido linoléico foi realizada de acordo com as metodologias apresentadas por Kulisic et al. (2004) e Lopes-Lutz et al. (2008) com algumas modificações.

Preparou-se solução de β -caroteno em clorofórmio ($0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), após adicionou-se $60 \mu\text{L}$ de ácido linoléico, 600 mg de Tween 20 e 1,5 mL de clorofórmio, sendo o

clorofórmio evaporado em rotaevaporador. Posteriormente, 150 mL de água destilada saturada com oxigênio foram acrescentados na mistura sob agitação constante (emulsão A). Em seguida 2,8 mL da emulsão A foram colocados em tubos de ensaio e sob estas foram acrescentados 200 μ L das soluções metanólicas dos compostos na concentração de 500 mg L⁻¹. Paralelamente, foram preparadas duas soluções, uma sem o antioxidante (testemunha absoluta), e outra com os mesmos reagentes de A, sem o β -caroteno (emulsão B - branco).

As leituras das amostras foram realizadas no tempo 0, em seguida os tubos foram incubados a 50 °C para a reação de oxidação e a leitura da absorbância foi medida após um intervalo de 60 minutos.

A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição após 60 minutos de incubação de acordo com Kulisic et al. (2004).

Para a obtenção da CI₅₀, foram plotados gráficos como os valores de %I da degradação do β -caroteno versus as concentrações analisadas. Para fins de comparação foram testados, os padrões, timol e ácido ascórbico, por possuírem atividade antioxidante reconhecida. As curvas analíticas dos padrões foram construídas utilizando-se as mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais.

2.3 Micro-organismos utilizados e protocolo experimental

No presente estudo foi avaliada a atividade antibacteriana das amostras de óleos essenciais de citronela frente cepas de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13.048, *Escherichia coli* ATCC 25.922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Bacillus cereus* ATCC 11.778, *Pectobacterium* spp. (UFU-C8), *Pantoea ananatis* (UFU-D14), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (UFU-B7) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9.027, para avaliar possível atividade antibacteriana do óleo essencial comercial.

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi avaliada por meio da inoculação, pela técnica de macrodiluição em tubos (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9) (CLSI, 2012). Das amostras dos óleos foram feitas diluições seriadas obtendo-se dez concentrações (1.000,0 μ g mL⁻¹ a 1,9 μ g mL⁻¹). As bactérias foram cultivadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion Agar) (DIFCO®), a 37°C, durante um período de 24 a 48 horas, dependendo do gênero bacteriano. Os cultivos foram suspensos em solução salina estéril a 0,85% (m/v) até ajuste da turvação à escala 0,5 de Mc Farland ajustando-se assim a uma densidade da suspensão cerca de 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônias/mL), sendo ativadas especificamente para este estudo. Cada linhagem bacteriana foi ajustada na escala padronizada 0,5 de Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹ – Unidades Formadoras de Colônias por mililitro), e diluídas a 2,0% em Tween 80 (2,0%), desta foi transferido 1,0 mL a cada concentração. Em paralelo, foram adicionados controle negativo e controle positivo, integralizando dez tratamentos realizados em duplicata.

2.4 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros das análises físico-químicas dos óleos essenciais de citronela foram expressos em médias e seus desvios-padrões.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cromatograma

Os dois principais constituintes majoritários dos óleos essenciais (Citronelal e Geraniol) foram identificados e quantificados por comparação dos resultados obtidos (índices de retenção e espectros de massa) com os dados da literatura.

Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que os valores de Citronelal variam entre 22,158% a 77,797%. Já os valores de Geraniol variaram entre 0,061 a 28,503%.

Oliveira et al. (2011), avaliando os compostos químicos do *Cymbopogon nardus*, encontraram valores de Citronelal (34,61%) e Geraniol (23,18%), corroborando com os valores encontrados nesse trabalho para três das amostras testadas. Posteriormente Andrade et al. (2012), avaliando a composição do óleo essencial de citronela encontram resultados de Citronelal (47,12%) e Geraniol (18,56%). Segundo Bandeira et al. (2011), os constituintes e as concentrações dos óleos essenciais não somente dependem da planta, como também da época e sistemas de cultivo e adubações (LUZ et al., 2014). Pesquisas de Marco et al. (2007) revelaram que o teor de geraniol pode ser afetado pela época do corte, sendo que o melhor resultado é obtido quando as plantas são colhidas de quatro a seis meses após o plantio.

Amostras	% Citronelal	% Geraniol
1	77,797	0,061
2	22,158	28,503
3	29,561	21,334
4	37,274	21,669

Tabela 1. Resultados obtidos das análises cromatográficas da amostra 1, amostra 2, amostra 3 e amostra 4 do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*)

Fonte: Elaborado pelo autor

3.2 Características físico-químicas

Os ensaios de qualidade dos óleos essenciais objetivam a verificação da pureza do material e a caracterização dos componentes químicos da espécie em estudo (SIMÕES et al., 2010).

3.2.1 Cor

A amostra 1 apresentou valores médios de L^* 42,04 ; a^* -1,57 b^* 5,35, próximo de uma cor levemente amarelada.

Já as amostras 2 e 3 apresentaram valores médios respectivamente de L^* 40,07 ; a^* -3,12 b^* 15,05, L^* 35,45 ; a^* -1,98 b^* 17,59, próximo da cor amarelada.

A amostra 4 apresentou valores médios de L^* 35,75; a^* 0,76 b^* 12,08, o que indica uma coloração mais próxima do laranja.

3.2.2 Densidade Relativa

Os valores médios obtidos variaram de 0,8644 à 0,8668 para o parâmetro densidade, demonstrando que estavam dentro das especificações dos fabricantes, mas apresentaram valores abaixo do especificado na Farmacopéia Britânica (0,881 a 0,895 g/mL) (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008).

3.2.3 Índice de Refração

O índice de refração é característico para cada tipo de óleo, dentro de certos limites. O índice de refração dos óleos essenciais de citronela testados está de acordo com a Farmacopéia Britânica que determina variação de 1,463 a 1,475 (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008).

3.2.4 Índice de Acidez

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Índices elevados de acidez são sugestivos de hidrólise acentuada dos ésteres constituintes da matéria graxa. As causas da degradação incluem tratamentos químicos integrantes dos processos industriais de extração e purificação, atividade bacteriana, ação catalítica (calor, luz), estocagem inadequada e presença de impurezas como a umidade, entre outros. (ANVISA, 2010). Os resultados mostraram valores 1,29 a 3,05 mg KOH g⁻¹ para o índice de acidez, o que indicam que os valores estão dentro das especificações dos fabricantes desses óleos.

3.2.5 Cinzas sulfatadas

A determinação do teor de cinzas pode indicar a presença de possíveis adulterações, já que permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (SIMÕES et al., 2010). Os resultados mostraram valores 0,057 a 0,199 % para cinzas.

Considerando que na literatura pesquisada não foram encontrados valores de cinzas sulfatadas para óleo essencial de citronela, esses dados podem fornecer subsídios para o controle de qualidade dessa matéria-prima vegetal por trazer informações importantes como a presença de impurezas inorgânicas e metálicas (DE PAULA et al, 2013).

3.2.6 Atividade Antioxidante

Os valores de CI_{50} para a atividade antioxidante dos padrões e óleos essenciais em estudo pelo método de sequestro de radicais DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e pelo teste β -caroteno/ácido linoleico, 34,3 estão expressos na Tabela 2.

Amostras	DPPH•	Sistema β -caroteno/linoleico
	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	50,34	21,35
2	70,23	30,56
3	120,30	90,32
4	115,26	72,62
Timol	42,38	22,30
Ácido Ascórbico	4,56	57,22

Tabela 2. Atividade antioxidante dos óleos essenciais da amostra 1, amostra 2, amostra 3, amostra 4 e dos padrões timol, ácido ascórbico pelo método de sequestro de radicais DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e pelo teste β -caroteno/ácido linoleico

Todos estes estudos corroboram com os resultados encontrados nesse trabalho, pela atividade antioxidante do óleo essencial das amostras de capim-citronela que possui como composto majoritário o citronelal e o geraniol frente aos padrões timol e ácido ascórbico.

Pelos dados apresentados na Tabela 2, observa-se que dentre os óleos essenciais em estudo, o que apresentou maior atividade antioxidante pelo teste do DPPH• foi a amostra 1 (CI_{50} 50,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguida das amostras 2 (CI_{50} 70,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 4 (CI_{50} 115,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3 (CI_{50} 120,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Entre os padrões avaliados o ácido ascórbico (CI_{50} 4,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mostrou-se mais eficiente que o timol (CI_{50} 42,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Embora o maior efeito do óleo essencial do capim-citronela é devido ao sinergismo existente entre os seus compostos que atuam de forma conjunta (SEIXAS et al., 2011) o citronelal presente na amostra 1 (77,797%), foi o componente responsável pela atividade antioxidante, enquanto que a amostra 2 apresentou eficiência pela ação antioxidante do Geraniol (28,503%). As amostras 3 e 4 apresentaram menores percentuais de citronelal (29,561%) e (37,274%) quando comparados com a amostra 1 respectivamente. O teor de geraniol encontrado também foi menor (21,334) e (21,669%) quando comparado com amostra 2. Os valores encontrados na Tabela 2 demonstram que houve uma menor eficiência antioxidante, tanto pelo teste do DPPH• como pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico nas amostras 3 e 4. Esses valores podem ter sido afetados pela diferença na concentração dos componentes químicos majoritários (citronelal e geraniol) encontrados nas amostras, influenciando na redução

da atividade antioxidante das mesmas.

Pelo método β -caroteno/ácido linoléico os óleos essenciais em estudo apresentaram atividade antioxidante, sendo que o óleo essencial da amostra 1 (CI_{50} 21,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou-se mais eficiente seguida das amostras 2 (CI_{50} 30,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 4 (CI_{50} 72,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3 (CI_{50} 90,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Entre os padrões avaliados o timol (CI_{50} 22,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mostrou-se mais eficiente que o ácido ascórbico (CI_{50} 57,22 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de CI_{50} dos padrões pelo método β -caroteno/ácido linoléico foram influenciados pela polaridade de suas moléculas sendo o mais apropriado para esta análise, o timol. Se compostos polares, como o ácido ascórbico, fossem testados apenas por ele seriam considerados como antioxidantes fracos (KULISIC et al., 2004). Este fato explica a menor eficiência do ácido ascórbico quando comparado com o timol.'

Andrade et al. (2012) estudando o óleo essencial de *C. nardus*, encontraram atividade antioxidante atribuída aos constituintes citronelal, geraniol e citronelol pelo método de seqüestro de radicais DPPH• com valores de atividade antioxidante menor do que aqueles encontrados neste estudo (CI_{50} 517,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e pelo teste β -caroteno/ácido linoleico de (CI_{50} 20,65 $\mu\text{g mL}^{-1}$), próximo dos valores encontrados nesta pesquisa.

3.2.7 Concentração Inibitória Mínima

Os valores das concentrações inibitórias mínimas CIM das amostras para as bactérias em estudo estão expressas na Tabela 3. Os resultados apresentados demonstram que os óleos essenciais analisados sugerem ação antimicrobiana.

Bactérias	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	125	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250	125	125	125
<i>Salmonella enteritidis</i>	250	250	125	125
<i>Escherichia coli</i>	250	125	125	250
<i>Bacillus cereus</i>	3,9	1,9	3,9	62,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	500	-	-
<i>Pantoea ananatis</i>	1,9	1,9	125	15,6
<i>Xanthomonas campestris</i>	125	125	500	500
<i>Pectobacterium</i> spp.	125	125	500	-

(-) não avaliado.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da macrodiluição da amostra 1, amostra 2, amostra 3 e amostra 4 do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) usando-se concentrações de 1,9 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados demonstraram efeito inibitório satisfatório tanto para bactérias Gram positivas quanto Gram negativas. Os óleos mais efetivos conforme a Tabela 3 foram as amostras 1 e 2, onde todas as bactérias testadas foram sensíveis. Já a amostra 3, não apresentou eficácia frente a dois micro-organismos, *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram positiva e *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria Gram negativa). Para Madigan et al (2016) a suscetibilidade de micro-organismos individuais a agentes antimicrobianos pode variar significativamente. A amostra 4 demonstrou que três micro-organismos testados apresentaram resistência. Andrade et al., 2012, avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de citronela encontraram valores de CIM diferentes daqueles encontrados nesse estudo, onde não foi encontrado efeito inibitório do óleo. Esses valores podem ter sido afetados pela diferença na concentração dos principais componentes majoritários (citronelal e geraniol) presente nas amostras. A CIM das bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* apresentaram valores variando entre $1,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo que as amostras 3 e 4 não apresentaram inibição frente a cepa de *Staphylococcus aureus*. Já as bactérias Gram negativas variaram entre $1,9$ a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Podemos observar que dentre as bactérias Gram-negativas, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresentou-se mais resistente, encontrando-se valores de CIM de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e não apresentou efeito inibitório em duas das amostras testadas, encontrando-se valores de CIM maior do que os valores encontrados por Andrade et. al, 2012. Bactérias gram-positivas e gram-negativas diferem quanto à suscetibilidade a um antibiótico individual, tal como a penicilina; bactérias gram-positivas geralmente são afetadas, enquanto a maioria das bactérias gram-negativas é naturalmente resistente (MADIGAN et al., 2016). Outro fato que pode explicar variações de eficácia das diferentes amostras testadas, pode ser por diferenças na composição química de cada óleo, que pode ser afetado por fatores ambientais que podem produzir variações nos componentes secundários das plantas como solo, clima, flora, local e método de cultivo (ROBBERS, SPEDIE, TYLER, 1997), altura do corte e tempo de colheita (MARCO et al., 2007).

A espécie *Escherichia coli* apresentou valores de CIM que variam entre 125 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que difere dos resultados encontrado por Andrade et. al, 2012, onde não houve inibição do micro-organismo frente a amostra do óleo essencial de citronela. Dentre as amostras testadas, a 3 e 4 apresentaram-se menos eficiente, ou seja não conseguiram inibir o crescimento de três espécies, sendo elas *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Pseudomonas aeruginosa*, *Pectobacterium* spp. (Gram negativas). As amostras 1, 2 e 3 apresentaram mesmo valor de CIM para as espécies *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*.

4 | CONCLUSÃO

Com base no que foi demonstrado neste estudo, verificamos que os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, foram o

citronelal e geraniol. Os parâmetros como cor e índice de refração estavam de acordo com as informações especificados na Farmacopéia Britânica.

A densidade relativa, índice de acidez e cinzas sulfatadas encontraram-se dentro das especificações dos fabricantes.

A atividade antioxidante foi evidenciada pelo método de sequestro de radicais DPPH• e pelo teste β -caroteno/ácido linoleico em todas as amostras comerciais testadas de óleo essencial de *C. nardus*.

Os óleos essenciais de *C. nardus* apresentaram atividade antibacteriana frente às Bactérias Gram positivas e Gram negativas testadas.

Os menores valores de CIM e de IC₅₀ foram encontrados nas amostras 1 e 2, onde apresentaram maiores concentrações de seus compostos majoritários.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos às empresas Laborphys Análises Físico-químicas e Microbiológicas e Luvik do Brasil, pela parceria e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

ADAMS R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatographic/Quadrupole Mass Spectrometry. Carol Stream (IL): Allured, 2001.

ANDRADE, M. A. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidantes e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 3999-3408, 2012.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, abril-junho, 2012.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Ed. Copyright, 2010.

BANDEIRA, J. M.; BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. M. P.; RODRIGUES, I. C. S.; BACARIN, M. A.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011.

BRITISH PHARMACOPEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2008, p. 2392.

CARVALHO, M. G., MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius Raddi*: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de plantas mediciniais**. Botucatu, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B.; DOS SANTOS, G. R. ; LEAL, T. C. A. B. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial**

susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – ninth edition, M07-A9, v. 32, n. 2, Wayne, Pennsylvania; 2012, 88 p.

DE PAULA, J.; DE SOUSA, R.A.; MENEGON, R.F.; JOAQUIM, W.M.; DA SILVA, I.R. Avaliação da Qualidade dos frutos de funcho (*Foeniculum vulgare* mill.) utilizados no prepare de chás. **Revista Univap**, São José dos Campos, São Paulo, v.19, n.33, setembro de 2013.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Spices as natural antioxidants: their application in food and implication for health. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GREATTI, V. R.; CORAL, D. J.; NEVES, F. T. A.; WECKWERTH, P. H. Avaliação da atividade antibacteriana in vitro da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) frente a linhagens gram positivas e gram negativas. **SALUSVITA**, Bauru, v. 33, n. 3, p. 345-354, 2014.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos – 4ª Edição – 1ª Edição Digital – Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea – São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.**

KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G. W.; RODRIGUEZ, E. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P.L.; METHA, I. (Eds.). *Biology and chemistry of plant trichomes*. **New York: Plenum**. p. 187-241, 1984.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of orégano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633–640, 2004.

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D. M. S.; ALVIANO, C. S.; KOLODZIEJCZYK, P. P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.

LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; HABBER, L. L.; MARQUEZ, M. O. M. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 552-560, 2014.

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 32 – 177, 2016.

MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N. S. S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura brasileira**, v. 25, n. 3, jul.-set, 2007.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM-NETO, P. J.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas Aplicadas**. v.32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MINOLTA. **Precise Color Communication: Color Control from Feeling to instrumentation**. Osaka: MINOLTA Co. Ltda., p. 49, 1994.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**, 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2009, 228p.

OLIVEIRA, M. M. M. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 04, p. 549-

553, 2010.

OZKAYA, A.; SAHIN, Z.; GORGULU, A. O. YUCE, A.; CELIK, S. Geraniol attenuates hydrogen peroxide-induced liver fatty acid alterations in male rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 29-35, 2017.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Tradução de Benedetti, I. C. Supervisão Científica de Bastos, J. K. e outros. 1ª ed., Editorial Premier. São Paulo. 1997. 372p.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista brasileira de plantas medicinais**, vol. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

SEIXAS, P. T. L.; CASTRO, H. C.; SANTOS, G. R.; CARDOSO, D. P. Fungitoxic activity of essential oil of citronella grass (*Cymbopogon nardus* L.) and compound citronellal. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 13, n. spe, p. 523-526, 2011.

SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GURREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, 351-355, 2007.

TEPE, B.; AKPULAT, H. A.; SOKMEN, M.; DAFERERA, D. YUMRUTAS, O.; AYDIN, E.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. **Food Chemistry**, v. 97, n. 04, p. 719-724, 2006.

ULUATA, S.; Mc CLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. How the Multiple Antioxidant Properties of Ascorbic Acid Affect Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1819-1824, 2015.

POLÍMEROS DE PAREDE CELULAR E CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS DE ESPÉCIES ARBÓREAS PIONEIRAS E NÃO PIONEIRAS DA FLORESTA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Data de aceite: 06/02/2020

Data de submissão: 04/11/2019

Bernardo Pretti Becacici Macieira

Universidade Federal do Espírito Santo,
Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório
de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (LaBioPlant)
Vitória – Espírito Santo

<http://lattes.cnpq.br/8848771456041333> – <https://orcid.org/0000-0001-8283-2334>

RESUMO: A classificação sucessional tem utilizado critérios qualitativos e por isso, imprecisos. Os polímeros de parede celular de arbóreas pioneiras e não pioneiras geralmente são fundamentados apenas em hipóteses sobre a densidade da madeira destas espécies, faltando informações sobre a proporção da composição destes constituintes entre as classes sucessionais. O presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar as proporções de carboidratos não estruturais (CNE) e polímeros de parede celular (PPC) de espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras da Floresta Atlântica do Espírito Santo, Brasil. Este trabalho foi conduzido na floresta de tabuleiro da Reserva Natural Vale, município de Linhares. Foram quantificados os teores de carboidratos

não estruturais (açúcares solúveis e amido) e polímeros de parede celular (celulose, hemiceluloses e lignina) de folhas e caule de árvores adultas das espécies pioneiras *Senna multijuga* var. *verrucosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby, *Miconia cinnamomifolia* (DC.) Naudin e *Bixa arborea* Huber; e das não pioneiras *Melanoxylon brauna* Schott, *Carpotroche brasiliensis* (Raddi) Endl. e *Neoraputia alba* (Nees & Mart.) Emmerich. As espécies pioneiras mostraram maiores teores de açúcares solúveis no caule. As espécies não pioneiras se destacaram pelo maior teor de amido e PPC nas folhas. No caule, o teor desses polímeros em não pioneiras foram superiores em relação às pioneiras. Considerando que os CNE são moléculas instáveis sujeitas às variações ambientais, concluímos que os PPC sejam os mais seguros para caracterizar as classes sucessionais. Contudo, a lignina foi o composto que mais diferenciou entre as duas classes sucessionais (> 100%), indicando que o teor desse polímero seja o atributo quantitativo mais confiável para identificar espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras da Floresta Atlântica.

PALAVRAS-CHAVE: Sucessão florestal, Açúcares solúveis, Lignina.

CELL WALL POLYMERS AND NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES OF PIONEER AND NON- PIONEER TREE SPECIES OF ATLANTIC FOREST OF ESPÍRITO SANTO, BRAZIL

ABSTRACT: Classification of successional stages has used qualitative and therefore inaccurate criteria. Cell wall polymers of pioneer and non-pioneer trees species are generally based only on assumptions about the wood density of these species, lacking information on the proportion and composition of these constituents among successional classes. The aim of present study was to characterize the proportions of non-structural carbohydrates (NSC) and cell wall polymers (CWP) of pioneer and non-pioneer tree species from the Atlantic Forest of Espírito Santo, Brazil. This study was conducted in lowland forest of Vale Nature Reserve, city of Linhares. Non-structural carbohydrates (soluble sugars and starch) and cell wall polymers (cellulose, hemicelluloses, and lignin) were analysed in leaf and wood of mature trees of pioneer trees *Senna multijuga* var. *verrucosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby, *Miconia cinnamomifolia* (DC.) Naudin, and *Bixa arborea* Huber; and non-pioneers trees *Melanoxylon brauna* Schott, *Carpotroche brasiliensis* (Raddi) Endl., and *Neoraputia alba* (Nees & Mart.) Emmerich. Pioneer species showed higher contents of soluble sugars in the wood. Non-pioneer species showed higher starch and CWP contents in the leaf. The content of these polymers in the wood of non-pioneer was higher than pioneer tree species. Whereas NSC are unstable molecules subject to environmental variations, we conclude that CWP are the safest to characterize successional classes. However, lignin was the compound that most differentiated between the two successional classes (> 100%) indicating that the content of this polymer is the most reliable quantitative criteria for identifying pioneer and non-pioneer tree species of Atlantic Forest.

KEYWORDS: Forest succession, Soluble sugars, Lignin.

1 | INTRODUÇÃO

A divisão das espécies em classes sucessionais é um artifício utilizado para facilitar a compreensão da dinâmica das florestas e é baseada em observações empíricas (KITAJIMA, 1996). Isso é feito relacionando a posição dos indivíduos na floresta com o perfil do espectro luminoso incidente no local ocupado pela espécie (REICH et al., 2003).

Existem várias propostas para definir as classes sucessionais. BUDOWSKI (1965) propôs uma divisão das arbóreas em quatro classes: pioneiras, secundárias iniciais, secundárias tardias e clímax. Dada a dificuldade em diferenciar as três últimas classes, SWAINE e WHITMORE (1988) reconheceram apenas duas classes: pioneiras e não pioneiras. Esses autores definiram espécies pioneiras como aquelas que germinam, sobrevivem e crescem somente em clareiras e são, portanto, mais tolerantes à intensa irradiância. Já as espécies da categoria final ou tardia de sucessão (não pioneiras), são aquelas que exigem ambientes sombreados do sub-bosque para se estabelecerem.

O critério de classificação das espécies em suas classes sucessionais é

baseado nos seus hábitos ecofisiológicos seguindo padrões estritamente qualitativos e imprecisos. Por muito tempo tem sido afirmado que as pioneiras são fotoblásticas (FINEGAN, 1984; SWAINE e WHITMORE, 1988). Todavia, as arbóreas pioneiras e não pioneiras de florestais tropicais não tem mostrado exigência ao fator luminosidade (LIMA et al., 2008). Além da germinabilidade, outros critérios qualitativos têm sido adotados para categorizar espécies pioneiras e não pioneiras. As pioneiras têm sido diferenciadas das não pioneiras por possuírem maior velocidade de crescimento e taxa de fotossíntese, bem como menor longevidade e densidade da madeira (BUDOWSKI, 1965; FINEGAN, 1984; WHITMORE, 1990), não ficando claros os limites inferiores e superiores dos valores de cada um desses caracteres.

Buscando relacionar as classes sucessionais com as taxas de crescimento em espécies tropicais do Brasil, SOUZA e VÁLIO (2003) constataram que as pioneiras, em comparação as não pioneiras, apresentaram maior taxa de crescimento tanto em pleno sol como na sombra. Já FRIGERI (2007) relatou que espécies pioneiras e não pioneiras apresentaram maiores taxas de crescimento em 50% da irradiância do sol. Esses resultados denotam a falta de um padrão das taxas de crescimento das classes sucessionais (ELLIS et al., 2000), mesmo sendo uma variável quantitativa.

Considerando que espécies de crescimento rápido requerem maior demanda de fotoassimilados para sua atividade metabólica (POORTER e BONGERS, 2006; POORTER et al., 2010; LI et al., 2016; MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016), espécies pioneiras tem mostrado maiores taxas fotossintéticas em relação as não pioneiras na fase juvenil (PORTES et al., 2010). No entanto, em outros estudos com espécies pioneiras e não pioneiras, as taxas fotossintéticas não mostraram diferenças entre as classes sucessionais em pleno sol ou em sombreamento (NOGUEIRA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2009), demonstrando que essa variável não segue um padrão bem definido de valores, pelo menos na fase juvenil. Na fase adulta há uma falta de informações sobre os limites inferiores e superiores das taxas de fotossíntese em espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras.

De todos os critérios utilizados para categorizar espécies pioneiras e não pioneiras, o que parece ser menos vulnerável as variações ambientais e das fases da ontogenia seja a densidade da madeira (NOVAES et al., 2010; POORTER et al., 2010). As espécies não pioneiras são reconhecidas pela maior densidade da sua madeira associada ao seu crescimento lento (KING et al., 2005; POORTER et al., 2010). Isso sugere que as espécies não pioneiras devam possuir maior teor de polímeros de parede celular como a celulose, as hemiceluloses e a lignina.

A partir destas informações, foi possível hipotetizar que espécies arbóreas não pioneiras de florestas tropicais devam apresentar maiores teores de celulose, hemiceluloses e lignina em órgãos fonte (folhas) e dreno (caule) em relação às pioneiras. Em contrapartida, as espécies arbóreas pioneiras devam apresentar maiores teores de açúcares solúveis em relação às não pioneiras, como demanda de fotoassimilados para o acelerado estabelecimento e rápido crescimento dessa classe. O trabalho

foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar as proporções de carboidratos não estruturais (CNE) e de polímeros de parede celular (PPC) de espécies arbóreas tropicais pioneiras e não pioneiras, visando propor critérios quantitativos que possam ser utilizados na classificação sucessional de espécies arbóreas da Floresta Atlântica.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Este trabalho foi realizado em um fragmento da Floresta Atlântica na vegetação de tabuleiro da Reserva Natural Vale (RNV), localizado no município de Linhares, estado do Espírito Santo, Brasil (19°11'30" S e 40°05'46" W, 58 m de altitude). Para o objetivo proposto foram coletadas amostras de folhas e caule de sete árvores das espécies pioneiras *Senna multijuga* var. *verrucosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (Caesalpiniaceae), *Miconia cinnamomifolia* (DC.) Naudin (Melastomataceae) e *Bixa arborea* Huber (Bixaceae) e das não pioneiras *Melanoxylon brauna* Schott (Caesalpiniaceae), *Carpotroche brasiliensis* (Raddi) Endl. (Achariaceae) e *Neoraputia alba* (Nees & Mart.) Emmerich (Rutaceae) bem representadas na floresta da RNV (LORENZI, 2002; 2008). A altura média e diâmetro à altura do peito (DAP) das espécies pioneiras e não pioneiras foi de 16 m e 24 cm, respectivamente. Amostras de folhas completamente expandidas do terceiro ao quarto nó apical dos ramos e segmentos caulinares retirados com auxílio de trado de incremento no nível do DAP foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido.

2.2 Carboidratos não estruturais

Amostras de folhas e segmentos caulinares foram congeladas em ultrafreezer -80°C, liofilizadas e, em seguida, pulverizadas em moinho de bola (Modelo TE-350, TECNAL, São Paulo, Brasil) e armazenadas em temperatura ambiente. Para a extração de açúcares solúveis (POLLOCK, 1986), 10 mg do pó foi pesado e submetidos a quatro extrações subsequentes com 1,5 mL de etanol 80% em banho-maria a 80°C durante 20 minutos. O precipitado foi seco em estufa 50°C durante 24 horas e armazenado em temperatura ambiente para posterior análise de amido. O volume total da extração etanólica foi evaporado em concentrador de amostras (Thermo Scientific Express SC250EXP SpeedVac®, Massachusetts, EUA), ressuspendido em 1 mL com água ultrapura Milli-Q e analisados os teores de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) por cromatografia líquida de troca aniônica de alta performance (HPAEC/PAD – *High Performance Anion Exchange Chromatography With Pulsed Amperometric Detection*) em sistema Dionex-DX500 (Texas, EUA).

A dosagem de amido seguiu o método de AMARAL et al. (2007). Após remoção dos açúcares solúveis da etapa anterior, foram adicionados ao precipitado 0.5 mL (120 U mL⁻¹) de α -amilase termoestável (EC 3.2.1.1) de *Bacillus licheniformis* (Megazime® Inc., Austrália), diluída em tampão MOPS 10 mM em pH 6,5 seguido de incubação a

75°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 120 unidades de enzima. As amostras foram resfriadas até 50°C, e então foi adicionado 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL⁻¹ de amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (Megazime® Inc., Austrália) em tampão acetato de sódio 100 mM em pH 4,5 seguido de incubação a 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Após as incubações, foram acrescentados 50 µL de ácido perclórico 0,8 M para interromper a reação enzimática. A dosagem de amido prosseguiu através da quantificação de glicose liberada no processo de hidrólise do amido. Foram utilizados 50 µL do extrato com 250 µL do reagente Glicose PAP Liquiform (CenterLab, Brasil), contendo as enzimas glicose-oxidase (11000 U mL⁻¹) e peroxidase (700 U mL⁻¹), 290 µmol L⁻¹ de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Após incubação por 15 minutos a 37°C, o teor de glicose foi determinado em espectrofotômetro acoplado a leitor de ELISA (Thermo Scientific Express Multiskan FC Microplate Photometer, Massachusetts, EUA) em comprimento de onda de 490 nm.

2.3 Polímeros de parede celular

A extração e determinação de celulose seguiu o protocolo de BRENDEL et al. (2000), utilizando-se 100 mg de amostras pulverizadas. Para determinação das hemiceluloses foi utilizado 50 mg das amostras seguindo o método de SCHÄDEL et al. (2010) modificado em que a extração enzimática do amido foi substituída pela extração em DMSO 90% (CARPITA e KANABUS, 1987). A extração e determinação de lignina seguiram a metodologia de DOS SANTOS et al. (2008). Foram utilizadas 150 mg das amostras pulverizadas e a determinação do conteúdo de lignina foi realizada através da leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer, Massachusetts, EUA) em 280 nm.

2.4 Análise estatística

Os dados foram testados utilizando o software estatístico InfoStat (Versão 2018, Grupo InfoStat, FCA, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina) para análise de distribuição de normalidade com o teste de Shapiro–Wilk e para análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,01).

3 | RESULTADOS

3.1 Carboidratos não estruturais

Nas folhas, os teores de glicose, frutose e sacarose não diferiram entre as duas classes sucessionais (Figura 1). A pioneira *B. arborea* se destacou pelos maiores teores de glicose (1,5 mg.g⁻¹ Massa Seca = MS) e frutose (1,8 mg.g⁻¹ MS). *S. multijuga* apresentou maior teor de sacarose representando menos que 0,3 mg.g⁻¹ MS. Curiosamente, *M. cinnamomifolia* não apresentou teores de sacarose nas folhas mesmo utilizando sete repetições. Nas não pioneiras, *C. brasiliensis* mostrou maiores

teores de glicose ($1,8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$), frutose ($1,5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) e sacarose ($0,33 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). Para o xilema secundário do caule, as concentrações dos açúcares solúveis variaram entre as classes sucessionais (Figura 1). As pioneiras mostraram maiores teores de glicose ($6 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$), frutose ($2,3 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) e sacarose ($7,9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$), enquanto as espécies não pioneiras apresentaram valores de $1,5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, $0,8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ e $4,3 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente. Esses critérios quantitativos nas pioneiras se caracterizaram por teores de glicose $\geq 5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, frutose $\geq 2 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ e sacarose $\geq 7 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ e nas não pioneiras os valores foram de glicose $\leq 2 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, frutose $\leq 1,5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ e sacarose $\leq 4 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$. Comparando os órgãos fonte e dreno, verificou-se que nas folhas a sacarose foi a menor fração dos açúcares solúveis, enquanto no caule, foi a maior fração.

As espécies não pioneiras se destacaram pelos maiores teores de amido foliar (Figura 1), com valores $\geq 1,8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, enquanto nas pioneiras esses valores foram $\leq 1,2 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ (Tabela 4). A espécie não pioneira *N. alba* mostrou maior teor de amido representando $6,1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$. O teor de amido caulinar não diferenciou entre as duas classes sucessionais (Figura 1). Diferente do observado nas folhas, a espécie não pioneira *N. alba* apresentou o menor valor de amido representando apenas $0,8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, enquanto a espécie *C. brasiliensis*, da mesma classe sucessional, se destacou pelo maior teor de amido chegando a representar $5,7 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$.

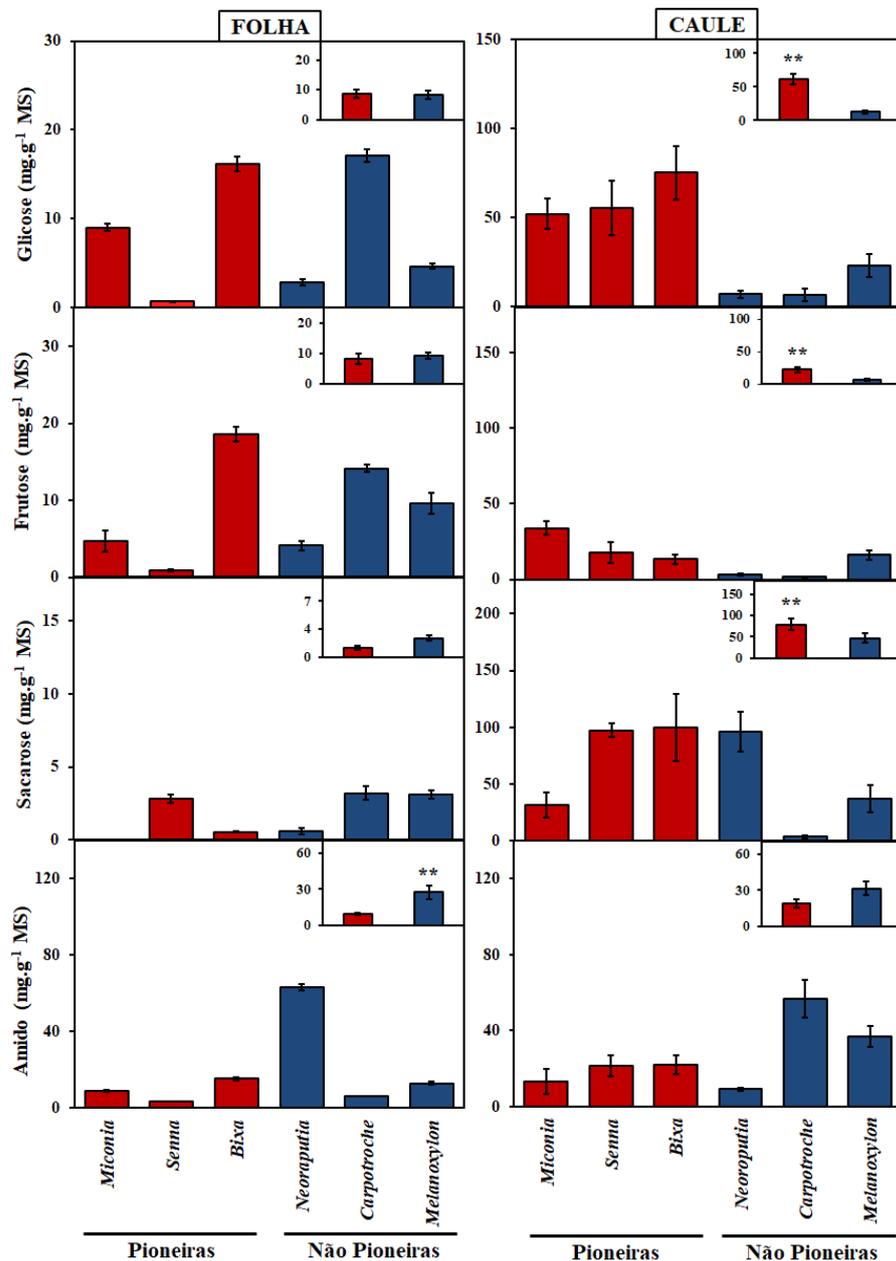


Figura 1. Teores de carboidratos não estruturais (glicose, frutose, sacarose e amido) nas folhas e no caule de espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras da Floresta Atlântica do Espírito Santo, Brasil. Os gráficos menores e sobrescritos representam as médias dos teores de carboidratos não estruturais de cada classe sucessional ($n = 21$). As barras verticais representam o desvio padrão da média ($n = 7$). Dois asteriscos representam diferenças significativas entre as classes ($P < 0,01$).

3.2 Polímeros de parede celular

Os teores de polímeros de parede celular (celulose, hemiceluloses e lignina) foram maiores nas folhas e no caule das espécies não pioneiras (Figura 2). O teor da celulose nas folhas nas espécies não pioneiras foi $\geq 8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ e no caule $\geq 31 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, enquanto nas pioneiras esses valores nas folhas foram $\leq 6,5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ e no caule $\leq 28 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ (Figura 2). Os teores de celulose nas folhas e no caule das espécies não pioneiras foi 83% e 57% maior, respectivamente, em relação as espécies pioneiras.

Os valores da concentração de hemiceluloses das espécies não pioneiras foram

$\geq 14 \text{ mg.g}^{-1}$ MS nas folhas e $\geq 21 \text{ mg.g}^{-1}$ MS no caule. As pioneiras exibiram teores de hemiceluloses $\leq 10 \text{ mg.g}^{-1}$ MS nas folhas e $\leq 17 \text{ mg.g}^{-1}$ MS no caule (Figura 2). Comparando as duas classes sucessionais, o teor de hemiceluloses nas folhas das não pioneiras foi 83% maior em relação as pioneiras enquanto no caule esse valor foi de 65%.

A lignina demonstrou ser um critério quantitativo bem representativo para as duas classes sucessionais (Figura 2). As espécies não pioneiras apresentaram teores de lignina $\geq 3 \text{ mg.g}^{-1}$ MS nas folhas e $\geq 15 \text{ mg.g}^{-1}$ MS no caule, enquanto nas pioneiras os teores de lignina foram $\leq 1,8 \text{ mg.g}^{-1}$ MS nas folhas e $\leq 10 \text{ mg.g}^{-1}$ MS no caule. O teor de lignina nas folhas e no caule das espécies não pioneiras foi cerca de 120% maior em relação as pioneiras.

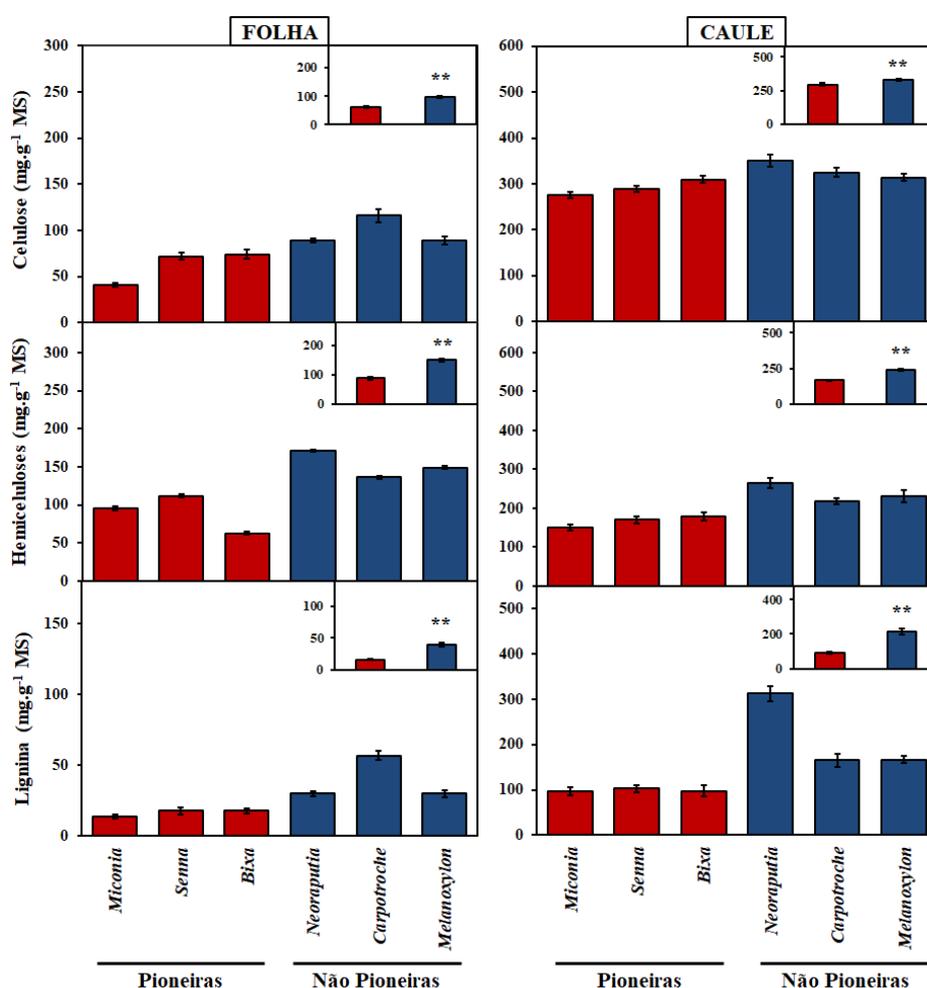


Figura 2. Teores de polímeros de parede celular (celulose, hemiceluloses e lignina) nas folhas e no caule de espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras da Floresta Atlântica do Espírito Santo, Brasil. Os gráficos menores e sobrescritos representam as médias dos teores de polímeros de parede celular de cada classe sucessional ($n = 21$). As barras verticais representam o desvio padrão da média ($n = 7$). Dois asteriscos representam diferenças significativas entre as classes ($P < 0,01$).

4 | DISCUSSÃO

As características ecofisiológicas das espécies pioneiras e não pioneiras do

presente estudo mostraram algumas semelhanças com as descrições de BUDOWSKI (1965), FINEGAN (1984) e WHITMORE (1990). De acordo com esses autores, a maior longevidade foliar e densidade do caule das espécies não pioneiras podem estar associadas aos maiores teores de polímeros de parede celular como constatado nos resultados do presente estudo.

Partindo do pressuposto de que as espécies pioneiras possuem maiores taxas fotossintéticas exigidas pelo rápido crescimento (POORTER e BONGERS, 2006; POORTER et al., 2010; LI et al., 2016; MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016), é esperado encontrar maiores concentrações de fotoassimilados nos órgãos fonte e dreno dessa classe. Porém, os teores de glicose, frutose e sacarose das folhas não diferenciou entre as duas classes sucessionais. Isso pode ter ocorrido devido a uma única análise temporal. Outro aspecto que deve ser considerado é a respiração celular mais ativa nessa classe sucessional (PORTES et al., 2010; LI et al., 2016; MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016). Isso poderia ter proporcionado o metabolismo dos fotoassimilados excedentes se igualando aos teores dos açúcares solúveis das espécies não pioneiras. Outro fator que precisa ser considerado é a variabilidade interespecífica (ALBERT et al., 2010). A variação da concentração de açúcares solúveis entre as espécies pioneiras foi elevada, assim como também foi observado para as não pioneiras.

Considerando que as espécies não pioneiras devam apresentar menor atividade fotossintética em relação às pioneiras (KING et al., 2005; POORTER et al., 2010), conseqüentemente reflete em maior teor de amido nas espécies dessa classe sucessional como constatado no presente estudo, exercendo a função como carboidrato de reserva temporário em espécies que apresentam baixa taxa de crescimento (LI et al., 2016; MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016).

Além do papel de reserva, o acúmulo de amido estimula a biossíntese de lignina em espécies de crescimento lento (HARDING et al., 2009; NOVAES et al., 2010) como as espécies não pioneiras (KING et al., 2005; POORTER et al., 2010). Uma correlação positiva entre a biossíntese de lignina, concentração de amido e taxas de crescimento reduzido tem sido observada em alguns estudos com espécies arbóreas de rápido e lento crescimento do hemisfério norte (HARDING et al., 2009; NOVAES et al., 2010). Diferente do amido que mostrou considerável variabilidade interespecífica nas folhas das espécies não pioneiras, a lignina não apresentou essa característica. Da mesma forma que a lignina tem sua síntese estimulada pelo amido, podemos hipotetizar que a maior concentração da celulose e das hemiceluloses nas folhas das espécies não pioneiras também esteja sob controle da concentração de amido.

Os resultados obtidos nas análises dos polímeros de parede celular foram altamente satisfatórios e inéditos sob o ponto de vista ecológico. O maior teor de celulose, hemiceluloses e lignina verificado nas folhas de espécies não pioneiras do presente estudo parece estar associado a maior longevidade foliar dessa classe (POORTER e BONGERS, 2006). De acordo com estes autores, folhas com maior longevidade são densas e caras para serem produzidas, porém, têm maior espessura

e são capazes de resistir a danos físicos e impedir herbívoros generalistas. Folhas mais densas resultam de células densamente empacotadas, levando à limitação de difusão do CO₂ dentro da folha, e conseqüentemente, proporcionando menores taxas fotossintéticas (PORTES et al., 2010).

A possível maior atividade fotossintética das espécies pioneiras pode ter refletido na maior translocação dos fotoassimilados do órgão fonte (folhas) para o órgão dreno (caule), confirmado pelas maiores concentrações dos açúcares solúveis no caule das espécies dessa classe sucessional. Considerando que os fotoassimilados não foram utilizados mais eficientemente na síntese de celulose, hemiceluloses e lignina (menores teores de polímeros de parede celular em relação as espécies não pioneiras), podemos deduzir que a taxa da respiração celular seja maior do que a biossíntese dos polímeros de parede celular nas espécies pioneiras. Tal hipótese é sustentada pela informação de que as espécies dessa classe sucessional apresentam maior velocidade de crescimento (POORTER e BONGERS, 2006; POORTER et al., 2010; LI et al., 2016; MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016) o que exige maior demanda de compostos ricos em carbono para a respiração celular (PORTES et al. 2010; LI et al., 2016; MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016).

Diferente das pioneiras, as espécies não pioneiras apresentaram maiores teores de polímeros de parede celular no caule relacionado com a menor taxa de crescimento (KING et al., 2005; POORTER e BONGERS, 2006; POORTER et al., 2010) e menor taxa de respiração celular das espécies tolerantes à sombra (PORTES et al., 2010; MARTÍNEZ-VILALTA et al., 2016). Com isso, a maior concentração dos fotoassimilados estimularia a atividade da enzima celulose sintase (GIBEAUT et al., 2001). O maior teor de celulose verificado em espécies não pioneiras desse estudo parece contribuir para a resistência à tração paralela das fibras, devido a presença de fortes ligações covalentes nos anéis piranose e entre unidades de glicose da cadeia do polímero de celulose. Já a lignina é parcialmente responsável por sua resistência à compressão (GARCÍA HORTAL, 2007).

A grande diferença encontrada nos resultados de lignina comparado com a celulose e hemiceluloses foram determinantes na diferenciação dos dois grupos ecológicos aqui avaliados, em virtude da diferença verificada entre as duas classes sucessionais e os órgãos na concentração deste polímero, que no caule foi de 122% e nas folhas de 133%. KIRST et al. (2004) estudando a relação da lignina com o crescimento de espécies arbóreas indicaram uma clara associação entre a composição da parede celular e o crescimento da planta. Estes autores relataram que a transcrição dos genes que codificam enzimas da via biossintética de monolignóis, precursores da síntese de lignina, são mais eficientes em árvores de crescimento lento confirmado pela maior relação siringila/guaiacila (*S/G*), unidades precursoras da lignina. Segundo NOVAES et al. (2010), a alocação de carbono para a síntese de lignina é mais eficiente do que o dreno dos carboidratos para a síntese de celulose e hemiceluloses em espécies de crescimento lento como as não pioneiras.

As hipóteses levantadas nesse estudo foram confirmadas onde se constatou que as espécies pioneiras apresentaram maiores teores de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) no caule, enquanto as não pioneiras exibiram maiores teores de amido nas folhas e de polímeros de parede celular (celulose, hemiceluloses e lignina) nos órgãos fonte e dreno.

5 | CONCLUSÃO

De todas as variáveis analisadas, os polímeros de parede celular foram os que mostraram diferenças relevantes entre as espécies pioneiras e não pioneiras desse estudo. Deste modo, a determinação dos polímeros de parede celular é o mais indicado para classificação de espécies pioneiras e não pioneiras devido a maior estabilidade dessas moléculas. Todavia, dentre os polímeros a lignina foliar e caulinar apresentou maior diferença entre as duas classes sucessionais, especialmente em folhas. Considerando a facilidade de coleta e procedimento de análise, concluímos que a determinação de lignina foliar é a mais indicada para auxiliar na classificação de espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras da Floresta Atlântica do estado do Espírito Santo.

REFERÊNCIAS

ALBERT, C.H.; THUILLER, W.; YOCCOZ, N.; SOUDANT, A.; BOUCHER, F.; SACCONI, P.; LAVOREL, S. Intraspecific functional variability: extent, structure and sources of variation. **Journal of Ecology**, v. 98, n. 3, p. 604–613, 2010.

AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, p. 425–431, 2007.

BRENDEL, O.; LOSETTA, P.P.M.G.; STEWART, D. A rapid and simple method to isolate pure alpha cellulose. **Phytochemistry Analysis**, v. 17, p. 7–10, 2000.

BUDOWSKI, G.N. Distribution of tropical American rain forest species in the light of sucessional process. **Turrialba**, v. 15, p. 440–442, 1965.

CARPITA, N.C.; KANABUS, J. Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. **Analytical Biochemistry**, v. 161, n. 1, p. 132–139, 1987.

DOS SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.; NAKAMURA, C.V.; MOURÃO, K.S.M. MANGOLIN, C.A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230–1241, 2008.

ELLIS, A.R.; HUBELL, S.P.; POTVIN, C. In situ field measurements of photosynthetic rates of tropical tree species: a test of the functional group hypothesis. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, p. 1336–1347, 2000.

FINEGAN, B. Forest succession. **Nature**, v. 312, p. 109–114, 1984.

FRIGERI, R.B.C. Relação entre raiz e parte aérea de plântulas de espécies arbóreas tropicais sob diferentes níveis de radiação solar. **Tese de Doutorado em Biologia Vegetal**, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2007. 152p.

GARCÍA HORTAL, J.A. **Fibras papeleras**. Barcelona: UPC, 2007. 243p.

GIBEAUT, D.M.; CRAMER, G.R.; SEEMANN, J.R. Growth, cell walls, and UDP-Glc dehydrogenase activity of *Arabidopsis thaliana* grown in elevated carbon dioxide. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 5, p. 569–576, 2001.

HARDING, S.A.; JARVIE, M.M.; LINDROTH, R.L.; TSAI, C.J. A comparative analysis of phenylpropanoid metabolism, N utilization, and carbon partitioning in fast- and slow-growing *Populus* hybrid clones. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 3443–3452, 2009.

KING, D.A.; DAVIES, S.J.; NUR SUPARDI, M.N.; TAN, S. Tree growth is related to light interception and wood density in two mixed dipterocarp forests of Malaysia. **Functional Ecology**, v. 19, p. 445–453, 2005.

KIRST, M.; MYBURG, A.A.; De LEON, J.P.; KIRST, M.E.; SCOTT, J.; SEDEROFF, R. Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2368–2378, 2004.

KITAJIMA, K. Cotyledon functional morphology, patterns of seed reserve utilization and regeneration niches of tropical tree seedlings. In: SWAINE, M.D. (Ed.) **The ecology of tropical forest tree seedlings**. Parthenon Publishing Group, Paris, France, p. 193–210, 1996.

LI, N.; NIANPENG, H.; YU, G.; WANG, Q.; SUN, J. Leaf non-structural carbohydrates regulated by plant functional groups and climate: evidences from a tropical to cold-temperate forest transect. **Ecological Indicators**, v. 62, p. 22–31, 2016.

LIMA, J.D.; SILVA, B.M.S.; MORAES, W.S.; DANTAS, V.A.V.; ALMEIDA, C.C. Efeitos da luminosidade no crescimento de mudas de *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae). **Acta Amazonica**, v. 38, p. 5–10, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 2, 2002. 368p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5. ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2008. 384p.

MARTÍNEZ-VILALTA, J.; SALA, A.; ASENSIO, D.; GALIANO, L.; HOCH, G.; PALACIO, S.; PIPER, F.I.; LLORET, F. Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis. **Ecological Monographs**, v. 86, n. 4, p. 495–516, 2016.

NOGUEIRA, A.; MARTINEZ, C.A.; FERREIRA, L.L.; PRADO, C.H.B.A. Photosynthesis and water use efficiency in twenty tropical tree species of differing succession status in a Brazilian reforestation. **Photosynthetica**, v. 42, n. 3, p. 351–356, 2008.

- NOVAES, E.; KIRST, M.; CHIANG, V.; WINTER-SEDEROFF, H.; SEDEROFF, R. Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees. **Plant Physiology**, v. 154, p. 555–561, 2010.
- POLLOCK, C.J. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. **New Phytologist**, v. 104, p. 1–24, 1986.
- POORTER, L.; BONGERS, F. Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. **Ecology**, v. 87, n. 7, p. 1733–1743, 2006.
- POORTER, L.; MCDONALD, I.; ALARCÓN, A.; FICHTLER, E.; LICONA, J.; PEÑA-CLAROS, M.; STERCK, F.; VILLEGAS, Z.; SASS-KLAASEN, U. The importance of wood traits and hydraulic conductance for the performance and life history strategies of 42 rainforest tree species. **New Phytologist**, v. 185, p. 481–492, 2010.
- PORTES, M.T.; DAMINELI, D.S.C.; RIBEIRO, R.V.; MONTEIRO, J.A.F.; SOUZA, G.M. Evidence of higher photosynthetic plasticity in the early successional *Guazuma ulmifolia* Lam. compared to the late successional *Hymenaea courbaril* L. grown in contrasting light environments. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 75–83, 2010.
- REICH, P.B.; WRIGHT, I.J.; CAVENDER-BARES, J.; CRAINE, J.M.; OLEKSYN, J.; WESTOBY, M.; WALTERS, M.B. The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies. **International Journal of Plant Science**, v. 164, p. 143–164, 2003.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.
- SCHÄDEL, C.; BLÖCHL, A.; RICHTER, A.; HOCH, G. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 1–8, 2010.
- SOUZA, R.P.; VÁLIO, I.F.M. Seedling growth of fifteen Brazilian tropical tree species differing in successional status. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 35–47, 2003.
- SWAINE, M.D.; WHITMORE, T.C. On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. **Vegetatio**, v. 75, n. 1, p. 81–86, 1988.
- WHITMORE, T.C. Tropical rain forest dynamics and its implications for management. *In*: GOMES-POMPA, A.; WHITMORE, T.C.; HADLEY, M. (Eds.) **Rain Forest Regeneration and Management**. Paris, UNESCO and The Paragon Publishing Group, p. 67–89, 1990.

PRODUÇÃO E VARIAÇÕES QUÍMICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS: UMA BREVE REVISÃO SOBRE OS FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE E A QUANTIDADE

Data de aceite: 06/02/2020

Data de submissão: 09/11/2019

Ygor Jessé Ramos

Doutorando, Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3271824948370332>

Jéssica Regina Sales Felisberto

Mestranda, Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8276429436003589>

Claudete da Costa - Oliveira

Mestranda, Pós-graduação em Pesquisa Translacional em Fármacos e Medicamentos, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2542263326143652>

Elisama Duarte de Pontes

Mestranda, Pós-graduação em Pesquisa Translacional em Fármacos e Medicamentos, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1590026264641174>

Daniel de Brito Machado

Mestrando, Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1030945110658186>

Irene Candido Fonseca

Iniciação Tecnológica, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7423354520981285>

Davyson de Lima Moreira

Pesquisador Titular, Departamento de Produtos Naturais, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7863875298510179>

RESUMO: A regulação biossintética dos constituintes de óleos essenciais é determinada por expressão gênica, no entanto, sabe-se que a síntese de metabólitos especiais está intimamente relacionada com as respostas ao meio no qual o vegetal está inserido. Portanto, este capítulo tem como objetivo realizar uma breve revisão dos diversos fatores que podem alterar a qualidade, produção e composição química de óleos essenciais. Abordagem centrada, também, nos fatores classificados como bióticos, abióticos e os provenientes de ações de transformações de plantas com potenciais econômicos. Com o levantamento

realizado, registra-se que as concentrações de substâncias presentes em óleos essenciais são frequentemente afetadas por diferentes fatores, como temperatura, intensidade luminosa, estresse hídrico, disponibilidade de nutrientes no solo, predação, parasitismo, ciclo circadiano, sazonalidade, estímulos mecânicos, dentre outros. Igualmente, imprecisões nos processos de manipulação da planta, da qual serão obtidos os óleos essenciais, também exercem força atuante no acúmulo de metabólitos especiais que constituem os óleos essenciais, tendo como exemplo as condições de coleta, monda, limpeza, bioeliminação, armazenamento, processos de secagem, estabilização, cominuição e os diferentes tipos de extrações. Estes fatores podem causar uma alteração significativa na qualidade e quantidade das substâncias químicas componentes de óleos essenciais. Muitas das vezes é difícil atribuir uma mudança a um fator específico, pois geralmente, a influência é complexa e envolve vários agentes de estresse simultaneamente, alterando as características dos voláteis, particularmente, a composição química que está diretamente associado ao seu valor terapêutico. Nesse contexto, a compreensão dos aspectos que atuam no controle de qualidade e produção de óleos essenciais é um tema importante a ser investigado e merece atenção por parte da comunidade científica, pois podem ocasionar problemas de saúde, implicações ecológicas e industriais.

PALAVRAS-CHAVE: Ecologia química; Fatores Abióticos; Fatores Bióticos; Tecnologia Farmacêutica.

PRODUCTION AND CHEMICAL VARIATIONS OF ESSENTIAL OILS: A BRIEF REVIEW OF FACTORS AFFECTING QUALITY AND QUANTITY

ABSTRACT: The biosynthetic regulation of essential oil constituents is determined by gene expression, however, it is known that the synthesis of special metabolites is closely related to the responses to the environment in which the vegetable is introduced. Therefore, this chapter aims to conduct a brief review of the many factors that may alter the quality and production of essential oils. Approach also focused on factors classified as biotic, abiotic and those resulting from actions of plant transformations with economic potential. Based on literature records, it was registered that the concentrations of the substances in the essential oils would often be affected by different factors, such as temperature, light intensity, water stress, soil nutrients, predation, parasitism, circadian cycle, seasonality, mechanical stimuli, among others. Likewise, inaccuracies in the handling processes of the plant, from which the essential oils will be obtained, also exert an active force in the accumulation of these metabolites, such as the conditions of collection, weeding, cleaning, bioelimination, storage, drying processes, stabilization, comminution and the different types of extractions. These factors can cause a significant change in the composition of the volatiles. It is often difficult to assign a change to a specific factor, as the influence is often complex and involves several stressors simultaneously, changing the characteristics of volatiles, particularly the chemical composition that is directly associated with their therapeutic value. In this context, the understanding of the aspects that act in the quality control and production of essential

oils is an important subject to be investigated and deserves attention from the scientific community, as they may cause health problems, ecological and industrial implications.

KEYWORDS: Chemical ecology; Abiotic factors; Biotic factors; Pharmaceutical technology.

1 | INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OE) são misturas complexas de substâncias lipossolúveis, voláteis, geralmente odoríferas e aromáticas produzidas a partir do metabolismo especial de plantas. Geralmente, essa mistura é composta de substâncias como os terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), arilpropanoides e, raramente, substâncias leves sulfuradas e nitrogenadas (MAGEL *et al.*, 2006; LEE; DING, 2016).

O acúmulo dessas micromoléculas em misturas complexas tem ação de proteção e sinalização inter e intra-específica para o vegetal, ademais, estudos recentes demonstraram a sua relevância para a saúde humana (BOUYAHYA *et al.*, 2017; SALEHI *et al.*, 2018; SALEM *et al.*, 2018;).

Em geral, a regulação biossintética dos constituintes químicos dos OE é determinada por expressão gênica, no entanto, sabe-se que a qualidade da constituição fitoquímica dos OE produzida pelo vegetal pode sofrer variações decorrentes da influência de processos bioquímicos, ecológicos, fisiológicos, ambientais e manipulação da planta (YOSR *et al.*, 2013; BOUYAHYA *et al.*, 2017). Assim, os voláteis podem se converter facilmente por reações de oxidação, isomerização, ciclização polimerização ou desidrogenação, acionadas enzimaticamente ou quimicamente. Essa variação causada pelas respostas ambientais e fisiológicas tem sido um dos principais obstáculos para garantir a qualidade de OE, como também, a colheita, pós-colheita e ações de transformações na produção industrial de fitomedicamentos e até mesmo de cosméticos (BOUYAHYA *et al.*, 2017; SALEHI *et al.*, 2018; SALEM *et al.*, 2018).

Portanto, este capítulo tem como objetivo realizar uma breve revisão dos diversos fatores que podem alterar a qualidade, produção e composição química de OE. Abordagem centrada, também, nos fatores classificados como bióticos, abióticos e os provenientes de ações de transformações de plantas com potenciais econômicos.

2 | QUAIS SÃO AS FUNÇÕES EXERCIDAS POR ÓLEOS ESSENCIAIS E QUAIS FATORES ALTERAM SUA COMPOSIÇÃO?

Os OE exercem várias funções ecológicas, dentre essas estão a comunicação entre plantas (volatilização e lixiviação); defesa contra outras plantas (alelopatia positiva e negativa); defesa contra parasitas, incluindo fungos e bactérias; defesa contra herbivoria; atração de disseminadores de sementes e polinizadores; interação com feromônios; proteção contra estresses ambientais (antioxidantes); atração de

inimigos naturais de herbívoros (ABBAS *et al.*, 2017; LOAIZA; CÉSPEDES, 2007).

Vale ressaltar que a biossíntese da maioria dos metabólitos especiais, incluindo terpenos e arilpropanoides, tende a ocorrer em estágios específicos durante o desenvolvimento da planta e dentro de tecidos específicos. Dependendo do tecido/ parte da planta em estudo, composições químicas totalmente diferentes podem ser obtidas (ABBAS *et al.*, 2017; YU; UTSUMI, 2009). Essa diferenciação na distribuição/ armazenamento dos processos de biossíntese e de substâncias que compõe os OE nos diferentes compartimentos vegetativos tem inter-relação com a questão evolutiva específica de cada táxon, denominado de co-evolução bioquímica. Esse fato sugere uma especialização a depender das relações ecológicas estabelecidas durante a história dessa espécie no ambiente (GOTTLIEB *et al.*, 1996; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; GOTTLIEB *et al.*, 2012).

O ambiente também influencia de forma direta na produção/composição química dos OE nas plantas de maneira qualitativa e quantitativa. As plantas respondem aos estímulos externos, com finalidade de sobreviver às adversidades impostas, através de modificações morfológicas ou fisiológicas como respostas imediatas. Dessa forma, didaticamente, é possível compreender que os fatores que influenciam/ alteram a produção de OE são três: os **bióticos**, **abióticos** e **bioquímicos/genéticos** (GOTTLIEB *et al.*, 2012; LOAIZA; CÉSPEDES, 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os fatores bióticos envolvem a própria planta, como o estágio de desenvolvimento dos órgãos, dos tecidos, das células produtoras e dos estágios fenológicos. Outrossim, ainda existem modificações associadas às funções ecológicas, anteriormente mencionadas (ABBAS *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; LOAIZA; CÉSPEDES, 2007);

Os fatores abióticos podem ser considerados aqueles que são derivados de aspectos físicos, químicos ou físico-químicos do meio ambiente, tais como a qualidade luminosa disponível, variações climáticas (umidade relativa, ventos, temperatura e precipitações), disponibilidade de nutrientes e de água, danos físicos, composição atmosférica (poluição), presença de reguladores do crescimento e variações sazonais (ABBAS *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; LOAIZA; CÉSPEDES, 2007);

Os fatores genéticos e bioquímicos são os intrínsecos, tais como as multifuncionalidades enzimáticas, alterações epigenéticas que incluem mudanças na estrutura da cromatina (remodelação da cromatina/ metilação do DNA), transcrição de genes inativos, como também estenose do cromossomo (dilatação, duplicação, inversão, translocação, *crossing over*) (ABBAS *et al.*, 2017; YU; UTSUMI, 2009; LOAIZA; CÉSPEDES, 2007).

Entende-se que esses fatores não são dissociados e somam-se uns aos outros (ABBAS *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Essas alterações nas composições químicas dos OE, derivadas da diversidade de rotas metabólicas e de enzimas catalisadoras de múltiplos substratos, direcionam-se a promover riquezas estruturais e uma complexidade biossintética em plantas, que muitas das vezes, apresentam-se

restritas a uma determinada família vegetal e, em alguns casos, em uma única espécie (WENG *et al.*, 2012).

3 | COMO A BIODIVERSIDADE CORROBORA COM A VARIAÇÃO QUÍMICA E PROMOVE CLASSIFICAÇÕES PARA OS ÓLEOS ESSENCIAIS?

A quimiodiversidade ou diversidade química é oriunda das diversas variações proveniente das relações entre e intra os ecossistemas existentes, por meio da plasticidade fenotípica (GUO *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2012).

Assim como a biodiversidade, entender os conceitos de variações intraespecíficas é fundamental para compreender a quimiodiversidade. Ainda, as variações são medidas pelas expressões fenotípicas (fisiológico e morfológico), que são derivadas de um genótipo, quando exposto a diferentes ambientes (GUO *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2012).

Os OE são misturas que possuem classes de substâncias com o maior número em diversidade estrutural, sendo, então, importantes para os estudos sobre variações químicas em plantas e de contribuições para o entendimento da quimiodiversidade. Como resultado, a característica mais apreciável nos OE é o aspecto sensorial olfativo, pois as alterações associadas às variações na composição química, frequentemente, são perceptíveis ao sistema olfativo humano e animal (SIMÕES *et al.*, 2017).

Até o final do Século XIX, pesquisadores já possuíam a compreensão de que os OE podiam ter sua composição química modificada de acordo com a região na qual as plantas eram cultivadas. Sendo assim, os OE comerciais recebiam, muitas vezes, o nome dessas regiões, que se denominavam geotipos (WOLFFENBÜTTEL, 2016). A primeira tentativa de classificação desses OE foi proposta em 1975 por Pierre Franchomme, com uma terminologia denominada por ele como “assinatura bioquímica das plantas”, ou *chemotype* (ou *chimiotype* ou *race chimique*). Esses **quimiotipos** (QT) tinham como definição apenas a variação no componente principal dos OE de uma mesma espécie, nos diferentes ambientes. Em 2006, essa definição foi formalizada pela União Europeia pelo *Registration, evaluation and authorisation of chemicals* (REACH) (FRANCHOMME *et al.*, 2001).

Com os avanços dos estudos sobre os polimorfismos químicos dos OE surgiram diversos conceitos associados aos termos de Pierre Franchomme. O significado somente atinge a mais ampla compreensão, até o momento, quando foram considerados os fatores extrínsecos (a soma dos fatores bióticos, abióticos e de ações antrópicas), e fatores intrínsecos (fatores bioquímicos e genéticos) (Figura 2). O entendimento sobre os fenômenos das variações intraespecíficas ampliou o conceito de QT e houve a introdução de outras classificações para OE, entre essas estão **geotipo** e **ecotipo**. Assim, esses termos são definidos como:

I - Quimiotipos (*i.e.* raça química): variações intraespecíficas contínuas expressas na alteração da substância química majoritária do OE de uma espécie,

que são derivadas de pequenas alterações genéticas, e que proporcione pouco ou nenhum efeito na morfologia e grande mudança no fenótipo químico, sem inviabilizar o cruzamento com sucesso com outro membro da mesma espécie e podendo garantir a transferência da modificação hereditariamente. Tem como requisito uma expressão fenotípica química diferente, mesmo quando cultivado em ambiente diferente do habitat, com a existência de uma mesma espécie com elevado grau de concordância no genótipo (GUO *et al.*, 2008; HILAN *et al.*, 2011; POLATOGLU, 2013; HASHEMI *et al.*, 2018).

II – Ecotipos (*i.e.* raça ecológica): variações intraespecíficas contínuas expressas na alteração da substância química majoritária do OE de uma espécie, derivadas de alterações genéticas, com modificações morfológicas significativas e sem inviabilizar o cruzamento com sucesso com outro membro da mesma espécie. Tem como requisito a possibilidade de ter uma expressão fenotípica química e morfológica diferente, mesmo quando cultivado em ambiente diferente do habitat, com a existência de uma mesma espécie com elevado grau de concordância no genótipo (GUO *et al.*, 2008; HASHEMI *et al.*, 2018).

III – Geotipos (*i.e.* respostas ambientais; variações químicas): variações intraespecíficas descontínuas expressas nas alterações da substância química majoritária do OE de uma espécie, derivados, exclusivamente, das pressões associadas aos fatores abióticos e bióticos, sem inviabilizar o cruzamento com sucesso com outro membro da mesma espécie. Estes polimorfismos químicos estão associados aos processos de aclimatização, tendo como requisito ter uma expressão fenotípica química e morfológica igual, mesmo quando cultivado em ambiente diferente do habitat, com a existência de uma mesma espécie com elevado grau de concordância no genótipo (KURLOVICH, 1998; GUO *et al.*, 2008; WOLFFENBÜTTEL, 2016; HASHEMI *et al.*, 2018;).

Na literatura, muitas vezes, o termo QT é utilizado como sinônimo para geotipo e ecotipo. Para Guo e colaboradores (2008) esse fato advém da carência de orientação teórica sistemática sobre a temática. Segundo esses autores, existe uma relação muito alta entre o aumento de plasticidade fenotípica e o ecotipo. Relatam também, que existe uma relação entre plasticidade fenotípica morfológica com os quimiotipos, mas não é condicionante. Então, é postulado que todo QT pode ser um ecotipo e nem todo ecotipo é um QT (Figura 1). Para isso, é necessária uma análise sobre todos os fatores (ambientais e morfológicos), com finalidade de atribuir corretamente o conceito aos resultados (GUO *et al.*, 2008; POLATOGLU, 2013).

Comumente, o termo geotipo não é mais empregado cientificamente, apenas com finalidades comerciais, adotando apenas a nomenclatura variação química e para descrever OE típicos de uma certa regiões (HASHEMI *et al.*, 2018; WOLFFENBÜTTEL, 2016). O termo ecotipo foi introduzido recentemente para os estudos de OE (GUO *et al.*, 2008). Alguns autores apontam a existência dos QT em OE como um processo de especiação (FRELLO; HESLOP-HARRISON, 2000; TAVARES *et al.*, 2005).

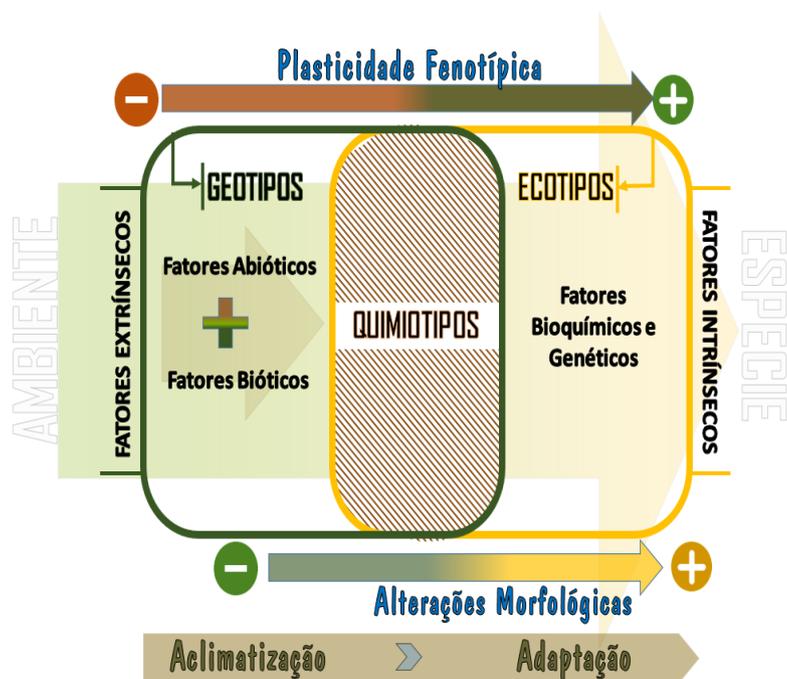


Figura 1. Esquema representativo das relações entre os conceitos de quimiotipos, ecotipos e geotipos em relações aos fatores de influência na produção de óleos essenciais, plasticidade fenotípica e o processo de aclimatização e adaptação.

A plasticidade fenotípica química em OE é vista como amplitude da variabilidade do fenótipo frente às mudanças ambientais, permitindo as plantas apresentarem diversas atividades biológicas (BRADSHAW, 1965; KAMADA *et al.*, 1999). Igualmente aos fatores culturais e genéticos, essas variabilidades químicas (genética-ambiente) podem justificar as diferenças de recomendações terapêuticas para plantas medicinais pelo saber popular em diferentes regiões (KAMADA *et al.*, 1999; HALBERSTEIN, 2005). Ainda, as ações de transformações realizadas pelo homem sobre os vegetais podem ocasionar alterações na composição química de OE. Na figura 2 são demonstrados diversos fatores que alteram a composição química de OE, entre esses estão: estágio de desenvolvimento e fase fenológica; variações no genótipo; herbívora/ patogénia; atração de polinizadores; disponibilidade hídrica e umidade; poluição atmosférica; Intensidade luminosa e temperatura; variações na composição química do solo; altitude, latitude e longitude; ações de transformações das plantas com potenciais econômicos (colheita e processamentos pós-colheita).

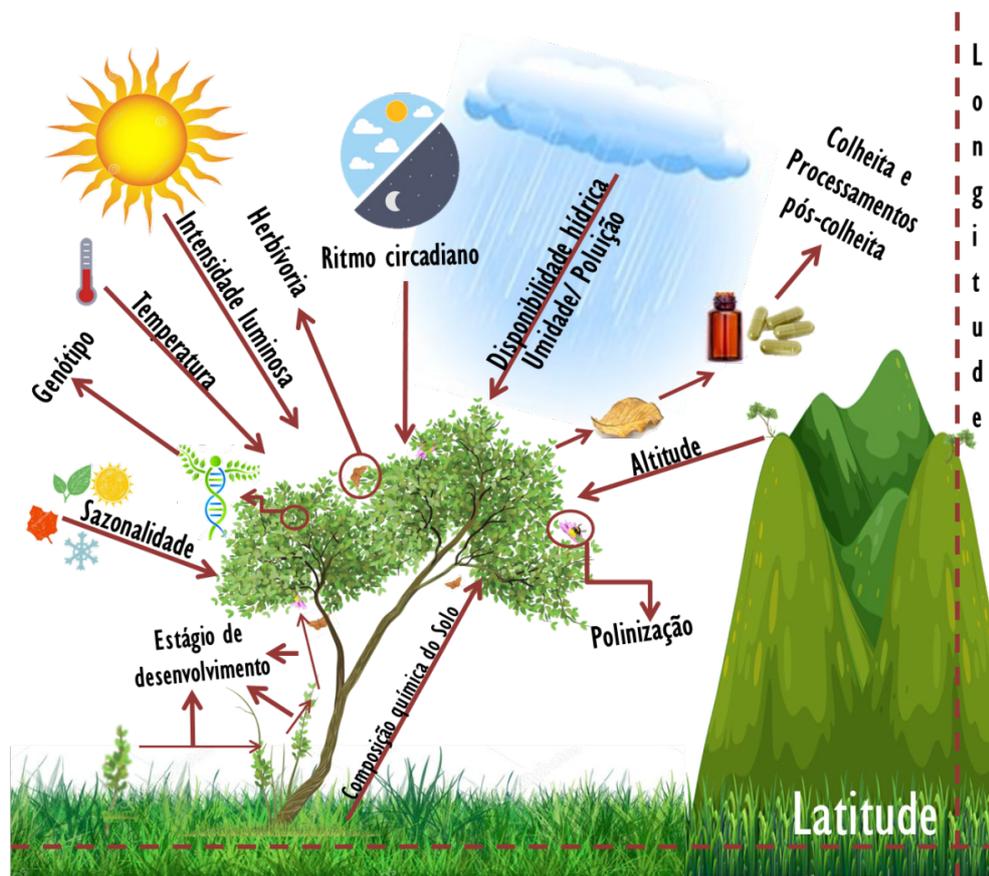


Figura 2. Principais fatores que podem afetar a composição química dos óleos essenciais em espécies vegetais

4 | ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTOS FOLIARES E VEGETATIVO

Os OE são produzidos por estruturas secretoras especializadas como glandulares, células de parênquima diferenciadas e ainda canais oleíferos. A síntese de isoprenos é regulada pelo gene *IspS* (isopreno sintase) que está presente em apenas alguns gêneros de plantas (DANI *et al.*, 2014; LANTZ, 2019). Embora a produção seja realizada por células específicas, os OE podem ser encontrados em diferentes órgãos vegetais, por exemplo, flores, frutos, cascas, raízes e lenhos, e estes podem apresentar diferente composição química, mesmo sendo obtido a partir de um mesmo indivíduo (YOSR *et al.*, 2013, WANZALA *et al.*, 2016).

Durante o processo de desenvolvimento da planta, algumas vias biogénicas produtoras de terpenos são acionadas no primeiro momento de surgimento dos cotilédones, no entanto, a síntese de determinados produtos do metabolismo especial dessa via não se iniciam até que todas as vias biogénicas sejam acionadas completamente (LI *et al.*, 2013).

Análises comparativas entre OE produzido por folhas em diferentes estágios de crescimento demonstram que tanto o rendimento quanto a composição química apresentam variação significativas, sendo que essas influências são diferentes para cada táxon (GENG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2015; BASIRI *et al.*, 2019).

Estudo de correlação entre a idade foliar e o rendimento de OE de espécies

aromáticas tem sido realizados. Estes estudos descrevem que o maior rendimento é encontrado por folhas nos estágios iniciais de maturação e, conforme a folha chega à maturação completa, este rendimento é reduzido. Essa observação é explicável, pois, ao alcançar à maturação máxima e cessar a expansão do limbo foliar, a produção de OE será menor e a abundância diminuirá devido à evaporação e/ou degradação das substâncias presentes nos OE (LI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015).

É possível, ainda, correlacionar o rendimento dos OE com a densidade das células oleíferas e o grau de desenvolvimento destas de modo que à medida que a folha se aproxima da idade degenerativa ocorre uma maior degradação dessas células, causando diminuição no rendimento do OE (LI *et al.*, 2013; LEE; DING, 2016). Além do rendimento, a composição química também foi correlacionada com a idade foliar. Folhas mais jovens tendem a produzir maior quantidade de diferentes substâncias se comparadas a folhas maduras (LI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015). No entanto, cada espécie vai responder de forma diferente a estas variáveis e, geralmente, a idade foliar causará influência na variação da qualidade e quantidade das frações voláteis (LI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015; LEE; DING, 2016). Normalmente, as folhas próximas do estágio de senescência terão menor rendimento de voláteis, pois o processo de senescência implica na redução da atividade metabólica, além de redução da área ativa de fotossíntese. Consequentemente, para a produção de OE com alta qualidade em constituintes químicos, bem como grande rendimento, faz-se necessário estudo que avalie o grau de influência desses parâmetros (LEE; DING, 2016).

Além do estágio de desenvolvimento da folha, a identificação dos eventos fenológicos possibilita correlacionar as condições adequadas que favorecerão a biossíntese de substâncias desejadas, assim como o melhor rendimento do OE (YOSR *et al.*, 2013; FLAMINI *et al.*, 2013; ESMAEILI *et al.*, 2018; SALEM *et al.*, 2018; FARHAT *et al.*, 2019). Estudos recentes destacam que há uma tendência de aumento de rendimento de OE em diferentes partes vegetativas no período de floração e frutificação (YOSR *et al.*, 2013; FLAMINI *et al.*, 2013; ESMAEILI *et al.*, 2018; SALEM *et al.*, 2018; FARHAT *et al.*, 2019). Contudo, resultados encontrados por Wannes e Marzouk (2012) ao estudar o OE produzido por *Myrtus communis* var. *baetica* (L.) Casares & Tito, evidenciaram uma diminuição no rendimento de OE nas folhas à medida que os frutos foram madurando.

Além do rendimento, a composição química dos OE também apresentam variações em função dos estágios fenológicos. É descrito na literatura que é possível obter determinada substância no estágio vegetativo e a mesma não ser detectada no estágio reprodutivo (YOSR *et al.*, 2013; FLAMINI *et al.*, 2013; ESMAEILI *et al.*, 2018). Alguns autores explicam que essas variações na concentração de substâncias estão associadas à ontogenia e às modificações morfológicas (aumento no tamanho, número e na densidade das glândulas individuais, à medida que ocorre a maturação das plantas). Isto pode causar influência direta na variação e na qualidade do OE produzido (LEE; DING, 2016; SALEM *et al.*, 2018). De qualquer forma, embora exista

uma relação entre as características apresentadas pelos OE com as fenofases, esta última é influenciada diretamente pelas condições atmosféricas, principalmente pela temperatura e intensidade luminosa (MAGEL *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2012; SALEM *et al.*, 2018). Por fim, ainda há possibilidades de a fenologia não causar nenhuma influência na qualidade e quantidade de OE, assim como foi descrito por Yosr e colaboradores (2013).

Assim sendo, conhecer a fenologia e estágio de desenvolvimento de uma planta é fundamental para que seja possível um manejo racional de forma a definir a melhor época de colheita, pois dependendo da finalidade do uso do OE este deve ser obtido em momentos específicos das fenofases, já que a variação da constituição acarreta divergências nos efeitos biológicos desejáveis.

5 | HERBIVORIA E PATOGENIA

Sabe-se que os constituintes voláteis variam de maneira quantitativa e qualitativa em resposta aos ataques de herbívoros e agentes patogênicos. No entanto, as plantas desenvolveram alternativas para sanar os prejuízos causados por essa interação ecológica (DICKE; LORETO, 2010; TROWBRIDGE *et al.*, 2013; MAURYA, 2019).

Os OE são conhecidos por apresentarem função de defesa contra outros organismos. Essa defesa pode ser direta, que afeta diretamente o desempenho do inseto/patógeno; ou indireta, na qual substâncias emitidas pela planta atraem parasitas e predadores do inseto fitófago (MARANGONI *et al.*, 2013). Essas interações são conhecidas como aleloquímicas. Em caso de defesa direta, por exemplo, tem-se que os monoterpenos α - e β -pinenos, 3-careno, limoneno, mirceno, α -terpineno e canfeno apresentam excelente atividade inseticida, atuando como inibidores ou retardadores de crescimento, danos na maturação, redução da fertilidade, supressores de apetite, alteração de comportamento, dentre outros (MARANGONI *et al.*, 2013). Com relação ao rendimento dos OE extraído de plantas altamente predadas ou infectadas por patógenos, há uma tendência de diminuição, pois com a predação ocorre a diminuição da área foliar, e conseqüentemente, afeta os parâmetros da taxa fotossintética (COPOLOVICI *et al.*, 2014). No entanto, essa produção pode, ainda, ser intensificada, como é o caso de folhas de *Pinus pinaster* Ailton submetidas a infecções com micélio de *Verticicladiella* sp. que aumentou em 60 vezes o rendimento de seu OE.

Copolovici e colaboradores (2014) demonstraram uma variação na quantidade do monoterpeno ocimeno em folhas de *Quercus robur* L. em função do ataque da mariposa *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae). Esse aumento foi correlacionado com a ativação da enzima ocimeno-sintase causada pelo contato com substâncias elicitórias presentes na saliva da mariposa.

A emissão de substâncias voláteis, normalmente, se dá logo após uma lesão ocorrida na folha e, conseqüentemente, nas células vegetais. Porém, estudos revelam que muitos terpenos somente são produzidos após ataques de alguns insetos ou

outros herbívoros, e não após um dano lesivo mecânico qualquer. Novamente tem-se como exemplo, folhas de *P. pinaster* Ailton que foram perfuradas para mimetizar um ataque. Neste caso houve um aumento de duas vezes no rendimento do OE, pouco se comparado ao rendimento demonstrado por folhas infectadas (MITHOFER *et al.*, 2005). Isto ocorre pela presença de detectores distintos na saliva dos herbívoros que são essenciais para a produção de novos constituintes voláteis, também específicos. Por exemplo, detectores na saliva de herbívoros estimulam a produção de ácido jasmônico em alguns OE, resultando em um potente inibidor da ação lesiva destes predadores (HEIL, 2009).

Voláteis também podem exercer um papel de excelência na defesa contra fungos e bactérias. Um estudo realizado com crisântemos (*Chrysanthemum* sp., Asteraceae) demonstrou uma significativa distinção entre os constituintes voláteis de plantas infectadas com microrganismos em relação ao grupo controle, o que demonstra papel fundamental na atividade antifúngica (PIESIK-DARIUSZ *et al.*, 2015).

A predação foliar por herbívoros pequenos não causa grandes prejuízos a áreas foliares nem variação na constituição de voláteis, porém, a exposição a um número exacerbado de predadores pode causar grandes impactos na folha, diminuindo a taxa fotossintética e causando alterações da composição química dos OE. Fatores abióticos incluindo a herbívora por insetos têm levado ao declínio de grandes populações de carvalho (COPOLOVICI *et al.*, 2017).

6 | ATRAÇÃO DE POLINIZADORES

Como organismos sésseis, as plantas utilizam de um vasto número de substâncias aleloquímicas que permitem um rico “diálogo” com espécies opositoras e cooperadoras (MAFFEI, 2010). Em muitas angiospermas, em seu estágio de maturação floral, há uma grande proliferação e emissão de constituintes voláteis para atrair insetos que farão a polinização cruzada da espécie (HOSSAERT-MCKEY *et al.*, 2010).

Variações intraespecíficas e interespecíficas dos voláteis acontecem demasiadamente em indivíduos no período de floração, com a função de produzir uma grande quantidade de sinais específicos que irão atrair polinizadores para uma área onde a fecundação não ocorreu (CORNILLE *et al.*, 2012). Porém, após a fecundação, é válido para a planta não atrair polinizadores para o estigma para que ao invés de auxiliarem o processo de reprodução, atrapalhem a formação do tubo polínico. Para isto, é necessário que as flores tornem-se menos atrativas, o que é conseguido após alteração no padrão de seus emissores voláteis, que reduz a atração de insetos não polinizadores (SCHIESTL; AYASSE, 2001).

Mudanças na composição dos voláteis em espécies de figo (*Ficus hispida* L., *Ficus semicordata* Buch. Ham. ex Sm. e *Ficus curtipes* Corner) apresentaram substituições fundamentais no período de receptividade e pós receptividade das flores. Por exemplo, análises dos OE identificaram a presença do monoterpene ocimeno em

grandes quantidades no período receptivo (período de maior densidade de atração de polinizadores). Por conseguinte, nos períodos pós-receptividade, os constituintes majoritários do OE foram identificados como limoneno e α -pineno, uma mistura sinérgica que pode ter a função dispersora de polinizadores ou tornar a flor menos atrativa (PROFFIT *et al.*, 2018)

Alterações qualitativas também ocorrem em *Salvia verticillata* L. (Lamiaceae), quando a densidade das abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera), aumenta no local de ocorrência de *Setaria verticillata* (L.) P. Beauv., na qual a presença de 1,8-cineol também é demasiadamente alta nos botões florais (GIULIANI *et al.*, 2018).

O estudo feito com duas espécies de orquídeas de clados totalmente distintos mostrou que estas podem adaptar-se ao mesmo nicho ecológico produzindo metabólitos semelhantes para atração de um polinizador específico (NUNES *et al.*, 2017). Assim sendo, é evidente que a busca pela polinização cruzada faz com que as plantas alterem o conteúdo de seus constituintes voláteis para atrair seus polinizadores no período de reprodução. Este fato altera a qualidade do OE a ser obtido.

7 | DISPONIBILIDADE HÍDRICA E UMIDADE

A disponibilidade de água e a umidade possuem grande destaque dentre os fatores abióticos, pois a fotólise da molécula de água fornece substâncias importantes para o processo fotossintético e, por consequência, possibilita a produção de metabólitos especiais. Dessa forma, um estresse por déficit hídrico e/ou a baixa umidade relativa do ar podem afetar a qualidade e quantidade de OE (AKULA; RAVISHANKAR, 2011; JALEEL *et al.*, 2009). As taxas de transpirações celulares são alteradas com alterações na taxa de umidade relativa do ar e, conseqüentemente, a produção do metabolismo especial. Esse efeito pode ser acentuado ou brando, variando de espécie para espécie (KAINULAINEN *et al.*, 1992). Pesquisando os efeitos da disponibilidade hídrica, Solíz-Guerrero e colaboradores (2002) observaram que o teor de substâncias produzidas pelas vias do mevalonato e metileritrose fosfato na espécie quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd., Chenopodiaceae) declinou de 0,46% para 0,38%, em comparação com plantas que cresceram em circunstâncias com baixo déficit hídrico e com alto déficit hídrico, respectivamente (WARD, 2000; AKULA; RAVISHANKAR, 2011).

A limitação hídrica também afeta a quantidade de monoterpenos emitidos pelas plantas. Em um estudo realizado nas árvores *Quercus ilex* L., verificou-se uma redução da produção de monoterpenos durante um período de seca mais pronunciada, no decorrer do verão. Além disso, verificou-se um aumento de 82% da emissão de monoterpenos em árvores irrigadas no período de seca frente às árvores que receberam um tratamento diferente (LAVOIR *et al.*, 2009). Entretanto, em outros estudos observou-se o aumento desse tipo de terpenos quando plantas foram expostas ao estresse hídrico (Quadro 1).

8 | INTENSIDADE LUMINOSA E TEMPERATURA

A produção de OE é influenciada significativamente pela variação da luz e temperatura. Sabe-se que esses parâmetros são fundamentais para a fotossíntese, e pode afetar direta ou indiretamente as vias biossintéticas de metabólitos especiais. Para intensidade luminosa sabe-se que espécies possuem fotorreceptores que regulam o desenvolvimento relacionado às variações da intensidade luminosa, com a finalidade de aperfeiçoar a captação da energia luminosa usada na fotossíntese (GONÇALVES *et al.*, 2003). Algumas investigações confirmam que a biossíntese de terpenos está intimamente ligada às taxas fotossintéticas (MAGEL *et al.*, 2006). No entanto, as respostas biossintéticas da planta não estão restritas apenas a presença ou ausência de luz, mas sim com a qualidade e intensidade da radiação (MARTINS *et al.*, 2008).

Com relação à temperatura, diversos estudos correlacionam o aumento da temperatura com perda em rendimentos quantitativos de OE. Estudos demonstram que a temperatura está relacionada à taxa de transpiração celular e à fotossíntese (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; LIMA *et al.*, 2012;).

Espécie Vegetal	Substância Alterada	Efeito	Referência
<i>Cymbopogon pendulus</i> (Nees ex Steud) Wats	geraniol e citral	forte aumento	Singh-Sangwan <i>et al.</i> , 1994
<i>Pinus halepensis</i> Miller	α -pineno e careno	forte aumento	Llusià & Penuelas, 1998
<i>Cistus monspeliensis</i> L.	cariofileno	aumento significativo	Llusià & Penuelas, 1998
<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.	monoterpenos	forte aumento	Turtola <i>et al.</i> 2003
<i>Pinus sylvestris</i> L.	monoterpenos	forte aumento	Turtola <i>et al.</i> 2003
<i>Thymus vulgaris</i> L.	monoterpenos	aumento	Kleinwächter <i>et al.</i> , 2015
<i>Ocimum basilicum</i> L.	rendimento %	aumento significativo	Forouzandeh <i>et al.</i> , 2012
<i>Salvia officinalis</i> L.	rendimento %	forte aumento (2-4 vezes)	Nowak <i>et al.</i> , 2010
<i>Nepeta cataria</i> L.	rendimento %	aumento significativo	Manukyan, 2011
<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nym.	rendimento %	forte aumento	Kleinwächter <i>et al.</i> , 2015

Quadro 1. Alguns exemplos de alterações na produção e concentrações de substâncias nos óleos essenciais frente à disponibilidade hídrica.

Estudos que avaliaram a qualidade do OE produzido por folhas de *Ocimum gratissimum* L. em função da qualidade da intensidade de luz concluíram que houve um aumento significativo no rendimento de folhas cultivadas com 50% de sombreamento. Além disso, o rendimento das folhas cultivadas sob tela azul foi correspondente

a 142% maior em relação à folhas jovens cultivadas em pleno sol. Este resultado foi correlacionado com estímulos gerados nas enzimas que regulam a síntese de arilpropanoides de interesse presente no OE de *O. gratissimum* L. (MARTINS *et al.*, 2008). No entanto, as respostas biossintéticas variam de acordo com o táxon. Gonçalves e colaboradores (2003) concluíram que o sombreamento parcial de 50% não gerou variação na composição química do OE de folhas de *O. selloi* Benth. Outro estudo que não demonstrou variação no rendimento do OE em função da intensidade luminosa foi conduzido com *Lippia citriodora* Lam. (GONÇALVES *et al.*, 2003).

Existem diversos estudos que demonstram que os constituintes químicos de OE de uma planta podem variar consideravelmente durante o ciclo dia/noite, pois nesse intervalo de tempo ocorrem flutuações na temperatura, intensidade luminosa e umidade relativa do ar (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; CASTELO *et al.*, 2013; RAPOSO *et al.*, 2018; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2019). Em alguns casos o maior rendimento encontrado em OE está no período da tarde (CASTELO *et al.*, 2013), no entanto, há plantas que possuem seu pico de rendimento de OE no período da manhã (RAPOSO *et al.*, 2018; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2019). Em todo caso, estudos devem ser conduzidos para quantificar a variação causada pela qualidade espectral da radiação solar e, assim, seja possível modular a radiação e estabelecer padrões de cultivos que forneçam OE com alto rendimento e qualidade (GONÇALVES *et al.*, 2003).

9 | SAZONALIDADE E RITMO CIRCARDIANO

A produção de metabólitos secundários está ligada diretamente aos fatores climáticos, como descrito anteriormente (MORAIS, 2009; LEE; DING, 2016). Dentre esses fatores destacam-se a sazonalidade e o ritmo circadiano, pois a quantidade e qualidade dos constituintes dos OE não são constantes durante o ciclo anual e muito menos durante o ciclo diário. As plantas são capazes de sobreviver em uma considerável faixa de temperatura, pois se adaptam ao seu habitat (BRANT, 2008), no entanto, sofrem alterações em sua produção de metabólitos secundários, dependendo da estação, pois há uma média de temperatura predominante, fazendo com que o vegetal produza mais ou menos OE como forma de preservação da temperatura foliar (BARROS *et al.*, 2009). A sazonalidade diz respeito ao conjunto de temperatura, umidade e precipitação, em que se alterando durante o ano, dá origem as estações. A temperatura influencia os processos metabólicos das plantas, contudo, não é um fator independente, sendo necessário o sinergismo entre umidade e precipitação. A precipitação também é um fator relevante na alteração do rendimento e da composição química dos OE, principalmente devido à alta umidade do ar. Substâncias mais polares de OE podem formar ligação hidrogênio com as moléculas de água, o que aumenta a volatilização dessas para o meio ambiente. Inclusive, é recomendado que se aguarde aproximadamente três dias após o cessar das chuvas para que o teor de OE possa voltar ao padrão de normalidade e, assim, realizar a coleta da espécie vegetal (BRANT

et al., 2008; GOUVEA *et al.*, 2012). Diversos estudos mostram que, de fato, há um aumento na produção de metabólitos secundários em plantas expostas ao estresse hídrico comparado as cultivadas em condições de boa irrigação. Dessa forma, estresse hídrico pode gerar efeitos significativos sobre a produção e armazenamento de voláteis produzidos pelo vegetal, o que vai depender do táxon (GHORBANPOUR; VARMA, 2017).

Há espécies que diminuem sua produção de metabólitos na primavera, como *Digitalis obscura* L. (WOLFFENBÜTTEL, 2010). Durante meses mais frios, registrou-se em muitos estudos uma diminuição da produção de OE (MORAIS, 2009). Ao contrário, nos meses mais quentes, é notável um aumento na produção de OE, como por exemplo, em *Pinus elliotii* Engelm. (TINGEY *et al.* 1980). Porém em dias muito quentes, pode haver perda de OE por volatilização (BRANT *et al.*, 2008).

Igualmente, como nos seres vivos não clorofilados, as plantas possuem um relógio biológico que determina seu metabolismo, como uma rede complexa de *loops de feedback* inter cruzados que controlam uma abrangente rota de processos fisiológicos (CREUX; HARMER, 2019). De fato, a variação nos “genes do relógio biológico” tem sido implicada em uma série de adaptações ambientais das plantas, incluindo respostas ao estresse abiótico e biótico, controle fotoperiódico da floração e regulação do crescimento (MCCLUNG, 2006; CREUX; HARMER, 2019). Embora o relógio seja amortecido contra o meio ambiente, mantendo ritmos de aproximadamente 24h em uma ampla variedade de condições, esse também pode ser redefinido por sugestões ambientais, como mudanças agudas na luz ou na temperatura, mencionado anteriormente. Essas demandas concorrentes podem ajudar a explicar a complexidade das ligações entre a rede circadiana de relógios e as vias de resposta ambiental (MCCLUNG, 2006; CREUX; HARMER, 2019).

10 | ALTITUDE, LATITUDE E LONGITUDE

Na dinâmica climática global, diversos fatores exercem influência na produção dos OE, entre esses estão latitude, longitude e a altitude, que determinam o clima em diferentes regiões.

A latitude e longitude estão intimamente relacionadas com questões do germoplasma (genótipo) e a história evolutiva das espécies ao longo do tempo. Para alguns pesquisadores essas alterações são mais perceptivas a espécies conhecidas como satélites, que possuem distribuição bem ampla no globo terrestre. Essas alterações fenotípicas químicas derivam do ritmo e intensidade solares e endofoclimáticas, gerando uma expansão ou retração em diversidade de substâncias e/ ou de vias metabólicas (GOTTLIEB *et al.*, 1996; GOTTLIEB, 2012; GOTTLIEB; BORIN, 2012)

A altitude está relacionada à pressão atmosférica e temperatura do ar. A relação da altitude com a temperatura é especialmente importante em regiões tropicais e

subtropicais, onde variações de algumas centenas de metros de desníveis podem provocar mudanças sensíveis no clima, na formação do solo, no índice pluviométrico e, conseqüentemente, na adaptação de espécies vegetais (FRITZSONS *et al.* 2015). Fatores como amplitude térmica, insolação, incidência de geadas, precipitação, solo, velocidade do vento, temperaturas extremas, comprimento da vegetação e intensidade da radiação sob sol claro, difere para altas e baixas altitudes em zonas temperadas (KÖRNER, 2003; SPITALER 2006). Essa variedade de fatores também dificulta o estudo da influência da altitude nos metabólitos especiais, com uma maior prevalência em populações selvagens e sendo poucos estudados com cultivares. Esses fatores estão associados a uma maior contribuição genética, porém, conclusões a respeito de possíveis variações no processo adaptativo ou resposta a fatores ambientais relacionados à altitude são complexas. (RUHLAND E DAY, 2000, 2001; ZIDORN E STUPPNER, 2001a; ZIDORN *et al.*, 2005b, DEMASI, 2016, YAHIA, 2019).

No caso do estudo do OE de *Hypericum italicum* L. coletada na Sardenha, Ilha no Mar Mediterrâneo da Itália, sugeriu a existência de dois QT correspondentes a regiões de montanha a 1250 m e ao nível do mar (MELITO *et al.*, 2016), devido diferenças nas substâncias majoritárias do OE. Resultados similares para essa espécie foram registrados na composição do OE da região da Croácia, que demonstrou um aumento no teor de substâncias oxigenadas de acordo com a altitude e a exposição à radiação solar, sendo o inverso observado para a fração de hidrocarbonetos. Notou-se que algumas das substâncias, como α -turjona, β -pineno, β -mirceno, limoneno e γ -terpineno, tiveram suas concentrações diminuídas com o aumento da altitude, enquanto que constituintes como o α -pineno aumentaram com uma diminuição da altitude. (CAVAR ZELIJKOVIC *et al.*, 2015).

Para estudos do OE com populações de *Foeniculum vulgare* Mill. registrou-se a presença dos sesquiterpenos α -santalal e α -cadineno em grande altitude, e ausência dos mesmos no OE da planta cultivada em baixa altitude. Alguns monoterpenos oxigenados como verbenol, pinocarvona, *p*-mentha-1,5-dien-8-ol, myrtenal, *trans*-myrtenol, *trans*-carveol e *trans*-3-carene-2-ol foram detectados apenas no OE de *F. vulgare* em baixas altitudes (DEEPSHEKHA *et al.*, 2019).

A correlação entre rendimento de OE de populações em regiões semiáridas húmidas está vinculada tanto a fatores climáticos quanto altitude, mas não somente a estes. Populações de vegetais que crescem em habitats com o mesmo perfil de altitude e chuva podem apresentar variações em sua composição devido, também, a influências do solo, temperatura e luminosidade (YAHIA *et al.*, 2019). Rendimentos dos OE dentro de uma mesma zona bioclimática podem ser devido a uma maior influência de chuvas do que da altitude, sendo diferente para cada espécie vegetal, de maneira isolada ou conjunta, gerando correlações positivas ou negativas entre altitude e rendimento (MELITO 2016).

11 I ATRIBUTOS DO SOLO

A natureza do solo, seus nutrientes e pH apresentam um papel muito importante no crescimento e desenvolvimento de uma planta, e, portanto, são capazes de afetar de forma significativa a síntese de metabólitos especiais e os constituintes de OE (GOUVEA *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Martins e colaboradores (1995) consideram os nutrientes do solo um dos fatores que mais necessita atenção, dentre os mencionados, pois as quantidades de nutrientes podem estar diretamente correlacionadas com as modificações na síntese de substâncias ativas (MORAIS, 2009).

Por exemplo, em *Cistus monspeliensis* L., a emissão de terpenos foi influenciada pelo tipo de solo, sendo que houve aumento dessas substâncias quando a planta foi cultivada em solo silicioso em comparação com solo calcário (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Enquanto a composição química dos OE de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don e *Microphyllum* (Willd.) Nym. não foram influenciadas pelo pH, a produção de OE de *Valeriana officinallis* L. e *Matricaria chamomilla* L. variou de acordo com o pH alcalino (SATTA. *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2012).

Graven e colaboradores (1991) com o objetivo de investigar o efeito do estado nutricional no rendimento e na qualidade de OE, cultivaram a espécie *Tagetes minuta* L. em três diferentes solos com sete tratamentos de fertilizantes. Os resultados demonstraram que em todos os três solos estudados as deficiências de macronutrientes, tais como Nitrogênio (N) e Fósforo (P), foram fatores relevantes que limitaram os rendimentos de OE na espécie estudada (GRAVEN, 1991). Em um estudo realizado com a planta *Mentha arvensis* L. foi observado um aumento de aproximadamente 100% no rendimento de OE quando a oferta de N e P foi maior. Em *Ocimum basilicum* L. esse aumento também foi constatado com a presença de N, P e potássio (K) (LIMA *et al.*, 2012). Sendo assim, fica evidente que o estresse nutricional constantemente influencia de forma significativa a quantidade de metabólitos presentes nas plantas, em particular nos OE (GERSHENZON, 1982; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

12 I POLUIÇÃO DO AR

A qualidade dos gases atmosféricos presente na natureza apresenta grande interferência na biossíntese de metabolitos especiais (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Altas concentrações de ozônio (O₃), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e Nitratos (NOx) direcionam modificações na qualidade e quantidade das substâncias produzidas nos OE (FARHAT *et al.*, 2019; LEITE *et al.*, 2016). Além disso, elementos climáticos como vento, chuva e temperatura podem aumentar o efeito causado por outros agentes poluentes, como gases liberados por veículos e incêndios (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Estudo realizado com a espécie *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob. em

três pontos com diferentes níveis de poluição atmosférica produzida pela queima de combustíveis fósseis demonstrou que, em ambientes de intenso tráfego a síntese de OE foi afetada, apresentando rendimento de 0,014g, enquanto em ambientes de tráfego médio e tráfego baixo, apresentaram rendimento de 0,030g e 0,284g, respectivamente (LEITE *et al.*, 2016).

Pesquisas com a espécie *Pinus sylvestris* L. revelou alterações nas concentrações dos principais constituintes presentes no OE de acordo com o local onde as plantas foram coletadas. A partir dos resultados, verificou-se uma redução da concentração de monoterpenos δ -3-careno e terpinoleno em plantas cultivadas próximo à fábrica de cimento, além da redução do teor de diterpenos próximo à refinaria de petróleo e fábrica de cimento. Além disso, verificou-se o aumento de outros monoterpenos, como canfeno, sabineno, β -pineno em plantas cultivadas próximo à refinaria de petróleo (KUPCINSKIENE *et al.*, 2008).

Acredita-se que o CO₂ e O₃ modificam a disponibilidade de substratos e afetam processos bioquímicos/ fisiológicos importantes nas plantas, como a fotossíntese, além de meios de sinalização de defesa, podendo causar alterações na composição química vegetal (GOUVEA; GOBBO-NETO, 2012). Para descobrir qual o efeito do CO₂ sobre a produção de OE, Vurro e colaboradores (2009) conduziram um estudo com a espécie *Thymus vulgaris* L. sob condições controladas de emissão desse gás. Os resultados mostraram que as folhas das plantas que foram cultivadas em condições de CO₂ elevado, apresentaram aumento na síntese OE, com ligeira redução dos componentes mono- e sesquiterpenos (LINDROTH, 2010). Globalmente, os efeitos de CO₂ sobre o teor percentual de terpenoides são pequenos. Apesar de alguns estudos terem demonstrado aumento no teor de terpenoides, a maior parte não achou alteração nas concentrações desses metabólitos (LINDROTH, 2010). O efeito do O₃ em níveis de terpenoides foi pesquisado em somente poucas espécies arbóreas, e os resultados são particulares a cada espécie: aumento do teor nas espécies de *Pinus sylvestris* L. e *Populus* sp., e nenhum efeito em *Picea abies* (L.) H. Karst. (VALKAMA *et al.*, 2007; LINDROTH, 2010). Além disso, dependendo dos tipos de terpenos, a particularidade da resposta será diferente, com diterpenos apresentando uma resposta mais forte ao O₃ do que os mono- e sesquiterpenos (LINDROTH, 2010).

A partir desse conjunto de dados, sabe-se que não há apenas uma resposta em relação à exposição de gás na atmosfera, entretanto, com certeza, o aumento dos níveis de alguns deles é capaz de causar modificações no metabolismo especial das plantas.

13 | PROCESSAMENTO DO VEGETAL

Os efeitos bióticos e abióticos causam variações na qualidade final do OE, como mencionado. Além desses, os processamentos pré e pós a colheita são fundamentais para garantir a qualidade dos OE (TUREK; STINTZING, 2013). A colheita é um ponto

crucial para obtenção dos OE, dentro dos parâmetros de qualidade estabelecidos para essas espécies vegetais, pois envolvem todas as avaliações previamente discutidas neste capítulo. Deve-se definir o denominado *ponto de colheita* – caracterizado como aquele momento ideal, no qual as espécies vegetais irão apresentar condições adequadas para gerar um produto com qualidade de comercialização. De acordo com Paulus (2016) a escolha do momento correto para a colheita depende da biomassa ideal, melhor produção de ativos desejados e menor variação na concentração das substâncias. Para atingir esses critérios, deve ser dada atenção desde a escolha do solo, local de cultivo, seleção do genótipo, época do ano, condições da cultura, transporte, armazenamento, processos de secagem, até o tipo de extração (MING *et al.*, 2003).

Na etapa de colheita o uso de equipamentos deve garantir o menor dano à espécie vegetal. Instrumentos de cortes devem estar limpos, afiados e em boas condições de uso. A depender da parte vegetativa, como flores, esse processo deve ser realizado manualmente.

As ações de transformação pós-colheita envolvem todas as operações que a espécie vegetal será submetida: limpeza, seleção, secagem/ estabilização, cominuição, seleção granulométrica e extração. Atenção deve ser dispensada também ao acondicionamento e seleção de embalagem.

Dependendo da fragilidade do órgão a ser extraído o OE, é indicado que ocorram os processos extrativos imediatamente após a colheita, a fim de evitar a degradação ou volatilização dos constituintes (TUREK; STINTZING, 2013). Sem dúvidas, a extração é fundamental para garantir um OE com a qualidade que se almeja. Dentre as principais técnicas de extração, tem-se: prensagem, hidrodestilação, arraste com vapor de água, extração líquido-líquido, *enfleurage*, extração assistida por ultrassom (*ultrasound-assisted extraction* – USAE), extração assistida por micro-ondas (*microwave-assisted extraction*) e extração por fluidos supercríticos.

Para extração com materiais secos, os processos de estabilização e secagem são cruciais, pois retardam a deterioração, reduzem a atividade enzimática e evitam proliferação microbológica. Sendo assim, a perda de água, em geral, garantirá a conservação da planta por um período maior e, conseqüentemente, a qualidade do produto (EMBRAPA, 1991). No entanto, o processo de secagem pode modificar a constituição química do OE (SILVA *et al.*, 2016).

Estudo realizado com folhas de *Campomanesia adamantium* Cambess. demonstrou influência da secagem tanto no rendimento do OE quanto na concentração das substâncias voláteis (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Existe a possibilidade de não ocorrer variação na constituição do OE em função da secagem, assim como demonstrado para *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, que não apresentou diferença estatística de rendimento entre folhas secas em estufa a 0, 24, 48 e 72 h (SILVA *et al.*, 2016).

Dessa forma, de acordo com as particularidades de cada espécie vegetal, as características do ar de secagem em função do meio de transferência de calor

determinarão quais as condições de secagem que serão adotadas para cada finalidade. Há necessidade de avaliação, em particular, do grau de influência de cada variável, assim como da padronização do processo de secagem. Além da secagem, o tipo de fragmentação do vegetal influencia nas características do produto final (TUREK; STINTZING, 2013).

Estudos que correlacionam o método de secagem e o tipo de cominuição conduzidos com *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, demonstrou que a cominuição influencia nos rendimentos apenas em folhas secas em estufa. O mesmo não foi observado em folhas secas com desumidificador (COSTA *et al.*, 2005). Em geral esses resultados podem ser correlacionados com a localização das estruturas secretoras de OE no tecido vegetal, que podem ser células parenquimáticas diferenciadas ou ainda tricomas.

Estudo conduzido com a espécie vegetal *Eugenia caryophyllata* Thunb., para avaliar a variação causada pelos diferentes tipos de extrações na obtenção do OE (fluido supercrítico, hidrodestilação, destilação a vapor e extração com Soxhlet), demonstrou semelhança no rendimento em relação aos diferentes métodos de extração. No entanto, o teor das diferentes substâncias dos diferentes OE obtidos foi diferente. Neste caso, a extração por arraste a vapor concentrou a maior quantidade de eugenol (58,2%), seguido pela extração com fluido supercrítico (53,8%). A menor quantidade de eugenol foi encontrada no OE obtido por hidrodestilação, que pode ser devido, segundo os autores, a maior temperatura e pressão a qual a planta é submetida durante esse processo (GUAN *et al.*, 2007).

14 | 4. CONCLUSÕES

A composição química de um óleo essencial é, em geral, muito sensível a qualquer forma de variação, desde fatores abiótico, bióticos, bioquímicos/ genéticos e de processamento da planta. As influências intrínsecas e extrínsecas incidem de forma singular para cada espécie. As alterações que ocorrem na constituição de óleos essenciais nem sempre podem ser atribuídas a um impacto específico, podendo ser resultante de vários fatores em interação. Por este motivo, é sempre indicada a realização de estudos avaliativos de influência de fatores isolados e combinados para que seja possível estabelecer mecanismos que favorecem a produção de óleos essenciais com as características desejáveis para uso como produto ou para responder questões ecológicas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, F.; KE, Y.; YU, R.; YUE, Y.; AMANULLAH, S.; JAHANGIR, M. M.; FAN, Y. Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. **Planta**, v. 246, n. 5, p. 803-816, 2017.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in

plants. **Plant signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

BARROS, F. M.; ZAMBARDA, E. D. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BASIRI, M. H.; NADJAFI, F. Effect of plant density on growth, yield and essential oil characteristics of Iranian Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) landraces. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108655, 2019.

BOUYAHYA, A.; DAKKA, N.; TALBAOUI, A.; ET-TOUYS, A.; EL-BOURY, H.; ABRINI, J.; BAKRI, Y. Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 729-737, Dec. 2017.

BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advance in Genetics**, v. 13, p. 115-155, 1965.

BRANT, R. S.; PINTO, J. E. B. P.; Bertolucci, S. K. V.; Silva, A. D.; Albuquerque, C. J. B. Teor do óleo essencial de cidrão (*Aloysia triphylla* (L' Hérit) Britton Verbenaceae) em função da variação sazonal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 33, n. spe, p. 2065-2068, 2009.

CASTELO, A. V. M.; AFONSO, S. R.; MELO, R. R.; DEL MENEZZI, C. H.; CAMILLO, J.; VIEIRA, R. F. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell, na região do Distrito Federal. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 143-147, 2013.

CAVAR-ZELJKOVIĆ, S.; ŠOLIĆ, M. E.; MAKSIMOVIĆ, M. Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. **Natural product research**, v. 29, n. 19, p. 1874-1877, 2015.

COPOLOVICI, L.; KÄNNASTE, A.; REMMEL, T.; NIINEMETS, Ü. Volatile organic compound emissions from *Alnus glutinosa* under interacting drought and herbivory stresses. **Environmental and experimental botany**, v. 100, p. 55-63, 2014.

COPOLOVICI, L.; PAG, A.; KÄNNASTE, A.; BODESCU, A.; TOMESCU, D.; COPOLOVICI, D.; NIINEMETS, Ü. Disproportionate photosynthetic decline and inverse relationship between constitutive and induced volatile emissions upon feeding of *Quercus robur* leaves by large larvae of gypsy moth (*Lymantria dispar*). **Environmental and experimental botany**, v. 138, p. 184-192, 2017.

CORNILLE, A.; UNDERHILL, J. G.; CRUAUD, A.; HOSSAERT-MCKEY, M.; JOHNSON, S. D.; TOLLEY, K. A.; PROFFIT, M. Floral volatiles, pollinator sharing and diversification in the fig-wasp mutualism: insights from *Ficus natalensis*, and its two wasp pollinators (South Africa). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 279, p. 1731e1739, 2012.

COSTA, L. C.; CORREA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, J. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v.23, n.4, p.956-959, out-dez 2005.

CREUX, N.; HARMER, S. Circadian Rhythms in Plants. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a034611, 2019.

DANI, K. G. S.; JAMIE, I. M.; PRENTICE, I. C.; ATWELL, B. J. Evolution of isoprene emission capacity in plants. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 7, p. 439-446, 2014.

DEMASI, S.; CASER, M.; LONATI, M.; CIONI, P. L.; PISTELLI, L.; NAJAR, B.; SCARIOT, V. Latitude and altitude influence secondary metabolite production in peripheral alpine populations of the Mediterranean species *Lavandula angustifolia* Mill. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 983, 2018.

DICKE, M.; LORETO, F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. **Trends in plant**

science, v. 15, n. 3, p. 115-117, 2010.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de alimentos (CTAA). Óleo essencial e sua extração por arraste a vapor. DOC. 8, 24p. Rio de Janeiro, 1991.

ESMAEILI, H.; KARAMI, A.; MAGGI, F. Essential oil composition, total phenolic and flavonoids contents, and antioxidant activity of *Olivaria decumbens* Vent. (Apiaceae) at different phenological stages **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 91-95, Oct. 2018.

FARHAT, M. B; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. *Salvia verbenaca* L. essential oil: Variation of yield and composition according to collection site and phenophase **Biochemical Systematics and Ecology**, Volume 82, Pages 35-43, 2019.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FLAMINI, G.; SMAILI, T.; ZELLAGUI, A.; GHERRAF, N.; CIONI, P. L. Effect of Growth Stage on Essential-Oil Yield and Composition of *Daucus sahariensis*. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 11, p. 2014-2020, 2013.

FRELLO, S.; HESLOP-HARRISON, J. S. Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. **Annals of Botany**, v. 86, n. 2, p. 317-322, 2000.

FRITZSONS, E.; WREGE, M. S.; MANTOVANI, L. E. Altitude e temperatura: estudo do gradiente térmico no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 16, 2015.

GENG, S.L.; CUI, Z.; HUANG, X.; CHEN, Y.; XU, D.; XIONG, P. Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. **Industrial crops and products**, v. 33, n. 1, p. 248-252, 2011.

GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: **Phytochemical adaptations to stress**. Springer, Boston, MA, 1984. p. 273-320

GHORBANPOUR, M.; VARMA, A. **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. Springer, 2017

GIULIANI, C.; ASCRIZZI, R.; LUPI, D.; TASSERA, G.; SANTAGOSTINI, L.; GIOVANETTI, M.; FICO, G. *Salvia verticillata*: Linking glandular trichomes, volatiles and pollinators. **Phytochemistry**, v. 155, p. 53-60, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GONÇALVES, L. A.; Barbosa, L. C. A.; Azevedo, A. A.; Casali, V. W. D.; Nascimento, E. A. Produção e composição do óleo essencial de Alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.1, p. 8-14, 2003.

GOTTLIEB, O. R. **Micromolecular evolution, systematics and ecology: an essay into a novel botanical discipline**. Springer Science & Business Media, 2012.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma. **Química Nova**, v. 35, p. 2105-2114, 2012.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Editora UFRJ, 1996.

- GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants. **Plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, p. 419-452, 2012.
- GRAVEN, E. H.; WEBBER, L.; BENIANS, G.; VENTER, M.; GARDNER, J. B. Effect of soil type and nutrient status on the yield and composition of Tagetes oil (*Tagetes minuta* L.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, n. 5, p. 303-307, 1991.
- GUAN, W.; LI, S.; YAN, R.; TANG, S.; QUAN, C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1558-1564, 2007.
- GUO, L. P.; HUANG, L. Q.; HUA, Y. L.; CHEN, M. L. 资源科学. **Resources Science**, v. 5, p. 015, 2008.
- HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005
- HASHEMI, S. M. B.; KHANEGHAH, A. M.; SOUZA-SANT'ANA, A. **Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2018.
- HEIL, M. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. **Trends Plant Science**, v. 14, p. 356-63, 2009.
- HILAN, C.; SFEIR, R.; AITOUR, S. Chimiotypes des plantes communes au Liban du genre *Origanum* et du genre *Micromeria* (Lamiaceae). **Lebanese Science Journal**, v. 12, n. 1, p. 79-91, 2011.
- HOSSAERT-MCKEY, M., SOLER, C., SCHATZ, B., PROFFIT, M. Floral scents: their roles in nursery pollination mutualisms. **Chemoecology**, v.20, p. 75e88, 2010.
- JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P. A. R. A. M. A. S. I. V. A. M.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H. J.; SOMASUNDARAM, R. A. M. A. M. U. R. T. H. Y.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009
- JORDAN, M.; LAX, V.; ROTA, M. C.; LORÁN, S.; SOTOMAYOR, J. A. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. **Industrial Crops and Products**. 48, 144-152, 2013.
- KAINULAINEN, P.; OKSANEN, J.; PALOMÄKI, V.; HOLOPAINEN, J. K.; HOLOPAINEN, T. Effect of drought and waterlogging stress on needle monoterpenes of *Picea abies*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 8, p. 1613-1616, 1992.
- KAMADA, T.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; FORTES, I. C. P.; FINGER, F. L. Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 1, n. 2, p. 13-22, 1999.
- KÖRNER, C. **Alpine Plant Life. Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems**. Springer, Berlin, 2003.
- KUPCINSKIENE, E.; STIKLIENE, A.; JUDZENTIENE, A. The essential oil qualitative and quantitative composition in the needles of *Pinus sylvestris* L. growing along industrial transects. **Environmental Pollution**, v. 155, n. 3, p. 481-491, 2008.
- KURLOVICH, B.S. Species and intraspecific diversity of white, blue and yellow lupin. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n. 115, p.23-32, 1998.
- LANTZ, A. T.. ALLMAN, J.; WERADUWAGE, S. M.; SHARKEY, T. D. Isoprene: New insights into the control of emission and mediation of stress tolerance by gene expression. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 10, p. 2808-2826, 2019.

- LAVOIR, A. V.; STAUDT, M.; SCHNITZLER, J. P.; LANDAIS, D.; MASSOL, F.; ROCHETEAU, A.; RAMBAL, S. Drought reduced monoterpene emissions from the evergreen Mediterranean oak *Quercus ilex*: results from a throughfall displacement experiment. **Biogeosciences**, v. 6, p. p. 1167-p. 1180, 2009
- LEE, Y.L.; DING, P. Production of essential oil in plants: ontogeny, secretory structures and seasonal variations. **Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews**, v. 2, n. 1, 2016.
- LEITE, P. O., SOARES, C., MORAIS, F., MENEGON, R., & JOAQUIM, W. Influência da poluição aérea gerada pelo tráfego veicular na produção do óleo essencial e das atividades antifúngica e citotóxica in vitro de *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob.(Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 27-37, 2016.
- LI, Y.; KONG, D. X.; HUANG, R. S.; LIANG, H. L.; XU, C. G.; WU, H. Variations in essential oil yields and compositions of *Cinnamomum cassia* leaves at different developmental stages. **Industrial crops and products**, v. 47, p. 92-101, 2013.
- LIMA, H. R P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2012.
- LINDROTH, R. L. Impacts of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 1, p. 2-21, 2010.
- LIU, Y.; LI, X.; CHEN, G.; LI, M.; LIU, M.; LIU, D. Epidermal micromorphology and mesophyll structure of *Populus euphratica* heteromorphic leaves at different development stages. **PloS one**, v.10, n.9, p.1-16, 2015.
- LOAIZA, J. C.; CÉSPEDES, C. L. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 30, n. 4, p. 1-17, 2007.
- MAFFEI, M.E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany** , v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.
- MAGEL, E.; MAYRHOFER, S.; MÜLLER, A.; ZIMMER, I.; HAMPP, R.; SCHNITZLER, J. P. Photosynthesis and substrate supply for isoprene biosynthesis in poplar leaves. **Atmospheric Environment**, v. 40, p. 138-151, 2006.
- MARANGONI, C.; MOURA, N. F.; GARCIA, F. R. M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 92-112, 2013.
- MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, A. P. O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 102-107, 2008.
- MCCLUNG, C. R. Plant circadian rhythms. **The Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 792-803, 2006.
- MING, L.; SILVA, S. D.; SILVA, M. D.; HIDALGO, A. F.; MARCHESI, J. A.; CHAVES, F. C. M. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. **Diversos olhares em Etnobiologia, Etnoecologia e Plantas Mediciniais.**(MFB Coelho, P. Costa Júnior & JLD Dpmbroski, org.). **Unicen Publicações, Cuiabá**, v. 1, p. 149-156, 2003.
- MITHOFER, A.; WANNER, G.; BOLAND, W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. **Plant Physiology**, v. 137, n. 3, p. 1160-1168, 2005.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009.

NUNES, C. E. P.; GERLACH, G.; BANDEIRA, K. D.; GOBBO-NETO, L.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Two orchids, one scent? Floral volatiles of *Catasetum cernuum* and *Gongora bufonia* suggest convergent evolution to a unique pollination niche. **Flora**, v. 232, p. 207-216, 2017.

OLIVEIRA, J. D.; ALVES, C. C. F.; MIRANDA, M. L. D.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, T. S.; AMBROSIO, M. A. L. V.; SILVA, J. P. **Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem.** **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 502-510, 2016.

PAULUS, D. **Influência dos fatores ambientais, colheita e secagem na produção e na composição de óleos essenciais de *Mentha spp.*** Técnicas de manejo agropecuário sustentável, 269.

PIESIK, D.; MILER, N.; LEMAŃCZYK, G.; BOCIANOWSKI, J.; BUSZEWSKI, B. *Botrytis cinerea* infection in three cultivars of chrysanthemum in 'Alchemist' and its mutants: Volatile induction of pathogen-infected plants. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 127-135, 2015.

POLATOGLU, K. "Chemotypes"—A Fact that should not be Ignored in Natural Product Studies. **The Natural Products Journal**, v. 3, n. 1, p. 10-14, 2013.

PROFFIT, M.; BESSIÈRE, J.-M.; SCHATZ, B., & HOSSAERT-MCKEY, M. Can fine-scale post-pollination variation of fig volatile compounds explain some steps of the temporal succession of fig wasps associated with *Ficus racemosa*? **Acta Oecologica**, v. 90, p. 81–90, 2018.

PUNETHA, D.; TEWARI, G.; PANDE, C.; BHATT, S. Effect of Climatic Conditions on the Volatile Compounds of the Aerial Parts of *Foeniculum vulgare* Mill. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, p. 1-11, 2019.

RAPOSO, J.; FIGUEIREDO, P. L. B.; SANTANA, R. L.; SILVA JUNIOR, A. Q.; SUEMITSU, C.; SILVA, R.; MAIA, J. G. S. Seasonal and circadian study of the essential oil of *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC., a valuable aromatic species occurring in the Lower Amazon River region. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 79, p. 21-29, aug. 2018.

RIVOAL, A.; FERNANDEZ, C.; LAVOIR, A. V.; OLIVIER, R.; LECAREUX, C.; GREFF, S.; VILA, B. Environmental control of terpene emissions from *Cistusmons peliensis* L. in natural Mediterranean shrublands. **Chemosphere**, v. 78, n. 8, p. 942-949, 2010.

RUHLAND, C. T.; DAY, T. A. Size and longevity of seed banks in Antarctica and the influence of ultraviolet-B radiation on survivorship, growth and pigment concentrations of *Colobanthus quitensis* seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 45, n. 2, p. 143-154, 2001.

SALEHI, B.; AYATOLLAHI, S.; Segura-Carretero, A.; Kobarfard, F.; Contreras, M. D. M.; Faizi, M.; Sharifi-Rad, J. Bioactive chemical compounds in *Eremurus persicus* (Joub. & Spach) Boiss. essential oil and their health implications. **Cellular and Molecular Biology (Noisy le Grand)**, v. 63, n. 9, p. 1-7, 2017.

SALEM, N.; KEFI, S.; TABBEN, O.; AYED, A.; JALLOULI, S.; FERES, N.; SGHAIER, A. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. **Industrial crops and products**, v. 124, p. 115-125, 2018.

ŞANLI, A.; KARADOĞAN, T. Geographical impact on essential oil composition of endemic *Kundmannia anatolica* Hub.-Mor. (Apiaceae). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 1, p. 131-137, 2017.

SANTOS, V.M.; PINTO, M. A. S.; BIZZO, H. R.; DESCHAMPS, C. Seasonal variation of vegetative growth, essential oil yield and composition of menthol mint genotypes at southern Brazil. **Biosciência**, v. 28, p. 790–798, 2016.

- SATTA, M.; TUBEROSO, C. I. G.; ANGIANI, A.; PIRISI, F. M.; CABRAS, P. Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 6, p. 711-715, 1999.
- SCHIESTL, F.P., AYASSE, M. Post-pollination emission of a repellent compound in a sexually deceptive orchid: a new mechanism for maximising reproductive success? **Oecologia**, v. 126, n. 4, p. 531-534, 2001.
- ŞENKAL, B.C.; KIRALAN, M.; YAMAN, C. The effect of different harvest stages on chemical composition and antioxidant capacity of essential oil from *Artemisia annua* L. **The Journal of Agricultural Science**. 21, 71–77, 2015.
- SILVA, T. I.; MACIEL, T. C. M.; CHAVES, M. M.; DE OLIVEIRA ALCANTARA, F. D.; SANTOS, H. R.; MARCO, C. A. Influência do período de secagem e horário de colheita no teor de óleo essencial de *Lippia alba* (MILL.). **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 15, n. 1, p. 29-38, 2016.
- SILVA-JUNIOR, A.; Silva, D. S.; Figueiredo, P. L. B.; Sarrazin, S. L. F.; Bouillet, L. E. M.; Oliveira, R. B.; Mourão, R. H. V. Seasonal and circadian evaluation of a citral-chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 85, p. 35-42, 2019.
- SOLÍZ-GUERRERO, J. B.; DE RODRIGUEZ, D. J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, R.; ANGULO-SÁNCHEZ, J. L.; MÉNDEZ-PADILLA, G. Quinoa saponins: concentration and composition analysis. **Trends in new crops and new uses**, p. 110-114, 2002.
- SPITALER, R.; SCHLORHAUFER, P. D.; ELLMERER, E. P.; MERFORT, I.; BORTENSCHLAGER, S.; STUPPNER, H.; ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 409-417, 2006.
- TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.
- TROWBRIDGE, A. M.; STOY, P. C. BVOC-mediated plant-herbivore interactions. In: **Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions**. Springer, Dordrecht, 2013. p. 21-46.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.
- VALKAMA, E.; KORICHEVA, J.; OKSANEN, E. Effects of elevated O₃, alone and in combination with elevated CO₂, on tree leaf chemistry and insect herbivore performance: a meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 13, n. 1, p. 184-201, 2007.
- VOKOU, D.; KOKKINI, S.; BESSIERE, J. M. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 2, p. 287-295, 1993.
- VURRO, E.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; DI TOPPI, L. S. Elevated atmospheric CO₂ decreases oxidative stress and increases essential oil yield in leaves of *Thymus vulgaris* grown in a mini-FACE system. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 99-106, 2009.
- WANNES, A.; W., MHAMDI, B.; MARZOUK, B. Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 621-626, 2009.
- WANNES, A.; MARZOUK, W. Maturation effect on essential oil yield and composition of *Myrtus communis* var. *baetica* fruit. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 5, p. 847-853, 2012.
- WANZALA, W. et al. Bioactive properties of *Tagetes minuta* L.(Asteraceae) essential oils: a

review. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 4, n. 2, p. 27-36, 2016.

WARD, S. M. Response to selection for reduced grain saponin content in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Field Crops Research**, v. 68, n. 2, p. 157-163, 2000.

WENG, J. K.; PHILIPPE, R. N.; NOEL, J. P. The rise of chemodiversity in plants. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1667-1670, 2012.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia**. 2^a. ed. Belo Horizonte/Brasil: Laszlo, 466p, 2016.

WOLFFENBÜTTEL, A. N.. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica**. Roca. São Paulo:, 2010.

YAHIA, I. B. H., JAOUADI, R., TRIMECH, R., BOUSSAID, M., & ZAOUALI, Y. (2019). Variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Mentha x rotundifolia* (L.) Huds. (Lamiaceae) collected from different bioclimatic areas of Tunisia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 84, p. 8-16, 2019.

YOSR, Z.; HNIA, C.; RIM, T.; MOHAMED, B. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 412-419, 2013

YU, F.; UTSUMI, R. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 18, p. 3043-3052, 2009.

ZIDORN, C., STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**, v. 50, n. 1, p. 115-133, 2001.

SOBRE O ORGANIZADOR

André Luiz Oliveira de Francisco - Atualmente é Analista de Pesquisa do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) na Área de Solo (ASO) do Polo Regional de Pesquisa de Ponta Grossa e Professor do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais (CESCAGE). Graduado em Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Realizou seu mestre em Energia Nuclear na Agricultura na área de concentração de Biologia e Meio Ambiente pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) onde pesquisou temas relacionados a microbiologia e bioquímica do solo, fertilidade do solo e fisiologia vegetal. É Doutorando em Agronomia área de concentração de Uso e Manejo do Solo na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Trabalha com os temas: Qualidade de Sistemas de Produção Agrícola e Ambientais, Microbiologia e Bioquímica do Solo, Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas.

ÍNDICE REMISSIVO

A

- Ácido linoleico 50, 54, 58, 59, 61
- Açúcares solúveis 64, 66, 67, 69, 72, 73, 74
- Antidiabética 3
- Antioxidante 3, 25, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 59, 61, 63, 102
- Arbóreas não pioneiras 66
- Arbóreas pioneiras 64, 66, 70, 71, 74

B

- Benzilaminopurina 11, 12, 14
- Brachiaria decumbens* 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

C

- Caracterização Anatômica 1, 3
- Carboidratos não estruturais 64, 67, 68, 70
- Citronelal 51, 52, 56, 58, 59, 60, 61
- Colesterol 24, 25, 28, 33, 34
- Compostos bioativos 51
- Compostos secundários 51
- Concentração inibitória mínima 51, 55, 59
- Controle de qualidade 1, 7, 50, 57, 79
- Cromatografia 26, 27, 33, 67

E

- Ecologia química 79
- Esteroides 1, 3, 5, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33
- Estudo fitoquímico 24
- Explantes 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21
- Extração 26, 35, 38, 39, 57, 67, 68, 74, 96, 97, 99

F

- Fabaceae 24, 25, 33
- Farmacobotânica 62
- Fatores Abióticos 79, 81, 83, 88, 89, 101
- Fatores Bióticos 79, 81, 82
- Fatores genéticos 81
- Fitólitos 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
- Folhas senescentes 36, 43

G

- Geraniol 51, 52, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 90

L

Lignina 1, 3, 6, 64, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 74

M

Machaerium 24, 25, 26, 33, 34

Malvaceae 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10

Metabólitos 3, 7, 25, 78, 79, 81, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 99

Micropropagação 11, 13, 14, 21, 22

Microscopia 1, 5, 39

Morfotipos 35, 40, 41, 42, 43, 46, 47

P

Panicoideae 36, 37, 52

Polímeros de parede celular 64, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74

R

Regeneração in vitro 12

S

Sucessão florestal 64

T

Tecnologia farmacêutica 79

Triterpenoide 24, 27, 30, 32, 33

V

Viabilidade de Sementes 15, 23

 **Atena**
Editora

2 0 2 0