

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DINÂMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM VARIEDADES DE
***Casearia sylvestris* E ESTUDOS INICIAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR**
RELACIONADOS AOS GENES DAS ENZIMAS GGPP SINTASE E
CHIQUIMATO DESIDROGENASE (DHS)

LIVIA DE LIMA THOMAZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

CO-ORIENTADORA: Prof. Dr. Márcia Aparecida Silva Graminha

ARARAQUARA - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DINÂMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM VARIEDADES DE
***Casearia sylvestris* E ESTUDOS INICIAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR**
RELACIONADOS AOS GENES DAS ENZIMAS GGPP SINTASE E
CHIQUIMATO DESIDROGENASE (DHS)

LIVIA DE LIMA THOMAZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

CO-ORIENTADORA: Prof. Dr. Márcia Aparecida Silva Graminha

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

ARARAQUARA - SP

2014

Dedico esse trabalho

À Deus, pois, sem Ele, eu não teria forças para essa longa jornada.

*À minha família, por acreditar e investir em mim,
me dando suporte para finalizar mais essa
etapa da minha vida com sucesso.*

*Ao meu amor e companheiro pra toda a vida, Ramon Fachini,
por estar ao meu lado sempre,
me dando forças para não desistir,
sempre com muito carinho e atenção.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado força e proteção durante todos os anos de minha vida.

À minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos que precisei.

Ao meu amor, Ramon Fachini, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e ajudando em todas as ocasiões, tanto boas quanto difíceis e por todo carinho que me foi dado.

Ao meu orientador, Alberto José Cavalheiro, por acreditar na minha capacidade e me incentivar durante todo o trabalho.

À minha co-orientadora, Márcia Aparecida Silva, também pelo incentivo e por todos os ensinamentos.

Aos companheiros de laboratório e trabalho, Paula Pires, Isabel Duarte Coutinho, Alexander Alves, Gabriel Mazzi Leme e Laís Simões pelo auxílio na realização dos experimentos e conhecimento compartilhado.

Aos colegas da faculdade pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Graduação da Unesp, em especial, agradeço ao Alexandre, por toda ajuda e paciência.

À FAPESP pelo apoio financeiro e por acreditar no projeto proposto.

Resumo

Este trabalho de conclusão de curso refere-se ao projeto de pesquisa “Dinâmica de metabólitos em variedades de *Casearia sylvestris* e estudos iniciais de biologia molecular relacionados aos genes das enzimas GGPP sintase e chiquimato desidrogenase (SDH)”, e apresenta as atividades desenvolvidas no período de agosto de 2012 a maio de 2014. Foram realizadas coletas mensais de folhas de *Casearia sylvestris* variedade Sylvestris e Lingua para análise circadiana e sazonal, utilizando método de cromatografia líquida. Além disso, foram feitos ensaios para verificar compostos voláteis nos meses de floração através da cromatografia gasosa. Os resultados obtidos demonstraram predomínio de compostos diterpênicos na variedade Sylvestris e de compostos fenólicos na variedade Lingua. A partir desses dados, foram selecionadas as amostras obtidas nos meses de fevereiro e abril para os experimentos de análise diferencial de SDH e GGPP sintases, uma vez que entre esses meses foram observadas as diferenças mais marcantes nos teores de fenólicos e diterpenos. Para fevereiro verificaram-se os maiores teores para fenólicos e diterpenos, nas duas variedades, enquanto os menores teores, também para fenólicos e diterpenos, foram observados no mês de abril. As análises dos compostos voláteis emitidos por folhas de *C. sylvestris* indicam presença de sesquiterpenos em ambas as variedades e, também, de 2-trans-hexenal, 3-hexen-1-ol, (E) 2-hexen-1-ol, heptan-2-ol, α -Copaeno e β -bourboneno na variedade Sylvestris. Na amplificação dos genes referentes às enzimas GGPP sintase e SDH não foram obtidos resultados conclusivos, apenas a PCR realizada com a enzima Phusion para o gene da enzima SDH da variedade Lingua de *C. sylvestris* mostrou o aparecimento de bandas no gel de agarose.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição de óleos essenciais de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> , em porcentagem normalizada.....	16
TABELA 2. Composição do mix para PCR	37
TABELA 3. Ciclo de amplificação – PCR com enzima <i>Platinum[®] Taq Polimerase</i>	38
TABELA 4. Preparo do mix para PCR com enzima <i>Phusion Teste 1</i>	38
TABELA 5. Ciclo de amplificação – PCR com enzima <i>Phusion Teste 1</i>	39
TABELA 6. Preparo do mix para PCR com enzima <i>Phusion Teste 2</i>	39
TABELA 7. Ciclo de amplificação - PCR com enzima <i>Phusion Teste 2</i>	40
TABELA 8. Preparo do mix para PCR com enzima <i>Pfu</i>	40
TABELA 9. Ciclo de amplificação - PCR com enzima <i>Pfu</i>	41
TABELA 10. Composição do mix para PCR com enzima <i>AmpliTaq</i>	41
TABELA 11. Ciclo de amplificação - PCR com enzima <i>AmpliTaq</i>	42
TABELA 12. Índices de retenção encontrados na literatura e índices de retenção calculados para as substâncias identificadas no espectro de massas.	57
TABELA 13. Quantificação do DNA extraído.....	63
TABELA 14. Proposta de identificação para mês de janeiro.	72
TABELA 15. Proposta de identificação para mês de fevereiro.	73
TABELA 16. Proposta de identificação para mês de março.....	74
TABELA 17. Proposta de identificação para mês de abril.	75
TABELA 18. Proposta de identificação para mês de maio para a variedade <i>Sylvestris</i>	76
TABELA 19. Proposta de identificação para mês de maio para a variedade <i>Lingua</i>	77
TABELA 20. Proposta de identificação para mês de junho para a variedade <i>Sylvestris</i>	78
TABELA 21. Proposta de identificação para mês de junho para a variedade <i>Lingua</i>	79
TABELA 22. Proposta de identificação para mês de julho para a variedade <i>Sylvestris</i>	80
TABELA 23. Proposta de identificação para mês de julho para a variedade <i>Lingua</i>	81
TABELA 24. Proposta de identificação para mês de agosto.	82
TABELA 25. Proposta de identificação para mês de setembro.	83
TABELA 26. Proposta de identificação para mês de outubro.	84
TABELA 27. Proposta de identificação para mês de novembro.	85
TABELA 28. Proposta de identificação para mês de dezembro.....	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema do relógio circadiano.	12
FIGURA 2. Esquema simplificado das principais vias biossintéticas relacionadas à formação de sesquiterpenos, diterpenos e derivados de ácido gálico, com indicação das etapas em que as enzimas GGPP sintase (*) e SDH (***) atuam.	18
FIGURA 3. Grupo de filogenia das Angiospermas (APG III).	19
FIGURA 4. Distribuição filogenética de plantas terrestres de taxas e sucesso da PCR dos <i>locos</i> apresentados.	21
FIGURA 5. Análise circadiana da <i>C. sylvestris</i> (dia 1 e dia 2).....	46
FIGURA 6. Variação circadiana de fenólicos totais e diterpenos totais a cada mês. Cada ponto indica a média de 2 dias em um horário específico	49
FIGURA 7. Perfil cromatográfico de ambas as variedades ao longo de um ano.	51
FIGURA 8. Cromatogramas dos métodos de preparo da amostra.....	52
FIGURA 9. Cromatogramas dos testes feitos com as fibras para HS-SPME.....	53
FIGURA 10. Expansão dos cromatogramas de 0 - 40 minutos das fibras car/pdms 0,75 μm e 0,85 μm . 55	
FIGURA 11. Cromatogramas dos voláteis de folhas de <i>C. sylvestris</i> variedade <i>Lingua</i> , obtidos para dias 1 e 2, em julho, às 9 horas.	55
FIGURA 12. Cromatogramas dos voláteis de folhas de <i>C. sylvestris</i> variedade <i>Sylvestris</i> , obtidos para dias 1 e 2, em julho, às 9 horas.	56
FIGURA 13. Cromatogramas representativos da variedade <i>Lingua</i>	58
FIGURA 14. Cromatogramas representativos da variedade <i>Sylvestris</i>	58
FIGURA 15. Sesquiterpenos e outros compostos identificados.	59
FIGURA 16. Alinhamento e região dos <i>primers</i> GGPP.....	61
FIGURA 17. Alinhamento e região dos <i>primers</i> SDH.	62
FIGURA 18. Fotocópia do resultado da amplificação utilizando enzima <i>Phusion</i> e 48 °C como temperatura de anelamento.	64
FIGURA 19. Substâncias identificadas	88

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Teor de água nas folhas de <i>C. sylvestris</i>	43
GRAFICO 2. Umidade do ar (acima) e temperatura (abaixo) no período de 24 horas.....	44
GRÁFICO 3. Variação sazonal de fenólicos totais nas variedades de <i>C. sylvestris</i> . Cada caixa contém os valores observados nos dois dias de amostragem de cada mês.	50
GRÁFICO 4. Análise Variação sazonal de diterpenos totais nas variedades de <i>C. sylvestris</i> . Cada caixa contém os valores observados nos dois dias de amostragem de cada mês.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 COLETA DAS FOLHAS	23
3 ANÁLISES FITOQUÍMICAS	24
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	24
3.2 MÉTODOS.....	26
3.2.1 Metodologia de análise das amostras de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>Sylvestris</i> e Língua por UPLC-DAD	26
3.2.1.1 <i>Desidratação das folhas</i>	26
3.2.1.2 <i>Preparo do solvente extrator</i>	27
3.2.1.3 <i>Extração da amostra</i>	27
3.2.1.4 <i>Análise cromatográfica</i>	27
3.2.1.5 <i>Forma de análise dos resultados</i>	28
3.2.2 Metodologia para análise das amostras de <i>Casearia sylvestris</i> variedades <i>Sylvestris</i> e Língua por CG-FID	29
3.2.2.1 <i>Testes para definição do modo de preparo das amostras e fibra a ser utilizada para micro extração em fase sólida para as análises por CG-FID</i>	30
3.2.2.2 <i>Método definitivo de análise por CG</i>	31
4 ESTUDOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	32
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	32
4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE <i>Casearia sylvestris</i> VARIEDADES SYLVESTRIS E LÍNGUA POR BIOLOGIA MOLECULAR	33

4.2.1 Primers controle	33
4.2.2 Desenhos dos primers GGPP sintase e SDH	34
4.2.2.1 Primer GGPP sintase	34
4.2.2.2 Primer SDH	34
4.2.2.3 Primers GGPP sintase e SDH	34
4.2.3 Preparo da solução tampão brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	34
4.2.4 Preparo da solução de clorofórmio / álcool isoamílico 24:1 e solução de Etanol 70% 35	
4.2.5 Análises em gel de agarose 1%	35
4.2.6 Extrações de DNA	35
4.2.7 Preparo dos primers GGPP e SDH	36
4.2.8 Reações em cadeia da polimerase (PCR)	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 ANÁLISES DO TEOR DE ÁGUA E DOS DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA.....	43
5.2 VARIAÇÃO CIRCADIANA E SAZONAL DE FENÓLICOS E DITERPENOS.....	45
5.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DAS VARIEDADES ESTUDADAS.....	52
5.4 ESTUDOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	60
5.4.1 Desenhos do primer GGPP	60
5.4.2 Desenhos do primer SDH	61
5.4.3 Quantificação do DNA	63

5.4.4 Resultados das Reações em cadeia da polimerase (PCR)	63
6 CONCLUSÃO	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	66
APÊNDICE A	71
APÊNDICE B	87

1 INTRODUÇÃO

O ritmo circadiano das plantas corresponde ao subconjunto dos ritmos biológicos durante o período de 24 horas, ou seja, um ciclo (THE PLANT CELL, 2006 *apud* DUNLAP *et al.*, 2004). O relógio circadiano define a temporização de vários eventos transcricionais e pós-transcricionais específicos para momentos do dia (KINMONTH-SCHULTZ *et al.*, 2013), sendo vital para o controle de várias atividades fisiológicas (KONDO e ISHIURA, 1999). Os seus componentes não são conservados entre os reinos, sugerindo que os relógios devem ter evoluído independentemente em várias ocasiões (GARDNER *et al.*, 2006). A temporização do relógio com saídas adequadas para o ambiente externo permite a antecipação das transições ambientais e a fase apropriada de fisiologia e metabolismo, aumentando assim o bom estado e a sobrevivência da planta (MÁS e YANOVISKY, 2009).

O relógio circadiano é constituído por vias de entrada de um oscilador de arrastamento do núcleo que gera saídas rítmicas (GARDNER *et al.*, 2006). As vias de entrada fazem o arrastamento de sinais ambientais, tais como a luz e a temperatura, necessitando de mecanismos de transdução destes sinais para o oscilador principal. Um oscilador de núcleo que gera ritmos circadianos e as vias de saída rítmica são acopladas ao oscilador circadiano por meio de vias de transdução. As vias de saída são por vezes definidas como processos que não são essenciais para o oscilador manter o núcleo de oscilações circadianas, mas que podem influenciar as propriedades dos ritmos. Além disso, as vias de entrada também podem influenciar as propriedades de ritmos circadianos, incluindo período, fase e amplitude (MICALLEF, 2011). A Figura 1 ilustra um esquema simplificado do relógio circadiano.

FIGURA 1. Esquema do relógio circadiano.



Fonte: Adaptado de Gardner *et al.*, 2006

Para determinar se um dado processo é regulado pelo relógio endógeno, três características devem ser observadas: a primeira é a persistência de condições ambientais constantes; a segunda é o oscilador estar em ressonância com um ciclo ambiental, estabelecendo com ele uma relação de fase estável e, assim, seu período torna-se igual ao do ciclo ambiental; e, por fim, o período do ritmo endógeno deve apresentar compensação à temperatura (SALLES e BUCKERIDGE, 2012).

A importância do ritmo circadiano para plantas pode ser medida pelo fato de que diversos aspectos do desenvolvimento estão sob seu controle (BARAK *et al.*, 2000). O ciclo controla a expressão genética, a abertura dos estômatos e o componente de tempo de fotoperíodo, que regula a reprodução sazonal, mas a base de sua contribuição para a aptidão durante o crescimento vegetativo permanece indeterminada (DOBB, 2005). A regulação circadiana de muitos aspectos do metabolismo da planta é observada, incluindo a fotossíntese, o metabolismo do amido, a assimilação de nutrientes e o metabolismo secundário (HAYDON *et al.*, 2013).

A base molecular da oscilação circadiana é fundamentada em alças de retroalimentação, sendo que em plantas há uma alça central que gera o ritmo e duas alças de regulação fina, contendo elementos negativos e positivos, abrangendo transcrição e tradução gênicas (KONDO E ISHIURA, 1999; SALLES E BUCKERIDGE, 2012; MICALLEF, 2011; HARMER, 2009).

A expressão genética pode ser controlada ao nível do DNA, RNA ou proteína. No núcleo, os fatores de transcrição se ligam a sequências de DNA, a RNA polimerase II é recrutada para iniciar a transcrição e os precursores de mRNA sofrem reações de processamento, incluindo

capeamento da extremidade 5', *splicing*, poliadenilação da extremidade 3'. Os transcritos são enviados ao citoplasma para a tradução em proteínas. Esse mecanismo controla, pelo menos em parte, a organização temporal dos resultados metabólicos e atividades de desenvolvimento. No sistema circadiano, o momento da transcrição é um importante regulador das oscilações, pois se sabe que genes marca-passo codificam fatores de transcrição ou proteínas que funcionam de alguma forma na regulação dos genes. Assim, genes marca-passo são essenciais para criação e manutenção de ritmos sob condições constantes, sendo que sua inativação geralmente leva a perda do ritmo ou a um maior ou menor período, reforçando a ideia de que os ritmos baseiam-se principalmente em *loops* de *feedback* de transcrição e na ativação ou repressão da expressão gênica. O estudo da expressão de todo o genoma ampliou a quantidade de atividades controladas pelo relógio, mostrando que ritmos moleculares são subjacentes a oscilações fisiológicas (CERMAKIAN, N. e SASSONE-CORSI, 2000; YANOVSKY e KAY, 2001; STAIGER e GREEN, 2011).

Em plantas, metabólitos secundários são um grupo de compostos biossintetizados por diferentes vias bioquímicas cujo conteúdo e regulação são fortemente suscetíveis às influências ambientais e potenciais predadores de ervas naturais (PAVARINI, 2012).

A produção desses compostos pode sofrer modificações de acordo com a interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos que dependem das condições ambientais (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Dentre os diversos fatores que controlam a síntese dos metabólitos secundários, dois efeitos distintos podem ser determinados, o abiótico e o biótico. Efeitos abióticos incluem todos os efeitos físicos do habitat. Já os efeitos bióticos estão relacionados tanto às interações de plantas com micro-organismos ou aspectos fisiológicos da planta, como fenologia e ontogenia (PAVARINI, 2012). Gobbo-Neto e Lopes (2007) listam alguns

dos principais fatores relacionados com os efeitos abióticos e que coordenam ou alteram o conteúdo desses metabólitos são:

- Sazonalidade - diferentes classes de metabólitos secundários são produzidas em diferentes épocas. O conteúdo de óleos essenciais, ácidos fenólicos, alcalóides, taninos, entre outros são exemplos de compostos que sofrem influência das variações sazonais;
- Temperatura – é um fator importante no desenvolvimento, estando diretamente envolvido com a produção dos metabólitos secundários. Baixas temperaturas, por exemplo, promovem aumento no conteúdo de alguns metabólitos secundários. Altas temperaturas parecem aumentar a formação de óleos essenciais;
- Umidade – o índice pluviométrico pode influenciar tanto positivamente quanto negativamente na produção de metabólitos secundários. O estresse hídrico e a continuidade da chuva também se correlacionam com a síntese desses compostos;
- Radiação Ultravioleta – as plantas estão adaptadas a variações na quantidade e intensidade da radiação solar. Compostos fenólicos, por exemplo, são positivamente correlacionados com a intensidade luminosa. A concentração de terpenóides, glicosídeos cianogênicos e alcalóides também são influenciados pela radiação ultravioleta.

Compostos orgânicos voláteis biogênicos são um conjunto de compostos voláteis, por exemplo isoprenos, monoterpenos e sesquiterpenos, que representam aproximadamente 20% do carbono lançado na atmosfera (ZAGARI, 2002). Os isoprenóides sofrem influência de fatores ambientais como a seca e a temperatura. A consequência da emissão desses compostos em relação à seca varia de acordo com a duração em que este fenômeno ocorre, havendo uma diminuição acentuada em períodos de seca prolongada. Temperaturas elevadas, por apenas alguns minutos, provocam um aumento na emissão dos isoprenóides, já uma exposição mais demorada a altas

temperaturas resulta em diminuição de tais metabólitos (NINEMETES *et al.*, 2010). Um estudo feito com óleo essencial de partes aéreas de *Santolina rosmarinifolia* mostrou, no entanto, que alguns compostos são influenciados pela temperatura e pela precipitação, porém outros não sofrem variações de acordo com as condições climáticas, necessitando de estudos mais aprofundados para entender todas as variáveis envolvidas na produção dos metabólitos do óleo essencial (PALÁ-PAÚL *et al.*, 2001).

As espécies de *Casearia* possuem diterpenos clerodânicos altamente oxigenados distribuídos nos vários órgãos da planta. Esses compostos, que apresentam insaturações e, na maioria das vezes, hidroxilas esterificadas, constituem marcadores taxonômicos de *Casearia* (CARVALHO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009). Além desses compostos, relata-se também a ocorrência de diterpenos clerodânicos mais simples (SANTOS *et al.*, 2007).

Foram também descritos sesquiterpenos obtidos de folhas de *C. sylvestris*. Segundo Tininis *et al.* (2006), a constituição do óleo essencial das folhas pode sofrer alterações ao longo do dia. Cavallari (2008) descreve que há indicativos do predomínio de diterpenos clerodânicos na *Casearia sylvestris* variedade *sylvestris*, enquanto na variedade *língua* haveria maior teor de compostos fenólicos.

Os estudos já publicados sobre óleo essencial da *Casearia sylvestris* indicam constituição variada de compostos voláteis (Tabela 1). Nos relatos de Schenider e Sousa (2007) foi verificada a predominância de biciclogermacreno e cariofilenos. Esteves (2005) indica que os principais constituintes do óleo são biciclogermacreno, β -acoradieno, cariofileno e espatulenol, enquanto Tininis encontrou predomínio de germacrenos no óleo de folhas de *C. sylvestris*. Foi verificada a alteração na composição dos constituintes minoritários quando amostras coletadas no período da

manhã e da tarde foram comparadas, sendo a diferença supostamente atribuída a rearranjos no esqueleto carbônico induzidos pela luz.

TABELA 1. Composição de óleos essenciais de folhas de *Casearia sylvestris*, em porcentagem normalizada.

(continua)

Metabólitos	Teor (%) encontrado nas espécies			
	<i>C. sylvestris</i> ²	<i>C. sylvestris</i> ³	<i>C. sylvestris</i> ⁴	<i>C. sylvestris</i> ^{5,6}
β -acoradieno	----	----	20,8	----
álcool benzílico	0,1	0,1	----	----
alloaromadendreno	0,3	0,3	----	----
aromadendreno	0,3	0,3	----	----
biclogermacreno	24,2	24,2	40,9	3,6
α -bisaboleno	0,7	0,7	----	----
β -bisaboleno	----	0,2	----	----
<i>E</i> - γ -bisaboleno	----	----	----	----
β -bourboneno	0,3	0,3	----	----
bulnesol	----	4,2	----	----
calameneno	----	----	1,5	----
α -cadinol	----	----	----	----
<i>t</i> -cadinol	----	0,5	----	----
γ -canideno	0,3	0,3	----	----
δ -canideno	0,6	0,6	----	(1,7)
cariofileno	----	----	13,8	----
α -cariofileno	27,5	----	----	----
β -cariofileno	----	27,5	----	----
α -copaeno	0,6	0,6	----	----
α -cubebeno	----	----	----	----
cubebol	0,4	0,4	----	----
elemeno	1,1	----	----	----
β -elemeno	1,3	1,3	----	----
γ -elemeno	0,2	1,1	----	----
δ -elemeno	----	----	----	----
elemol	----	0,8	----	----
espatulenol	----	0,9	12,6	----
γ -eudesmol	----	0,6	----	----
eugenol	0,2	0,2	----	----
<i>Z,E</i> -farnesol	----	0,3	----	----
germacreno A	----	----	----	----
germacreno B	----	0,9	3,9	14,8 (13,7)
germacreno D	7,8	7,8	1,9	79,2 (66,2)
globulol	----	1,2	2,2	----
guaiol	----	4,7	----	----
α -gurjuneno	0,1	0,1	----	----
β -gurjuneno	0,4	0,4	----	(1,1)
γ -gurjuneno	----	----	----	(2,2)
α -humuleno	3,9	3,9	3,7	----
ledol	----	0,8	----	----
linalol	0,8	0,8	----	----

²SCHNEIDER *et al.*, 2006; ³SOUSA *et al.*, 2007^a; ⁴ESTEVES *et al.*, 2005; ⁵TITINIS *et al.*, 2006. ⁶valores em itálico referem-se a folhas coletadas no período da manhã e valores entre parênteses são referentes a análises feitas em folhas coletadas à tarde, no mesmo indivíduo.

TABELA 1. Composição de óleos essenciais de folhas de *Casearia sylvestris*, em porcentagem normalizada. (Conclusão)

Metabólitos	Teor (%) encontrado nas espécies			
	<i>C. sylvestris</i> ²	<i>C. sylvestris</i> ³	<i>C. sylvestris</i> ⁴	<i>C. sylvestris</i> ^{5,6}
longifileno	-----	-----	-----	1,8 (3,2)
muuroleno	0,2	-----	-----	-----
γ -muuroleno	-----	0,2	-----	(3,0)
t-muurolol	-----	0,1	-----	-----
óxido de cariofileno	-----	0,6	-----	-----
α -pineno	2,0	2,0	-----	-----
pulegona	0,5	0,5	-----	-----
α -selineno	-----	-----	-----	-----
β -selineno	-----	-----	-----	4,2 (5,2)
tujopseno	-----	-----	5,2	-----
viridiflorol	-----	1,9	-----	-----

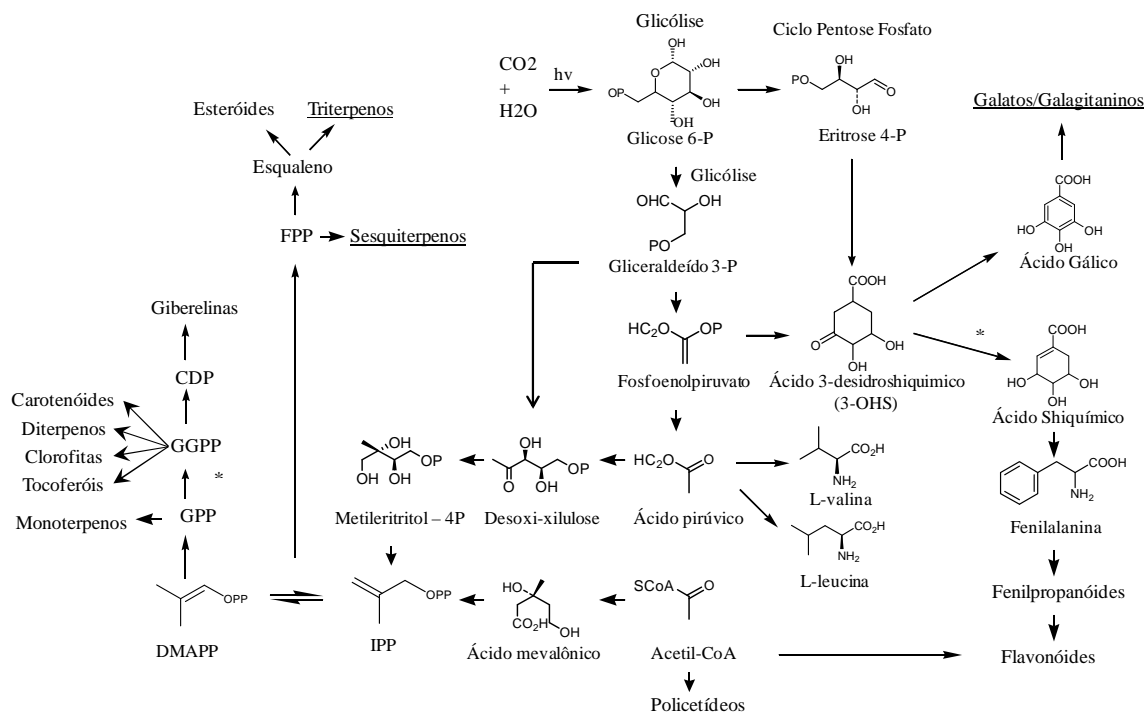
²SCHNEIDER *et al.*, 2006; ³SOUSA *et al.*, 2007^a; ⁴ESTEVEZ *et al.*, 2005; ⁵TITINIS *et al.*, 2006. ⁶valores em itálico referem-se a folhas coletadas no período da manhã e valores entre parênteses são referentes a análises feitas em folhas coletadas à tarde, no mesmo indivíduo.

O geranilgeranil pirofosfato (GGPP) é um precursor essencial para a biossíntese de diterpenos. A enzima GGPP sintase catalisa a reação de condensação do pirofosfato de farnesila (FPP) com o pirofosfato de isopentenila para produzir GGPP, sendo considerada uma importante enzima do ponto de ramificação na biossíntese de terpenóides (MAYNOR *et al.*, 2008).

A enzima chiquimato desidrogenase (SDH) é responsável pela catálise, NADP-dependente, do quarto passo na biossíntese do chiquimato, que é essencial para o metabolismo do ácido aromático em plantas. A SDH representa uma classe distinta de enzimas que não têm semelhança de sequência primária com outras classes de desidrogenases. Em plantas superiores, a SDH é parte de uma enzima bifuncional, que catalisa o terceiro e quarto passos da via do chiquimato (PADYANA e BURLEY, 2003).

A figura 2 ilustra a etapa catalisada pelas enzimas geranilgeranil pirofosfato sintase e chiquimato desidrogenase na via biossintética de diterpenos e derivados do ácido gálico.

FIGURA 2. Esquema simplificado das principais vias biossintéticas relacionadas à formação de sesquiterpenos, diterpenos e derivados de ácido gálico, com indicação das etapas em que as enzimas GGPP sintase (*) e SDH (***) atuam.

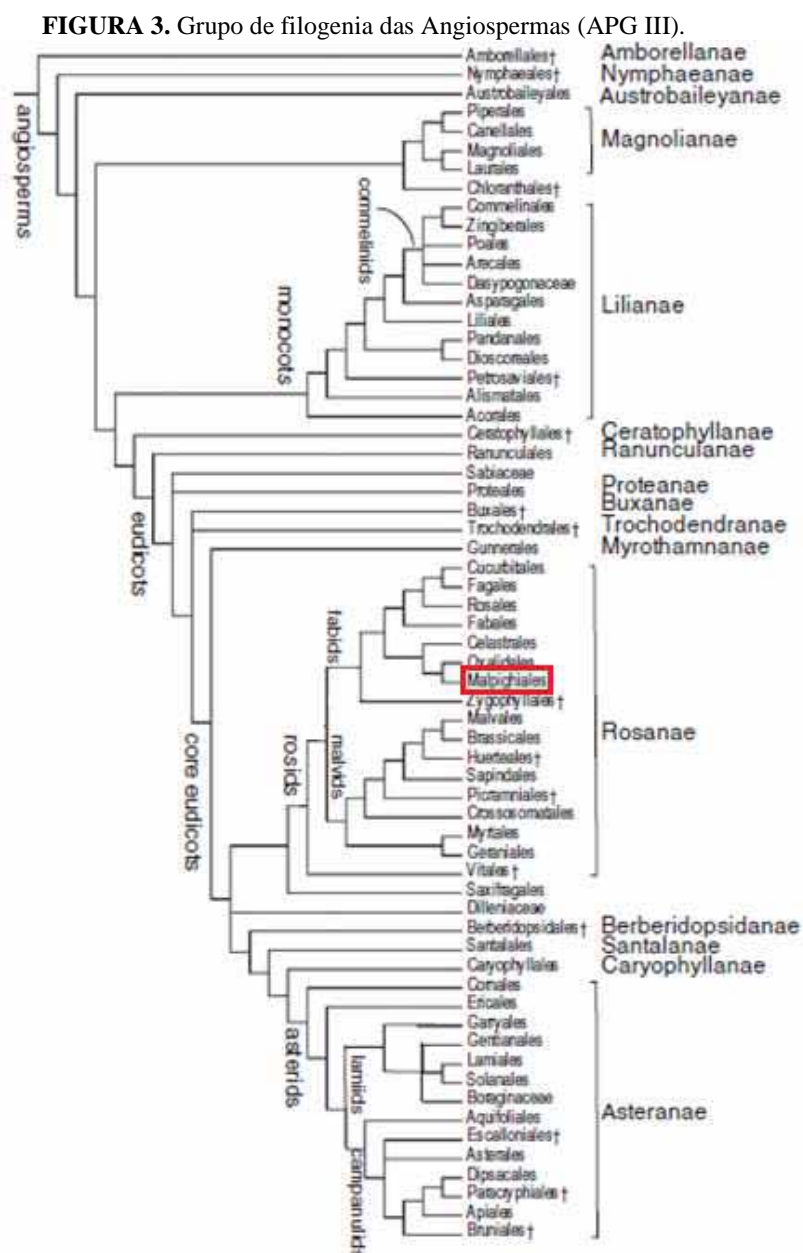


Fonte: Autoria própria

Na esfera da genética, estudos indicam a existência de diferenças significativas entre as duas variedades de *Casearia sylvestris* (CAVALLARI M. M., *et al.*, 2010). Entretanto, não há relatos na literatura que caracterizem os genes que codificam para as enzimas geranylgeranyl pirofosfato desidrogenase sintase e chiquimato desidrogenase para essa planta.

Para estudos de biologia molecular em plantas superiores, a classificação taxonômica proposta denominada por Grupo de Filogenia das Angiospermas (APG) é usualmente utilizada. O APG foi criado em 1998 e atualmente encontra-se disponível a terceira classificação, feita em 2009 (APG III), que considera apenas famílias e ordens vegetais. *Casearia sylvestris*, por exemplo, pertence à família *Salicaceae* e à ordem *Malpighiales*, sendo facilmente localizada na classificação com tais informações. Esse sistema de classificação se baseia, principalmente, na sequência dos

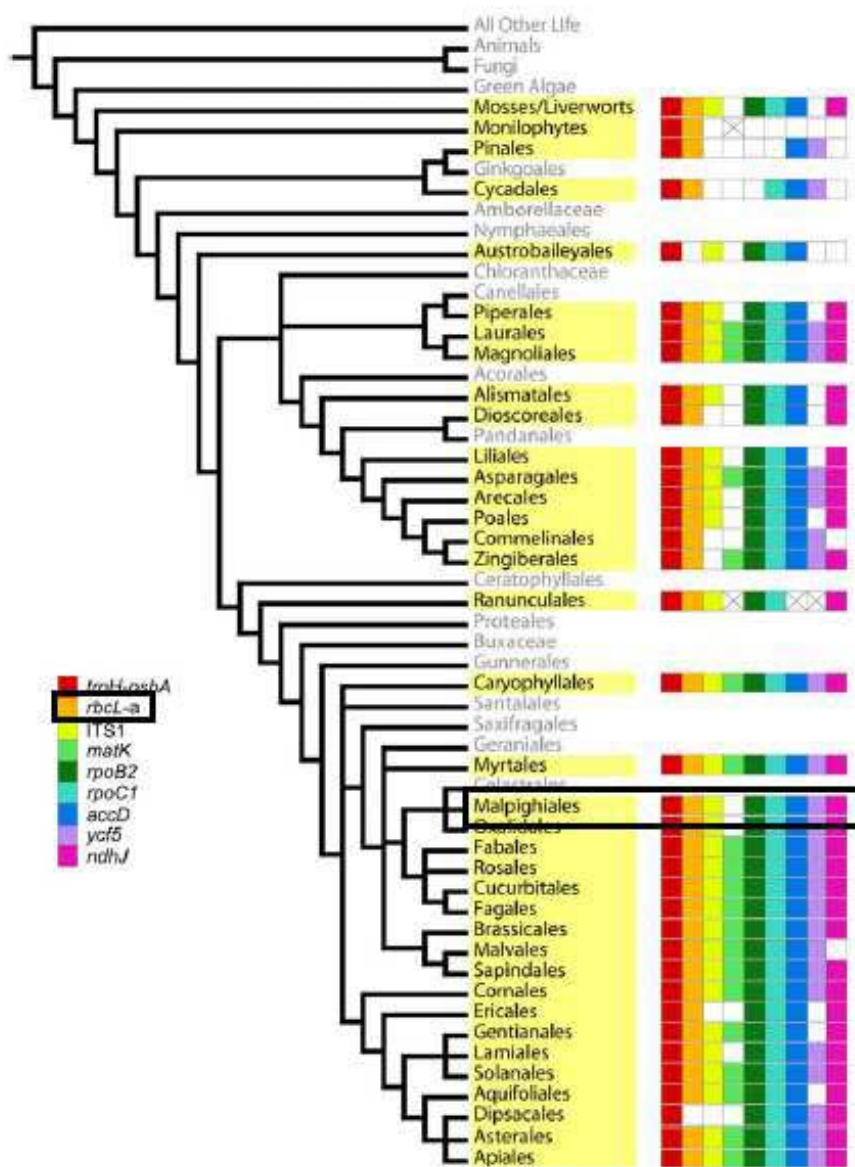
genes *rbcl* e *atpB*, sendo que o primeiro gene codifica a maior subunidade da enzima rubisco e o segundo codifica a subunidade beta da enzima ATP sintase ribossomal (CHASE M.W. e REVEAL, J.L., 2009; ANGIOSPERMAS WEBSITE FILOGENIA). A figura 3 ilustra a classificação proposta no APG III.



Fonte: ANGIOSPERMAS WEBSITE FILOGENIA. Disponível em:
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Atualmente, os códigos de barras de DNA (DNA *barcodes*) propostos para plantas incluem *matK* e *rbcl*. Códigos de barras consistem em sequências curtas de DNA, contendo entre 400 e 800 pares de bases, que podem ser amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciados. Para serem considerados ideais, os códigos de barras devem permitir sequenciamento bidirecional, ser facilmente recuperáveis com um único par de *primers* e fornecer discriminação máxima entre as espécies. Individualmente, *rbcl* e *matK* possuem atributos que são altamente desejáveis em um sistema de DNA *barcoding* vegetal, entretanto nenhum dos 2 *loci* atende aos critérios citados. Contudo, o *rbcl* apresenta alta universalidade e bom poder de discriminação, sendo amplamente utilizada no estudo de plantas. Para estudos de biologia molecular da *Casearia sylvestris*, pode-se fazer uso do *rbcl* como fragmento para exploração do DNA da planta, pois estudos demonstram sucesso em reações de PCR (ALI *et al*, 2014; BHARGAVA e SHARMA, 2013; CBOL Plant Working Group, 2009; KRESS, W.J e ERICKSON, D.L, 2007). A figura 4 mostra a distribuição filogenética de plantas terrestres.

FIGURA 4. Distribuição filogenética de plantas terrestres de taxas e sucesso da PCR dos *locos* apresentados.



Fonte: KRESS e ERICKSON, 2007; doi:10.1371/journal.pone.0000508.g001

A caracterização dos genes que codificam as enzimas GGPP sintase e SDH pode ser realizada utilizando PCR em tempo real (PCR-RT) e sequenciamento do DNA. Avanços na extração de DNA e em técnicas de quantificação permitiram que baixas quantidades de DNA fossem quantificadas com altos níveis de precisão e sensibilidade. A PCR em tempo real é

atualmente a ferramenta de elite para a detecção específica e quantificação precisa de DNA endógeno ou transgênico. Nessa técnica, o DNA amplificado é quantificado por meio da incorporação de fluoróforos durante o anelamento e a extensão. A fluorescência tem a forma de uma curva formada conforme se esgota a Taq polimerase ou os componentes consumíveis da reação. A automação foi um grande avanço no campo do sequenciamento do DNA, proporcionando aumento na facilidade, na confiabilidade e na relação custo-eficácia. (GULDEN, *et al.*, 2007; SAVAZZINI e MARTINELLI, 2006; SINGH, *et al.*, 2012).

Neste contexto, no presente trabalho, os objetivos pretendidos foram realizar estudos de dinâmica metabólica (circadiana e sazonal) em terpenos e derivados de ácido gálico, utilizando para isso uma árvore de *C. sylvestris* var. Língua e outra da var. *Sylvestris*, visando à caracterização detalhada da produção desses metabólitos pelo vegetal. Adicionalmente, foram realizados estudos preliminares de biologia molecular com o objetivo de iniciar a caracterização de genes relacionados com enzimas chaves (GGPP e SDH) na produção de diterpenos e galatos.

2 COLETA DAS FOLHAS

As árvores de *C. sylvestris* das variedades Língua e Sylvestris utilizadas para amostragem localizam-se no Clube ASCAR, Estrada Abilio Augusto Correia n. 200, Bairro dos Machados, Araraquara/SP, sendo a distância entre os indivíduos amostrados de cerca de 50 metros. As coletas foram iniciadas no mês de agosto de 2012 e, a partir de então, mensalmente, cerca de 10 gramas de folhas das variedades Língua e Sylvestris foram amostradas num período de 48 horas com coletas a cada 3 horas.

Após a coleta, as folhas foram limpas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo mantidas em freezer -86°C até o preparo das amostras.

Os dados de temperatura e umidade foram monitorados com o uso de um termo higrômetro e dados mais detalhados foram obtidos em parceria com Michele Souza, aluna de doutorado do professor Arnaldo Alves Cardoso, do Instituto de Química da Unesp Araraquara.

3 ANÁLISES FITOQUÍMICAS

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos necessários para os experimentos no HPLC-DAD foram:

- Freezer - 86°C, Forma Scientific, modelo 92;
- Estufa para esterilização e secagem Gehaka G4023D;
- Banho de ultrassom modelo USC 2800, UNIQUE;
- Balanças AG245 (Mettler Toledo) e BG 2000, Gehaka;
- Nitrogênio líquido;
- Mini-centrífuga Denver Instrument;
- Galato de butila Sigma- Aldrich®;
- Solventes: Acetonitrila, Etanol, Isopropanol J.T.Baker, grau HPLC;
- Sistema de purificação de água Millipore Mili-Q®;
- Coluna para análises no UPLC Core-Shell Kinetex de 150 mm x 2,1 mm i.d. x 2,6 µm, com pré-coluna;
- UPLC, modelo Ultimate 3000, marca Dionex® equipado com duas bombas modelo DGP-3600RS, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo DAD3000(RS), amostrador automático modelo WPS3000RS e softwareChromeleon versão 6.80. A frequência de aquisição de dados foi de 5,0 Hz;
- Filtros de nylon 0,22 µm, 13 mm de diâmetro Lac;
- Vidrarias de laboratório.

Os materiais e equipamentos necessários para os experimentos no CG-FID foram:

- Nitrogênio líquido;
- Freezer - 86°C, Forma Scientific, modelo 92;
- Vidrarias de laboratório;
- Cromatógrafo a gás Varian CP - 3800, com injetor manual e detector de ionização em chama, software Galaxie;
- Coluna para análises no CG Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,1µm;
- Seringa 8200, Varian MD- 35-11-1;
- Cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010 equipado com *injetor automático AOC-5000 Shimadzu* e interface com um espectrômetro de massa, *software GCMS solutions Ver. 2.5.*;
- Coluna para análise no CG-MS Phenomenex ZB-5MS (30 mx 0,25 x 0,25 mm).

Para os testes de micro extração em fase sólida do tipo headspace (HS-SPME) dos voláteis foram usadas as seguintes fibras (Supelco):

- *Carboxen/Polydimethylsiloxane* (car/pdms) 75 µm;
- *Carboxen/Polydimethylsiloxane* (car/pdms) 85 µm;
- *Polydimethylsiloxane* (pdms) 100 µm;
- *Polydimethylsiloxane/ Divinylbenzene* (pdms/dvb) 65 µm;
- *Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane* (dvb/car/pdms) 50/30 µm;
- *Polyacrylate* 85 µm;

3.2 MÉTODOS

Os compostos das folhas de *C. sylvestris* foram estudados por meio de métodos de análise por HPLC e CG.

3.2.1 Metodologia de análise das amostras de *Casearia sylvestris* var. *Sylvestris* e Língua por UPLC-DAD

Os itens de 3.2.1.1 a 3.2.1.4 foram desenvolvidos pela aluna de doutorado Paula C. P. Bueno, bolsista FAPESP (processo nº 2011/21440-3), cujo projeto esteve interligado com este trabalho, o qual resulta de uma iniciação científica.

3.2.1.1 Desidratação das folhas

Colocou-se de 3 a 5 folhas frescas e congeladas em placas de Petri, devidamente identificadas e previamente pesadas. O material foi desidratado em estufa a 55°C, durante 24 horas. Todas as placas de Petri foram pesadas após esse período e, com os dados obtidos, calculou-se o teor de água das amostras conforme a fórmula 1:

$$\% \text{ Água} = 100 - \left(\left(\frac{M3 - M1}{M2 - M1} \right) \times 100 \right) \quad (1)$$

Em que:

M1 = massa das placas de Petri

M2 = massa das placas de Petri + folhas frescas e congeladas

M3 = massa das placas de Petri + folhas desidratadas

As folhas desidratadas foram trituradas em gral de porcelana utilizando nitrogênio líquido.

3.2.1.2 Preparo do solvente extrator

O solvente extrator, composto por etanol, isopropanol e água MiliQ na proporção de 3:2:5, respectivamente, foi definido através do planejamento fatorial simplex centróide. Primeiramente, preparou-se esta mistura em frasco separado devido à retração de volume. Para cada 10 mL do solvente extrator, adicionou-se 5 mg do padrão interno galato de butila. Após homogeneização, a mistura foi acondicionada em frasco hermético.

3.2.1.3 Extração da amostra

Para extração, foram transferidos 50 mg de folhas secas e trituradas para um tubo *eppendorf* e adicionou-se 1 mL do solvente extrator. Essa mistura foi levada ao ultrassom por uma hora, agitando-a a cada vinte minutos.

Após esse período, a amostra foi centrifugada a 5000 x g por 5 minutos. Finalmente, 0,7 mL do sobrenadante foram recolhidos e filtrados em filtro de nylon diretamente para o frasco do amostrador automático. Cada amostra foi preparada em única replicata.

3.2.1.4 Análise cromatográfica

As condições da análise cromatográfica utilizadas foram: volume de injeção de 2 μ L, vazão de 400 μ L/min, temperatura da coluna de 35°C e detecção na faixa de 200-800 nm. A coluna utilizada consta no item 3.1 e a fase móvel é composta por acetonitrila e água miliQ. O gradiente

utilizado foi: 10 a 25% de acetonitrila por 15 minutos e 25 a 90% de acetonitrila em 20 minutos, permanecendo nesta condição por 5 minutos. O tempo de condicionamento da coluna foi de 2 minutos, sendo mantida na condição inicial por 3 minutos. Ao final, o tempo de análise foi de 45 minutos.

3.2.1.5 Forma de análise dos resultados

O tratamento dos dados referentes ao teor de água nas folhas foi feito da seguinte maneira: calculou-se o teor de água utilizando a fórmula descrita no item 3.2.2.1 para cada horário de coleta. Com os resultados obtidos, fez-se uma média para os meses entre os teores de todos os horários para cada dia de coleta separadamente. Ao final, calculou-se a média das médias obtidas para o dia 1 e 2.

As condições ambientais foram monitoradas pela medição da temperatura e umidade relativa do ar. A análise dos dados consistiu em calcular a média dos parâmetros estudados dos dois dias de coleta, separando-os por horário.

Para a análise do dados do ciclo circadiano, foi feito um cálculo da razão entre a área dos picos de interesse (agrupados em compostos fenólicos e diterpenos) e a área do pico do padrão interno, para todos horários de coleta dos dois dias e para todos os meses separadamente (Fórmulas 2 e 3), com o objetivo de comparar os dois dias de coleta (dados organizados em gráfico de linha). Posteriormente, para a comparação entre as duas variedades em função da expressão das duas classes de metabólitos, calculou-se a média da razão encontrada entre os dois dias de coleta (Fórmula 4) e os dados foram organizados em gráficos tipo “radar”.

$$R(\text{dia 1}) = \frac{A_n}{A_{PI}} \quad (2)$$

$$R'(\text{dia 2}) = \frac{A_n}{A_{PI}} \quad (3)$$

$$\bar{X} = \frac{R + R'}{2} \quad (4)$$

Em que:

A_n = área dos picos de interesse

A_{PI} = área do pico do padrão interno

R = razão entre a área dos picos n e a área do pico padrão interno para o dia 1 de coleta

R' = razão entre a área dos picos n e a área do pico do padrão interno para o dia 2 de coleta

\bar{X} = média entre as razões

Já para a análise do ciclo sazonal, para cada variedade e para cada classe de metabólitos, fez-se uma média de todos dos resultados obtidos nos dois dias de coleta de cada mês (totalizando-se 16 pontos), sendo os dados organizados em gráfico de linhas.

3.2.2 Metodologia para análise das amostras de *Casearia sylvestris* variedades Sylvestris e Língua por CG-FID

Primeiramente definiu-se qual a melhor metodologia para extração dos voláteis bem como a fibra para a micro extração em fase sólida. Com essas respostas em mãos, definiu-se as melhores condições de análise por CG-FID.

3.2.2.1 Testes para definição do modo de preparo das amostras e fibra a ser utilizada para micro extração em fase sólida para as análises por CG-FID

Para saber qual modo de preparo das amostras seria o mais eficiente no que diz respeito à quantidade de picos obtidos na análise, realizou-se a extração dos voláteis de duas maneiras, preparando apenas uma replicata em cada teste. A massa das amostras foi de, aproximadamente, 200 mg, a fibra utilizada foi car/pdms 75 μm e o método de análise aplicado foi o definido no item 3.2.2.2. As folhas usadas foram obtidas das amostras de dezembro de 2012 que se encontravam acondicionadas no freezer -86°C . A temperatura do ambiente durante o processo de extração e análise era de 21.9°C .

Primeiramente, a extração foi feita com uma folha inteira colocada em um frasco de 4 mL, depois, uma folha foi triturada em nitrogênio líquido e transferida para outro frasco de 4 mL. Nos dois casos, o procedimento seguinte foi introduzir a fibra nos frascos com a amostra, deixando-a exposta por 40 minutos para a adsorção dos voláteis. Posteriormente, a fibra foi submetida à análise em GC-FID, ficando exposta no injetor por 5 minutos para a dessorção dos voláteis. Tanto o preparo das amostras quanto as análises foram feitas em ordem aleatória.

Com os cromatogramas resultantes, que se encontram no item 5.3, fez-se uma avaliação e escolha da metodologia a ser utilizadas nas extrações realizadas futuramente.

Para definir qual seria a melhor fibra para a realização da micro extração em fase sólida, foram utilizadas amostras também de dezembro de 2012, os seis tipos de fibras contidos nos materiais e métodos (item 5.3) e o método de extração foi o descrito anteriormente neste item, utilizando folhas inteiras.

Tanto para a escolha da metodologia de extração dos voláteis quanto para definição de fibra, o método utilizado no equipamento seguiu os parâmetros: temperatura do injetor: 200°C, modo de injeção *split* 1:10, temperatura do detector: 250 °C. Programa de temperatura do forno: 50°C por 3 minutos, a seguir aquecimento a uma taxa de 3°C/min até 220°C, mantendo essa condição por 10 minutos. O tempo de análise foi de 66,67 minutos. Vazão do gás de arraste (N₂): 1,0 mL/min, gás de *make up* (N₂): 29 mL/min, ar sintético: 10 mL/min e hidrogênio: 1 mL/min.

Com os resultados de ambas as análises chegou-se a um método de preparo das amostras e extração dos voláteis.

3.2.2.2 Método definitivo de análise por CG

Para o procedimento utilizou-se o cromatógrafo a gás e a coluna descritos no item 3.1.

Para a análise dos voláteis de todas as amostras selecionadas, foram feitas algumas modificações na metodologia citada no item anterior, pois verificou-se que aumentando a temperatura do injetor em 20°C, era possível diminuir o tempo de análise, melhorando a condição do experimento. Assim, os parâmetros do método definitivo foram: temperatura do injetor de 220°C por 5 minutos para a dessorção dos voláteis, modo de injeção *split* 1:10, temperatura do detector de 250°C. Programa de temperatura do forno de 50°C por 3 minutos, a seguir aquecimento a uma taxa de 3°C/min até 200°C. O tempo de análise foi de 50 minutos. Vazão do gás de arraste (N₂): 1,0 mL/min, gás de *make up* (N₂): 29 mL/min, ar sintético: 10 mL/min e hidrogênio: 1 mL/min.

A utilização de uma programação linear de temperatura foi utilizada para obtenção de dados para o cálculo do índice de retenção.

4 ESTUDOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados nos experimentos de biologia molecular foram:

- Isopropanol Sigma- Aldrich®;
- Clorofórmio Sigma- Aldrich®;
- Beta-mercaptanol Sigma- Aldrich®;
- Brometo de etídeo Hexapur;
- Agarose Sigma- Aldrich®;
- Tampão TAE (Tris – Acetato – EDTA);
- Álcool etílico Qhemis;
- Precellys Bertin Technologies;
- Espectrofotômetro Epoch Biotek;
- Termociclador Veriti – Applied Biosystems;
- Termociclador PE Applied Biosystems – Gene Amp® PCR System 9700;
- Centrífuga Beckman – Allegra™ 21R Centrifuge;
- Eletroforese Life Technologies, Inc. Modelo Horizon® 58;
- Fotodocumentador Multimage® I – Alpha Innotech;
- Banho-maria Boekel Scientific;
- DNA Speed Vac® DNA 110 Savant;
- Água Ultrapura – Equipamento Milipore Synthesis;
- Balança PB303 Mettler Toledo;

- *Primer* GGPP Exxtend;
- *Primer* SDH Exxtend;
- *Primer* rbcLa_f e rbcLajf634_r;
- Enzima *Phusion DNA Polimerase* 2U/ μ L Thermo Scientific;
- Enzima *Platinum® Taq Polimerase* 5 U/ μ L Invitrogen;
- Enzima *AmpliTaq®* (250U) Applied Biosystem;
- Enzima *Pfu* 2.5 U/ μ L Fermentas.

4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE *Casearia sylvestris* VARIEDADES SYLVESTRIS E LÍNGUA POR BIOLOGIA MOLECULAR

A metodologia e os componentes para a realização dos estudos de biologia molecular encontram-se relacionados nos próximos itens.

4.2.1 *Primers* controle

Os primers controle utilizados foram cedidos pela aluna de mestrado Laís Simões Sampaio (FAZEKAS *et al.*, 2008):

Primer rbcLa_f 10 μ M: 5' ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC 3'

Primer rbcLajf634_r 10 μ M: 5' GAAACGGTCTCTCCAACGCAT 3'

4.2.2 Desenhos dos *primers* GGPP sintase e SDH

Os *primers* GGPP e SDH foram desenhados e as sequências finais seguem nos próximos itens.

4.2.2.1 *Primer GGPP sintase*

Primer Forward: 5' CAATGTAATTAGCYAAAGCM 3'

Primer Reverse: 5' GTGAMTYTAGGTTTCATGGRTTS 3'

4.2.2.2 *Primer SDH*

Primer Forward: 5' CTCAGGACYTTYTAATATTTTC 3'

Primer Reverse: 5' CAATCGCAAYTTYGAGAGG 3'

4.2.2.3 *Primers GGPP sintase e SDH*

Os *primers* foram adquiridos da empresa Exxtend solução em oligos. A quantidade em nmol e a temperatura de anelamento foram de:

GGPP_f: 18,9 nmol, 56 °C; GGPP_r: 22,4 nmol, 66 °C;

SDH_f: 21,1 nmol, 58 °C; SDH_r: 21,1 nmol, 56 °C.

4.2.3 Preparo da solução tampão brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

Para 1 litro de solução tampão misturou-se 20 g de CTAB, 82 g de NaCl, 20 g de PVP 10000 (PVP 10 – Sigma) e 400 ml de H₂O. Acrescentou-se 100 mL de Tris 1 M pH 8,0 e 100 mL

de EDTA 0,5 M pH 8,0. Em seguida, a mistura é levada para agitação a 50°C até dissolução completa. Após esfriar, completou-se o volume para 1 litro, conservando em temperatura ambiente.

No momento da extração, para cada 10 mL de tampão acrescentou-se 20 µL de β-mercaptoetanol.

4.2.4 Preparo da solução de clorofórmio / álcool isoamílico 24:1 e solução de Etanol 70%

Para o preparo da solução de clorofórmio e álcool isoamílico misturou-se 24 partes de clorofórmio para 1 parte do álcool.

A solução de etanol 70% foi preparada adicionando-se 30 mL de água destilada a 70 ml de etanol absoluto, mantendo a mistura a - 20 °C.

4.2.5 Análises em gel de agarose 1%

Para visualização do DNA, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). Após corrida eletroforética a 5V/cm, os géis foram corados com brometo de etídeo e a visualização do gel foi feita sobre iluminação ultravioleta.

4.2.6 Extrações de DNA

A extração do DNA foi feita de folhas provenientes das coletas das 6h do mês de fevereiro/2013 e das 9h do mês de abril/2013, selecionadas a partir dos resultados obtidos nas análises de diterpenos e fenólicos.

O protocolo de extração de DNA utilizado foi desenvolvido por Murray e Thompson (1980). O procedimento consiste em macerar 0,2 g de folhas em 1,2 ml de tampão de extração contendo β -mercaptanol. O macerado é colocado em banho-maria por trinta minutos a 65°C e, em seguida, centrifugado a 1300 rpm por 5 minutos. Cerca de 400 μ L do sobrenadante é recuperado e misturado com 400 μ L clorofórmio álcool isoamílico (24:1), essa mistura é centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos. Em seguida, recolhe-se 300 μ L do sobrenadante e a este se adiciona 0,6 do volume de isopropanol, deixando por trinta minutos a -4°C. Na sequência, a mistura é centrifugada a 1300 rpm por 20 minutos. O sobrenadante obtido é descartado e ao *pellet* formado adiciona-se 900 μ L de álcool 70% gelado, centrifugando a 1300 rpm por 10 minutos, repetindo essa etapa mais uma vez. O *pellet* é seco a vácuo em concentrador centrífugo.

A quantificação do DNA extraído é feita por espectrofotometria e a concentração do DNA em ng/ μ L obtida através do cálculo:

$$\frac{ng}{\mu L} = \frac{Quantidade\ de\ DNA\ puro}{Diluição - Quantidade\ de\ DNA\ puro} \quad (5)$$

Onde, a quantidade de DNA puro é fornecida pela leitura no equipamento e a diluição utilizada é de 10 vezes. A razão 260/280 refere-se à pureza do DNA, o valor encontrado deve estar compreendido entre 1,8 e 2,1.

4.2.7 Preparo dos *primers* GGPP e SDH

Para estoque, os *primers* foram dissolvidos em H₂O ultrapura a 100 pmol/ μ L. Para isso acrescentou-se o volume de água necessário, de acordo com a concentração inicial de cada *primer*.

- GGPP forward: 18,9 nmol *primer* + 189 μ L de H₂O ultrapura estéril;
- GGPP reverse: 22,4 nmol *primer* + 224 μ L de H₂O ultrapura estéril;

- SDH forward: 21,1 nmol *primer* + 211 μL de H_2O ultrapura estéril;
- SDH reverse: 21,1 nmol *primer* + 211 μL de H_2O ultrapura estéril.

Para o preparo das soluções de trabalho, misturou-se uma alíquota de 5 μL da solução mãe de cada *primer* com 45 μL de água ultrapura estéril. O volume final da solução de trabalho dos *primers* foi de 50 μL e a concentração final foi de 10 μM .

4.2.8 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

Os produtos, de todas as PCRs, foram separados em gel de agarose 1% (vide item 4.2.5).

A primeira PCR foi feita para confirmar a correta execução da extração do DNA das folhas, para isso utilizou-se a enzima *Taq Polimerase* de alta fidelidade e os *primers* descritos no item 2.4.1. Foram misturados os 19 μL do mix com 1 μL do DNA 10 ng/ μL (tabela 2).

TABELA 2. Composição do mix para PCR

Componentes	Volume
Tampão	2 μL
MgCl₂	1 μL
dNTP	0,8 μL
<i>Primer forward</i>	1 μL
<i>Primer reverse</i>	1 μL
<i>Platinum® Taq Polimerase</i>	0,2 μL
H₂O	13 μL

O ciclo para amplificação dos fragmentos está descrito na tabela 3.

TABELA 3. Ciclo de amplificação - PCR com enzima *Platinum® Taq Polimerase*

Temperatura (°C)	Tempo	
95	4 min	
94	30 seg	} 35 x
55	1 min	
72	1 min	
72	10 min	
10	∞	

Na sequência, foram feitas PCRs utilizando os *primers* GGPP e SDH. Primeiramente, realizou-se uma PCR cujos componentes da reação estão descritos na tabela 4. A enzima utilizada foi a *Phusion* de alta fidelidade e os *primers* GGPP e SDH preparados anteriormente. Para a PCR foram misturados os 19 µL do mix com 1 µL do DNA 10 ng/µL.

TABELA 4. Preparo do mix para PCR com enzima *Phusion* Teste 1

Componentes	Volume
Tampão	4 µL
dNTP 10 mM	0,4 µL
<i>Primer forward</i> 10 µM	1 µL
<i>Primer reverse</i> 10 µM	1 µL
<i>Phusion</i>	0,2 µL
H₂O	12,4 µL

A PCR consistiu em 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 98 °C, anelamento dos *primers* a 52 °C e extensão a 72 °C, conforme descrito na tabela 5.

TABELA 5. Ciclo de amplificação - PCR com enzima *Phusion* Teste 1

Temperatura (°C)	Tempo	
98	30 seg	
98	10 seg	} 30 x
52	30 seg	
72	45 seg	
72	10 min	
10	∞	

Outra PCR utilizando a mesma enzima foi feita, alterando-se a quantidade dos *primers* (tabela 6) e a temperatura de anelamento.

TABELA 6. Preparo do mix para PCR com enzima *Phusion* Teste 2

Componentes	Volume
Tampão	4 µL
dNTP 10 mM	0,4 µL
<i>Primer forward</i> 10 µM	2 µL
<i>Primer reverse</i> 10 µM	2 µL
<i>Phusion</i>	0,2 µL
H₂O	12,4 µL

Esta reação consistiu em 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 98 °C, anelamento dos *primers* a 48 °C e extensão a 72 °C (tabela 7).

TABELA 7. Ciclo de amplificação - PCR Enzima *Phusion* Teste 2

Temperatura (°C)	Tempo	
98	30 seg	
98	15 seg	
48	30 seg	} 30 x
72	40 seg	
72	5 min	
10	∞	

Ainda utilizando a enzima *Phusion*, fez-se outra reação, porém dessa vez alterando a concentração do DNA. Os componentes da PCR e o ciclo utilizado para amplificação do DNA foram os mesmos descritos anteriormente porém, com a diferença na concentração do DNA utilizada. Para obtenção das novas concentrações de DNA, volumes foram tomados da solução de DNA 10 ng/μL preparada anteriormente. Assim, para obtenção da concentração de 5 ng/μL, a alíquota foi de 0,5 μL do DNA com concentração de 10 ng/μL, para 20 ng/μL, foi utilizada uma alíquota de 2 μL e para 40 ng/μL, tomou-se 4 μL. Para a PCR utilizou-se 1 μL de cada solução de DNA, misturado com 19 μL do mix.

Nova PCR foi feita usando a enzima *Pfu*. A tabela 8 contém os componentes e suas respectivas quantidades e a tabela 9 contém a ciclagem utilizada.

TABELA 8. Preparo do mix para PCR com enzima *Pfu*

Componentes	Volume
Tampão	5 μL
dNTP 10 mM	5 μL
<i>Primer forward</i> 10 μM	1,25 μL
<i>Primer reverse</i> 10 μM	1,25 μL
<i>Pfu</i>	0,2 μL
H₂O	11,3 μL

TABELA 9. Ciclo de amplificação - PCR Enzima *Pfu*

Temperatura (°C)	Tempo
95	3 min
95	30 seg
50	30 seg
72	2 min
72	10 min
10	∞

} 30 x

Fez-se um teste também utilizando a enzima *AmpliTaq*. Os componentes para a reação de PCR bem como seus volumes estão listados na tabela 10.

TABELA 10. Composição do mix para PCR com enzima *AmpliTaq*

Componentes	Volume
Tampão	2,5 µL
MgCl₂	2,5 µL
dNTP 10 mM	2 µL
Primer forward 10 µM	1,25 µL
Primer reverse 10 µM	1,25 µL
<i>AmpliTaq</i>	0,125 µL
H₂O	14,375 µL

Para a PCR foram misturados os 24 µL do mix com 1 µL do DNA 10 ng/µL, sendo realizadas em 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 95 °C, anelamento dos *primers* a 52 °C e extensão a 72 °C (tabela 11).

TABELA 11. Ciclo de amplificação - PCR Enzima *AmpliTaq*

Temperatura (°C)	Tempo
94	3 min
95	30 seg
52	30 seg
72	60 seg
72	7 min
10	∞

} 30 x

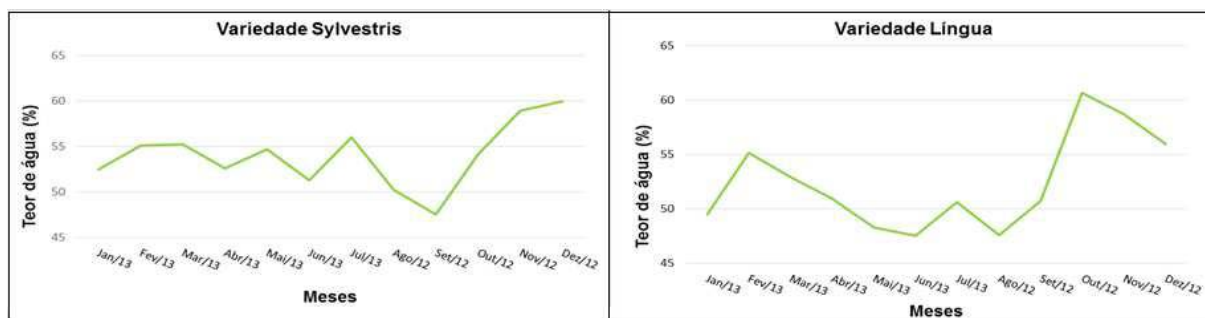
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DO TEOR DE ÁGUA E DOS DADOS DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA

Os resultados obtidos após tratamento dos dados de teor de umidade das folhas das duas variedades, no período de um ano, encontram-se no gráfico 1. Para a variedade Sylvestris nota-se uma constância no teor de água entre os meses de janeiro e junho; de julho a setembro ocorre uma queda de aproximadamente 10% e, de setembro a dezembro, um aumento de cerca de 15%. Já para a variedade Língua, de fevereiro a junho, tem-se uma queda no teor de umidade, seguido de um aumento discreto (aproximadamente 3%) de junho a julho. Novamente nota-se diminuição no teor de água de julho a agosto e, de agosto a novembro, o conteúdo de água tem um aumento mais acentuado (aproximadamente 15%) e, outra vez, uma queda entre os meses de novembro a janeiro.

A variedade Sylvestris apresenta um teor de água mais regular ao longo do ano em comparação com a variedade Língua, porém o máximo e mínimo observados não variam em alto grau entre as mesmas.

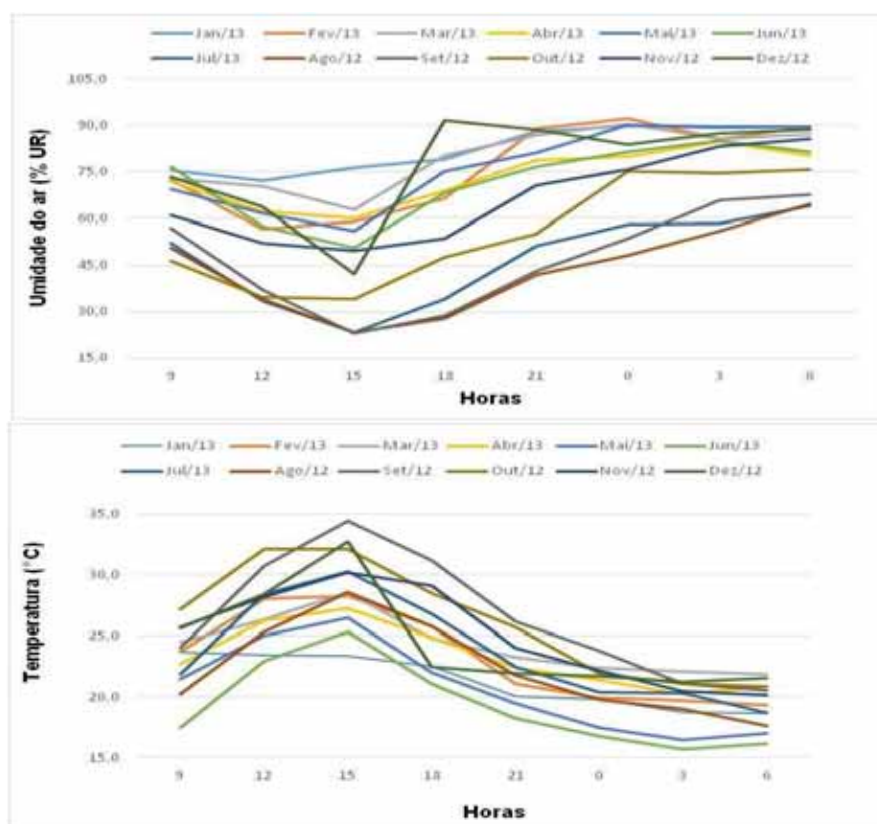
GRÁFICO 1. Teor de água nas folhas de *C. sylvestris*



Os dados de temperatura e umidade relativa do ar obtidos durante as 48h de coleta de cada mês foram reunidos em gráficos (GRAF. 2).

Analisando os dados compilados nos gráficos observa-se que a umidade do ar apresenta relação inversa à temperatura, conforme esperado. Comparando os resultados dessas análises com o teor de água nas folhas temos em dezembro um pico de umidade entre às 15h e 18h acompanhada de queda na temperatura e um teor de umidade elevado em ambas as variedades se comparado aos outros meses. Em setembro, o teor de água na variedade Sylvestris está por volta de 48% e encontra-se em queda em relação aos dois meses anteriores; já para a variedade Lingua, no mesmo mês, temos um ligeiro aumento no teor de água para 51% aproximadamente. No entanto, a diferença entre as plantas é pequena.

GRAFICO 2. Umidade do ar (acima) e temperatura (abaixo) no período de 24 horas.



5.2 VARIAÇÃO CIRCADIANA E SAZONAL DE FENÓLICOS E DITERPENOS

Os cromatogramas resultantes das análises em HPLC-DAD foram registrados em dois comprimentos de onda, 254 nm e 235 nm, a fim de monitorar os compostos fenólicos e os diterpenos, respectivamente. No preparo das amostras foi adicionado um padrão interno (galato de butila) para que possíveis problemas oriundos de variações na preparação das amostras e nas condições da análise fossem corrigidos. Com o resultado do tratamento realizado, conforme descrição no item 3.2.1.5, plotaram-se os gráficos discutidos a seguir.

Os resultados obtidos indicam que os compostos diterpênicos, representados pelas casearinas, na variedade *Sylvestris* estão com teor maior que os compostos fenólicos. Efeito inverso ocorre com a variedade *Língua*, onde os compostos fenólicos prevalecem sobre os diterpenos. Tais observações repetem-se ao longo dos meses do ano (FIG. 5). Adicionalmente, durante os dois dias amostrados em cada mês, não há, em geral, variações muito importantes no teor de fenólicos ou diterpenos, com os níveis observados no primeiro dia mostrando boa concordância com os níveis observados no segundo dia.

Ao longo de todo ano observam-se teores relativos de compostos diterpênicos bem próximos a zero para a variedade *Língua*. Avaliando a mesma variedade, porém agora se atentando aos compostos fenólicos, o resultado obtido foi que no mês de fevereiro, o teor dessas substâncias foi mais elevado tanto em relação aos outros meses quanto em relação aos horários do dia.

Para a variedade *Sylvestris* temos que os compostos diterpênicos apresentaram maior teor nos meses de fevereiro, março, agosto, setembro, outubro e dezembro, sendo que fevereiro foi o mês onde houve mais picos no teor ao longo do dia. Os compostos fenólicos para esta variedade exibiram teores muito reduzidos ao longo dos meses e ao longo do dia.

FIGURA 5. Análise circadiana da *C. sylvestris* (dia 1 e dia 2)

(continua)

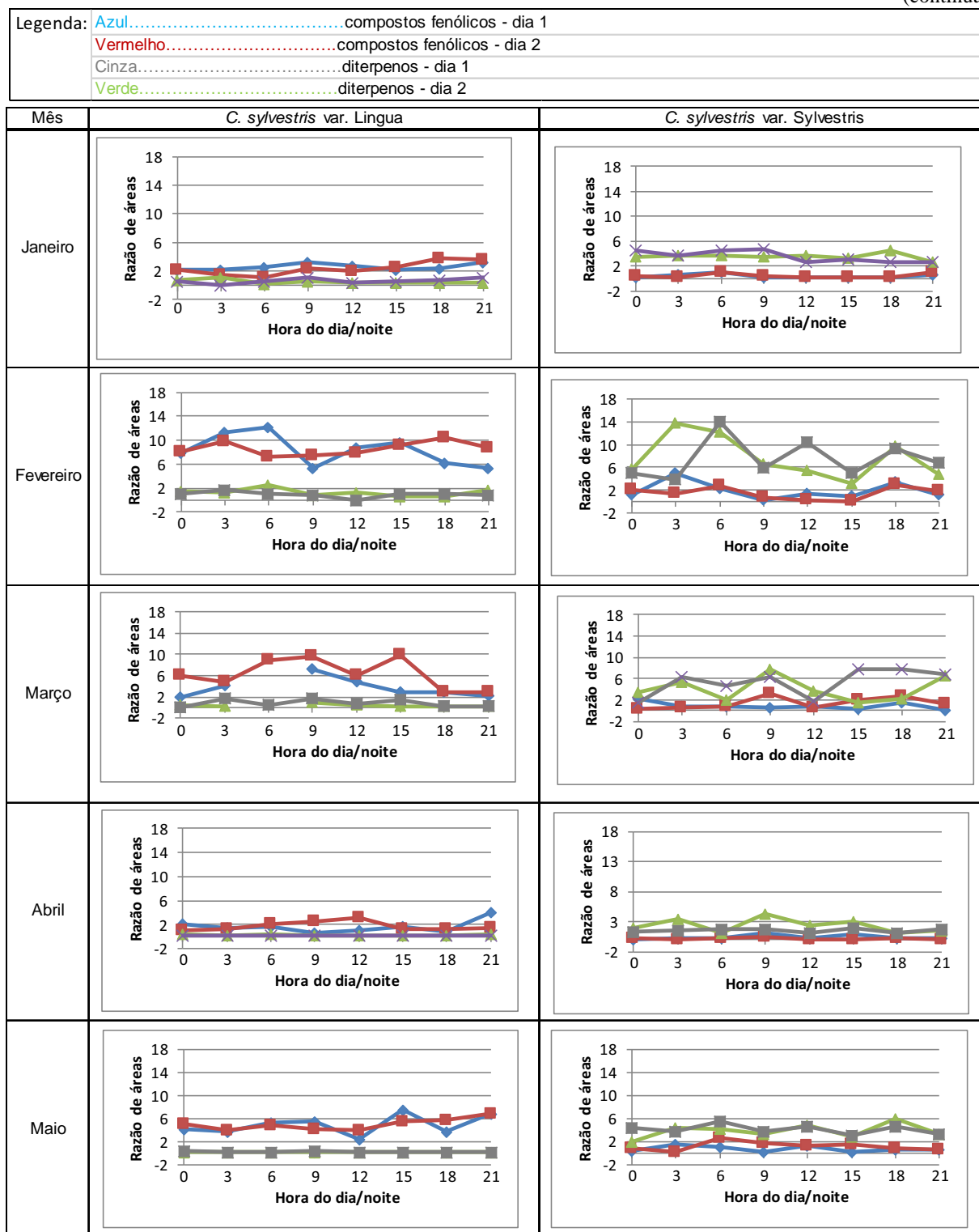


FIGURA 5. Análise circadiana da *C. sylvestris* (dia 1 e dia 2).

(continuação)

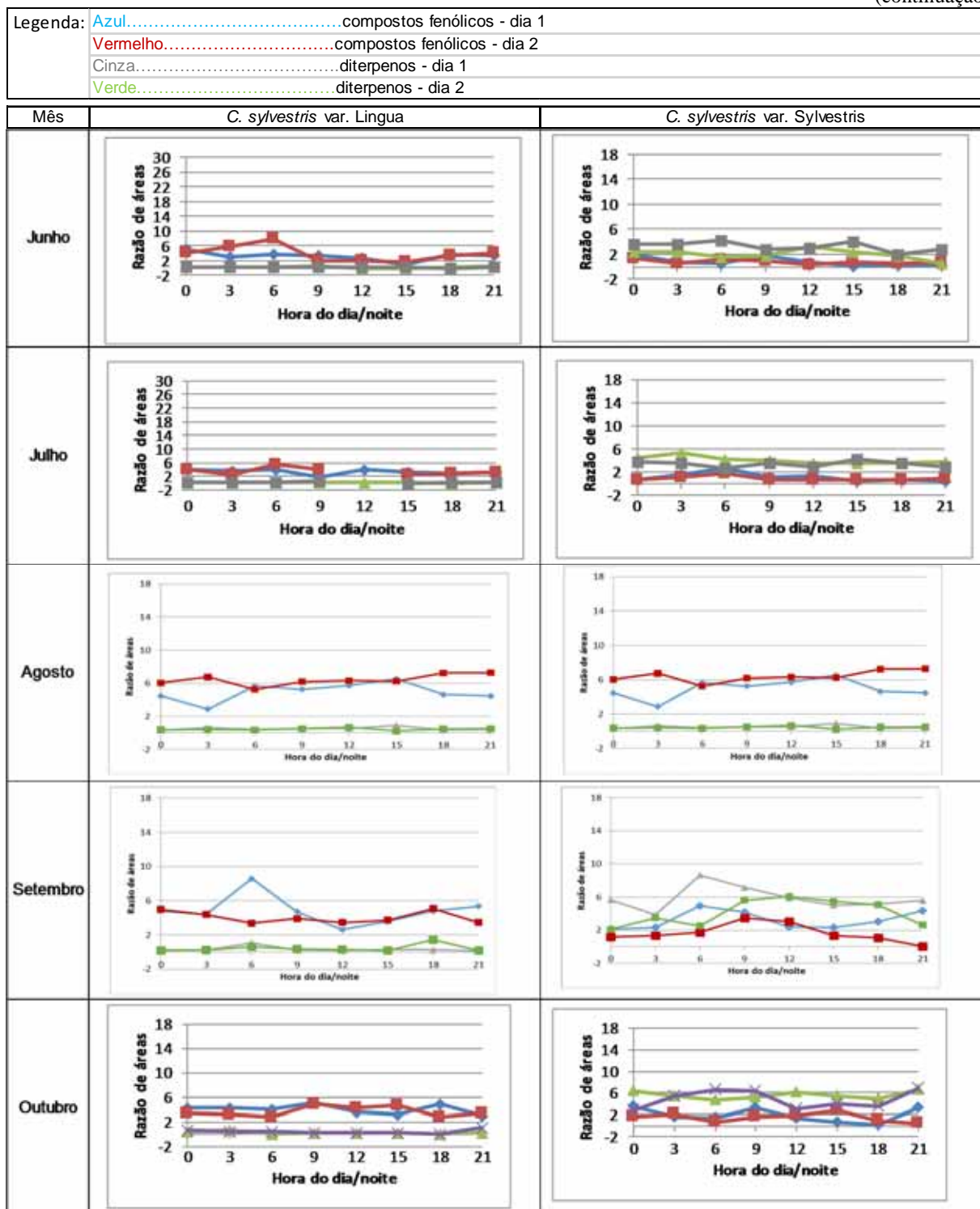
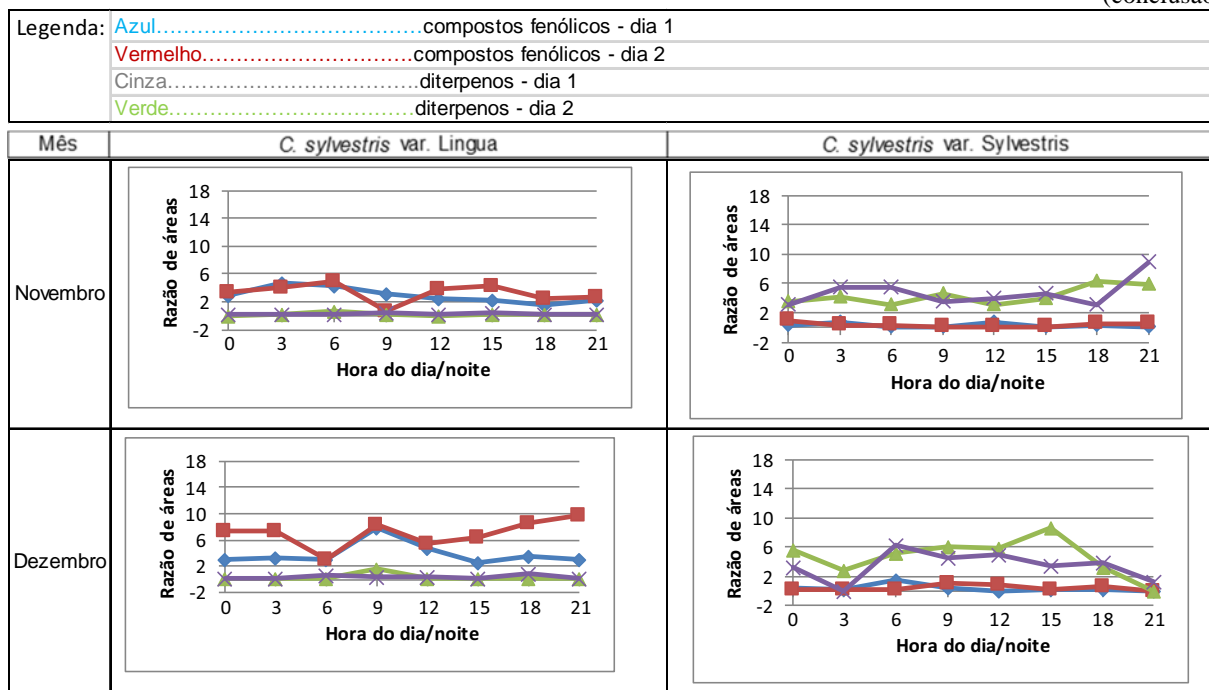


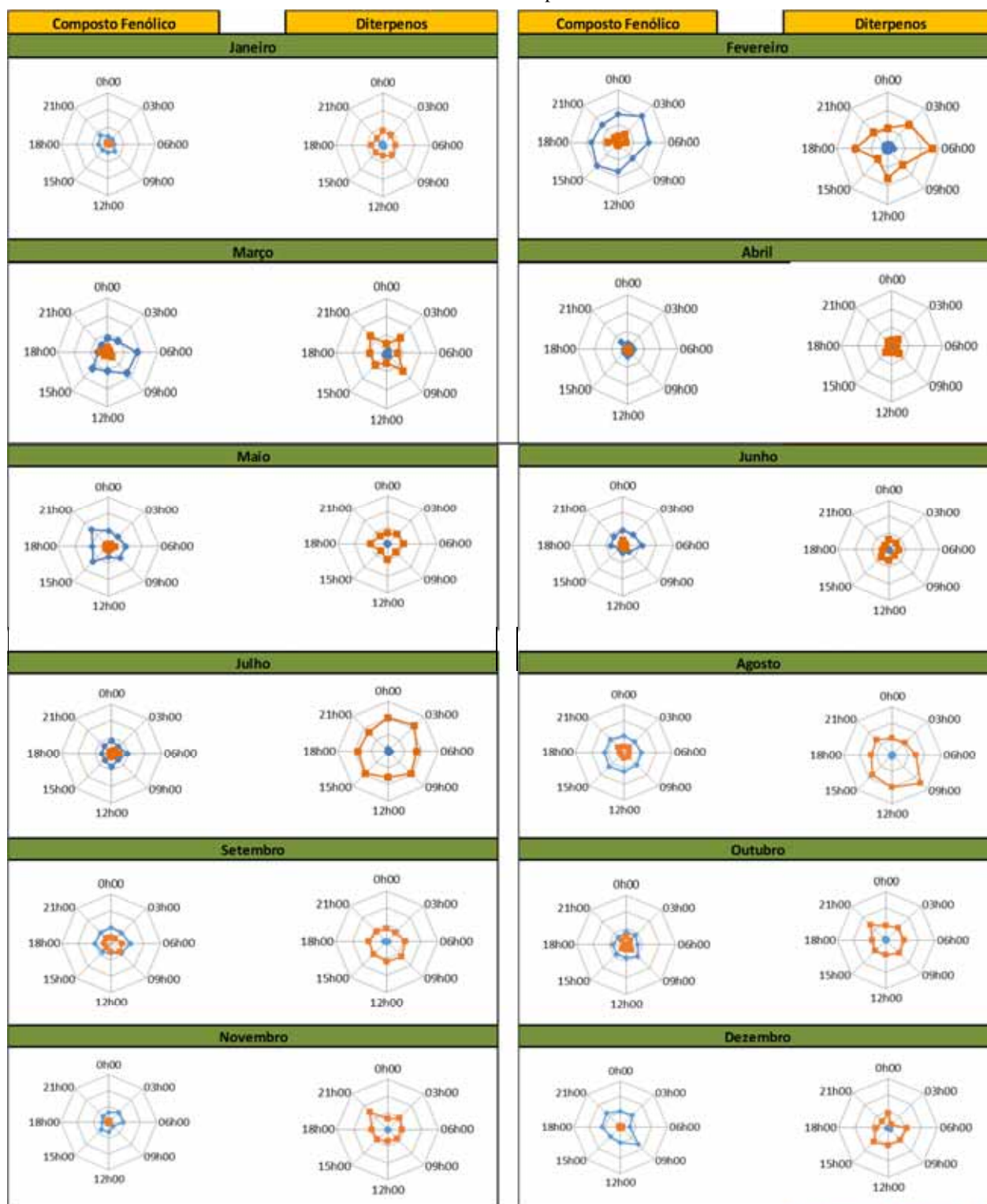
FIGURA 5. Análise circadiana da *C. sylvestris* (dia 1 e dia 2).

(conclusão)



Para facilitar a visualização de variações circadianas e sazonais nos teores de fenólicos e diterpenos, utilizou-se a média dos valores obtidos para cada classe de substância em cada horário amostrado, para a elaboração dos gráficos do tipo “radar” (FIG. 6). Observa-se que na variedade *Lingua* os teores de fenólicos são relativamente constantes durante o período circadiano, mas que esses teores aumentam significativamente nos meses de fevereiro, março, maio, agosto e dezembro, já os teores de diterpenos se mantiveram mínimos durante todo o ano. Em relação à variedade *Sylvestris*, teores baixos de fenólicos foram observados durante todo o ano, com pequeno aumento nos meses de agosto a outubro. No entanto, os diterpenos apresentaram variação sazonal marcante, com teores destacadamente maiores nos meses fevereiro e de agosto a dezembro, mas sem tendência claramente definida de oscilação durante o período circadiano. Houve aumento intermediário nos meses de janeiro, março e maio.

FIGURA 6. Variação circadiana de fenólicos totais e diterpenos totais a cada mês. Cada ponto indica a média de 2 dias em um horário específico



C. sylvestris var. *Sylvestris*
C. sylvestris var. *Lingua*

Os gráficos de box plot facilitam a visualização da variação sazonal dos compostos estudados para as duas variedades de *C. sylvestris*.

GRÁFICO 3. Variação sazonal de fenólicos totais nas variedades de *C. sylvestris*. Cada caixa contém os valores observados nos dois dias de amostragem de cada mês.

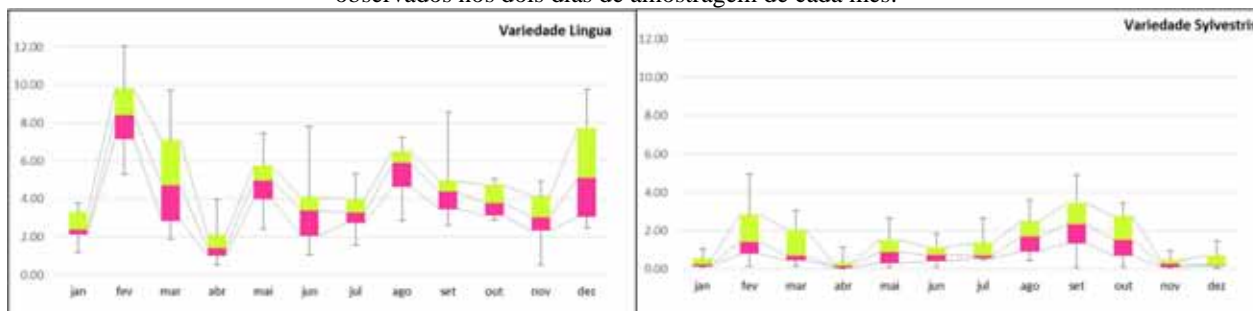
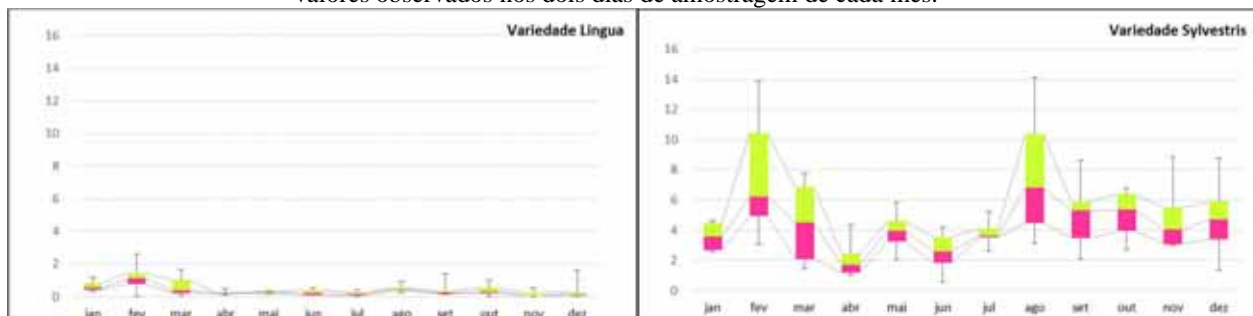
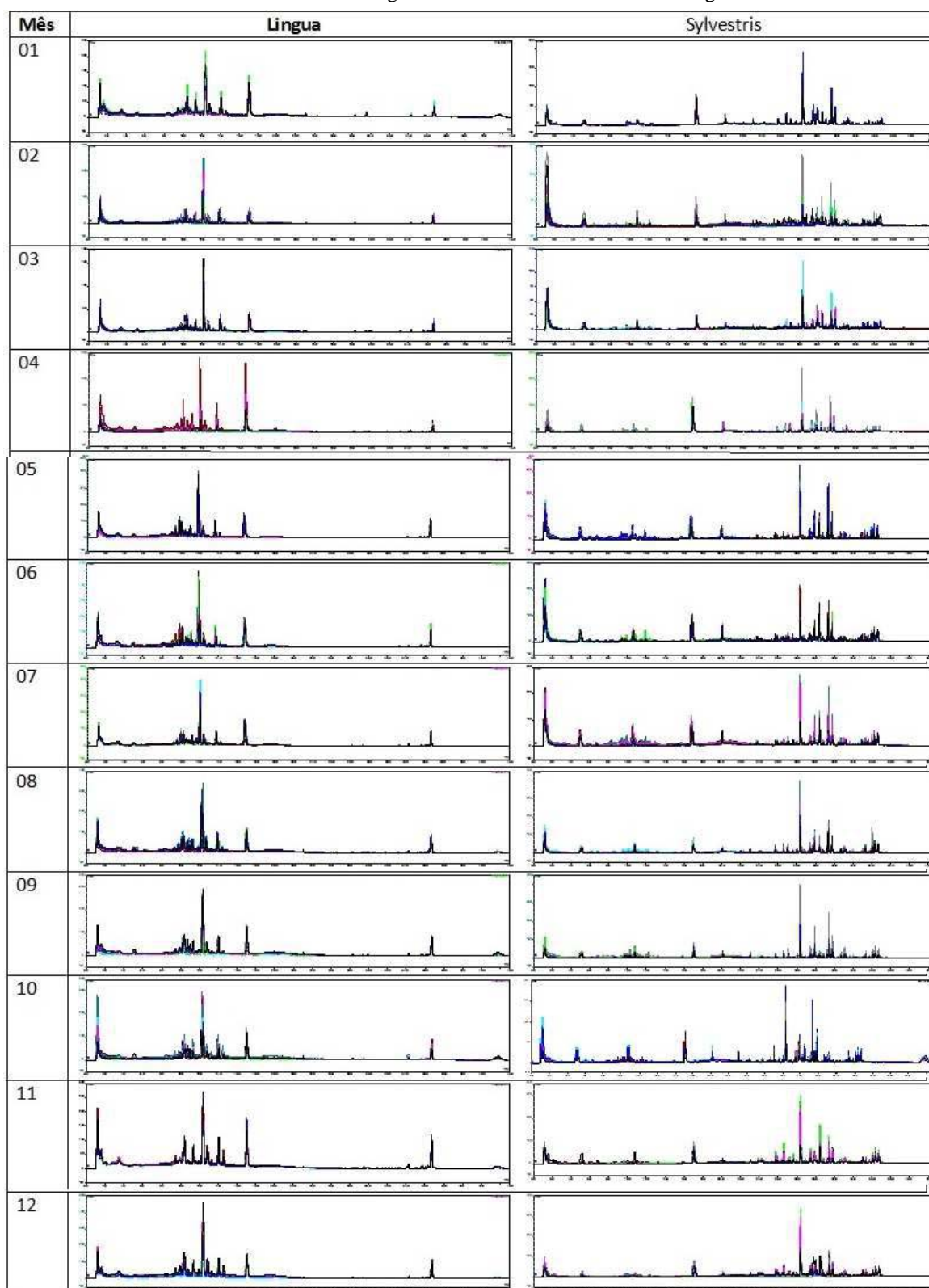


GRÁFICO 4. Análise Variação sazonal de diterpenos totais nas variedades de *C. sylvestris*. Cada caixa contém os valores observados nos dois dias de amostragem de cada mês.



A figura 7 contém todos cromatogramas de cada mês sobrepostos, registrados em 235 nm para a variedade Sylvestris e 254 nm para a variedade Lingua, com o objetivo de ilustrar o perfil cromatográfico ao longo de um ano. Nota-se que a distribuição dos metabólitos secundários difere significativamente entre as variedades e confirma a predominância de compostos fenólicos na variedade Lingua e de compostos diterpênicos na variedade Sylvestris.

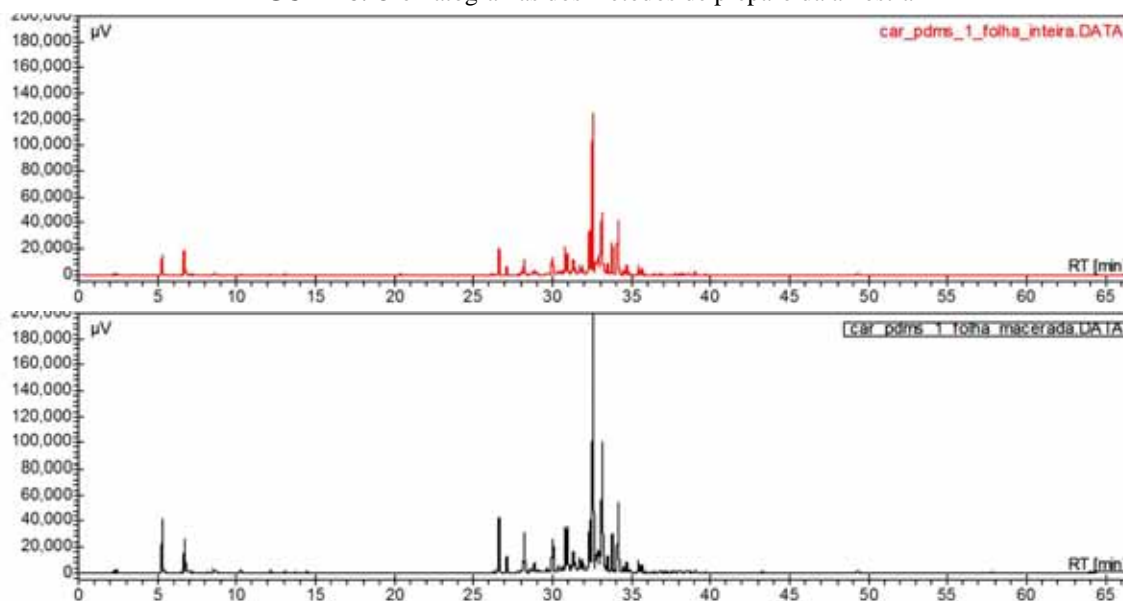
FIGURA 7. Perfil cromatográfico de ambas as variedades ao longo de um ano.



5.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DAS VARIEDADES ESTUDADAS

Notou-se, a partir dos cromatogramas da figura 8 que não houve diferença quantitativa significativa entre as maneiras de preparo das amostras, apenas na intensidade dos mesmos. Assim, definiu-se que para todas as análises, a extração seria feita com as folhas inteiras devido a facilidade de preparo e também para evitar possíveis perdas de massa que poderiam ocorrer na transferência da amostra triturada para o frasco de extração.

FIGURA 8. Cromatogramas dos métodos de preparo da amostra



Para definir a fibra a ser utilizada para a microextração em fase sólida nas amostras, testou-se seis tipos de fibras, com diferentes polaridades, as quais foram descritas no item 3.1. Para esta etapa, o procedimento seguido foi realizar a extração e análise definidos (item 3.2.2.1). O fator de escolha para a fibra a ser utilizada ao longo de todos os experimentos foi sua capacidade

extratora, tanto para compostos polares quanto apolares, a qual é evidenciada, respectivamente, pela quantidade de picos observados e pela distribuição destes nos cromatogramas. De acordo com as figuras 9 e 10, nota-se que as fibras que apresentaram maior número de picos foram as car/pdms 75 μm e car/pdms 85 μm , sendo a diferença entre elas apenas o fato da fibra com espessura de revestimento maior ser flexível e, portanto, mais resistente à quebras ou torções, já a fibra com 75 μm não apresenta flexibilidade. Entretanto, a maior espessura de revestimento proporciona maior quantidade de adsorvente e conseqüentemente, maior capacidade de adsorção mas, em contrapartida, requer maior tempo de extração em relação à outra fibra, uma vez que o tempo para saturar a fibra, isto é, atingir o equilíbrio, é maior. Ambas as fibras apresentaram capacidade extratora semelhante, variando apenas a capacidade de extração de cada composto. Assim a selecionada foi a fibra car/pdms 85 μm para utilização nos experimentos de dinâmica metabólica, dado que compostos presentes em menor quantidade na planta podem não ser detectados na fibra car/pdms 75 μm .

FIGURA 9. Cromatogramas dos testes feitos com as fibras para HS-SPME

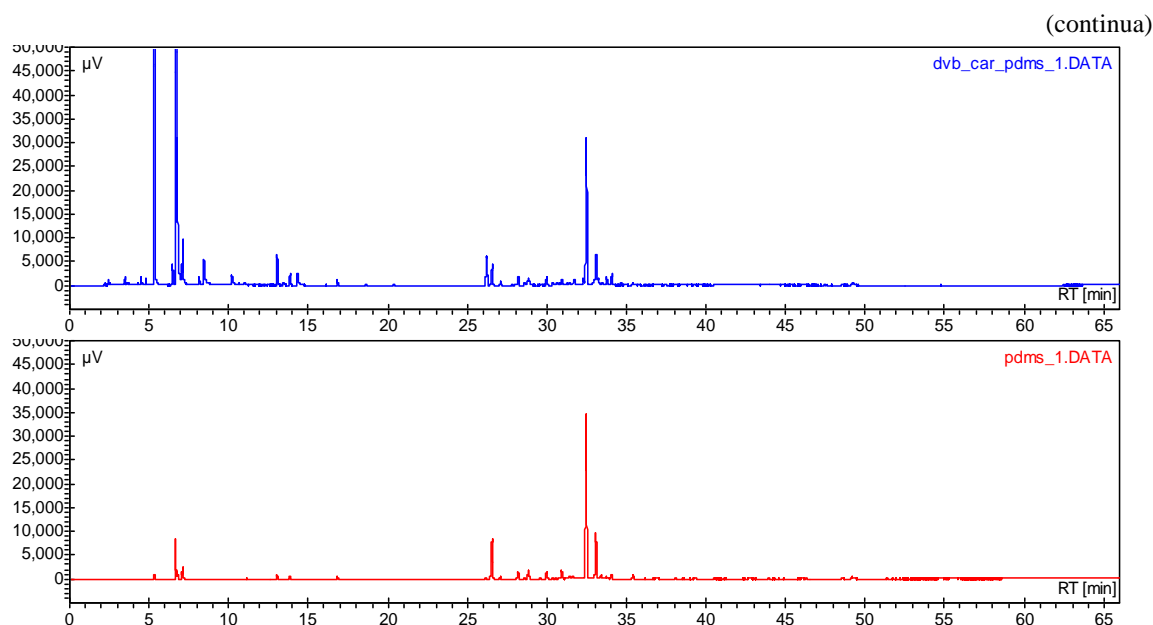


FIGURA 9. Cromatogramas dos testes feitos com as fibras para HS-SPME (conclusão)

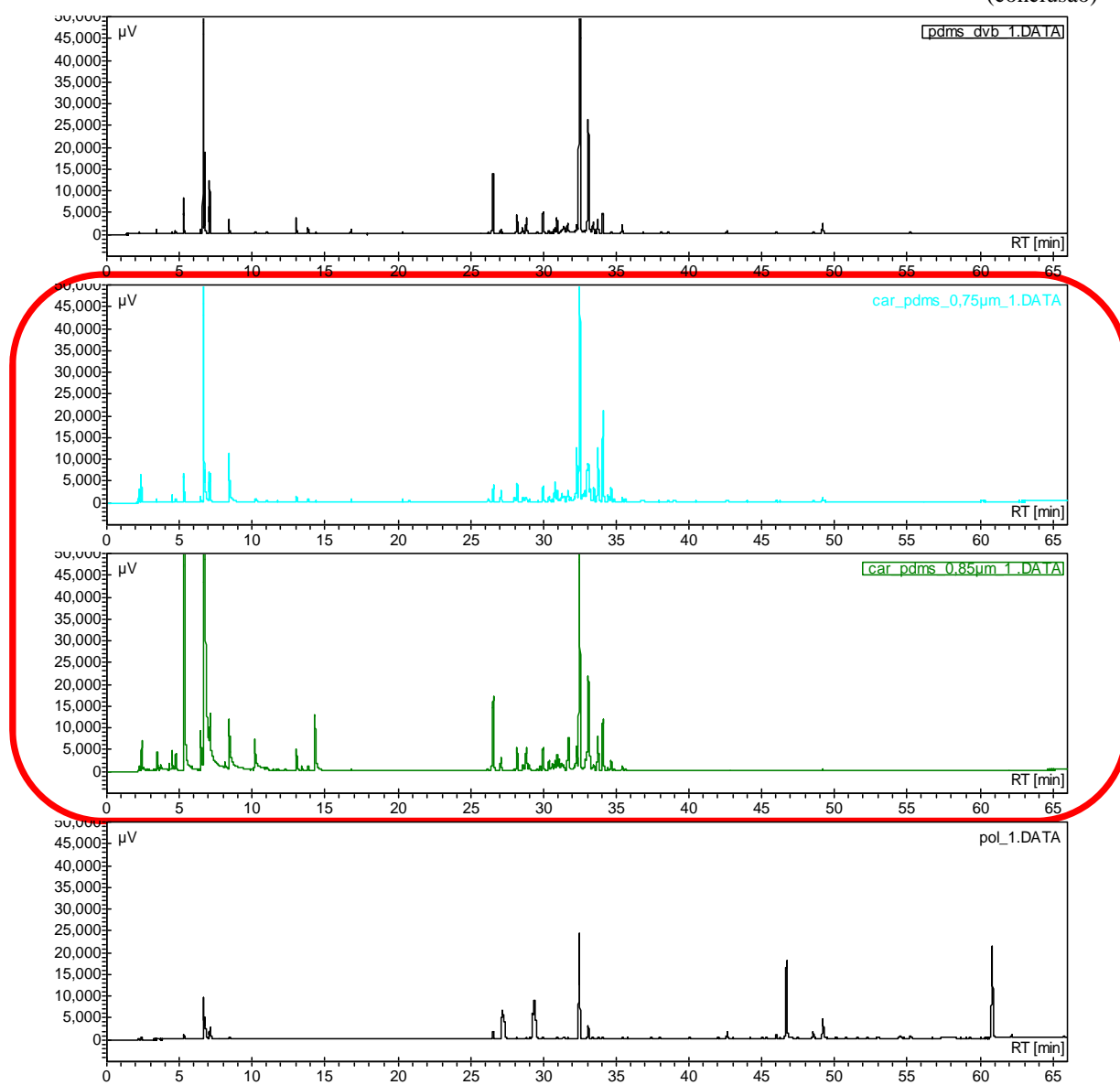
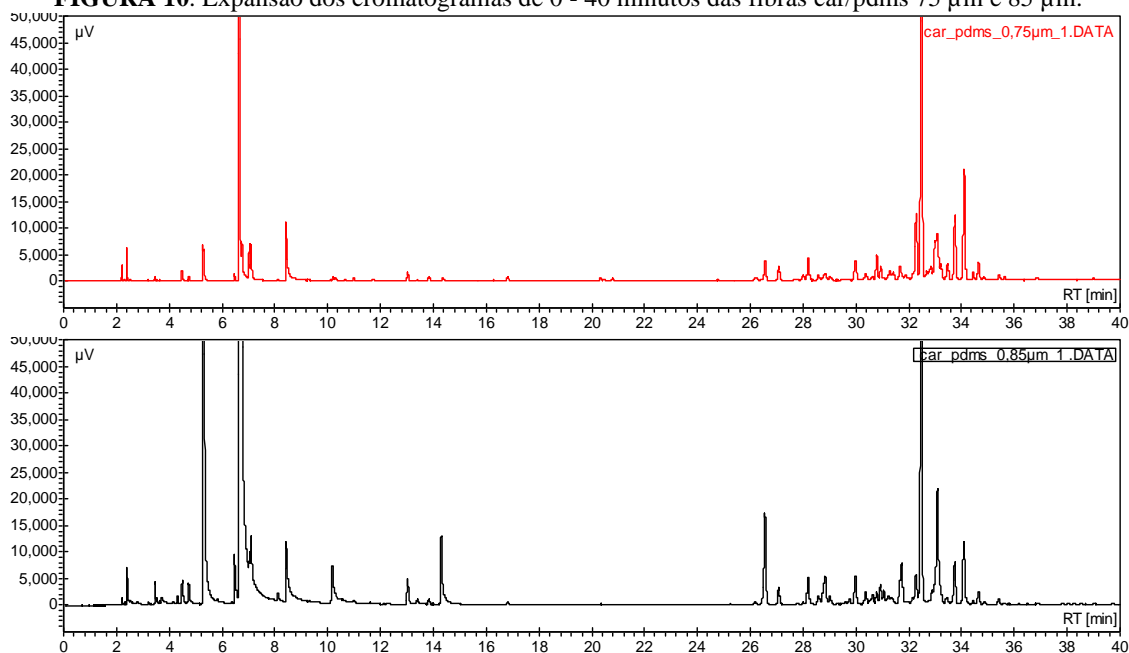


FIGURA 10. Expansão dos cromatogramas de 0 - 40 minutos das fibras car/pdms 75 μm e 85 μm .



Para a análise dos compostos voláteis de folhas das variedades Língua e Sylvestris, por cromatografia gasosa, fez-se um teste inicial com duas amostras de cada variedade, obtidas no mesmo horário, em dias consecutivos. O mês em que a amostra foi obtida foi escolhido ao acaso. Esse teste foi feito para verificar a ocorrência de diferenças no perfil de voláteis em dias consecutivos de coleta. O mês analisado foi julho de 2013 e o horário de coleta 09 horas. Os cromatogramas apresentaram perfis muito semelhantes para ambas as variedades (FIGs. 11 e 12).

FIGURA 11. Cromatogramas dos voláteis de folhas de *C. sylvestris* variedade Língua, obtidos para dias 1 e 2, em julho, às 9 horas.

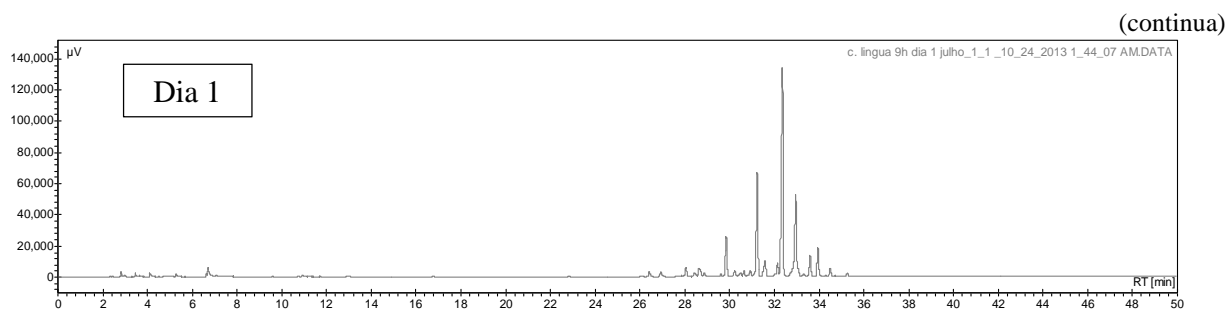


FIGURA 11. Cromatogramas dos voláteis de folhas de *C. sylvestris* variedade Lingua, obtidos para dias 1 e 2, em julho, às 9 horas.

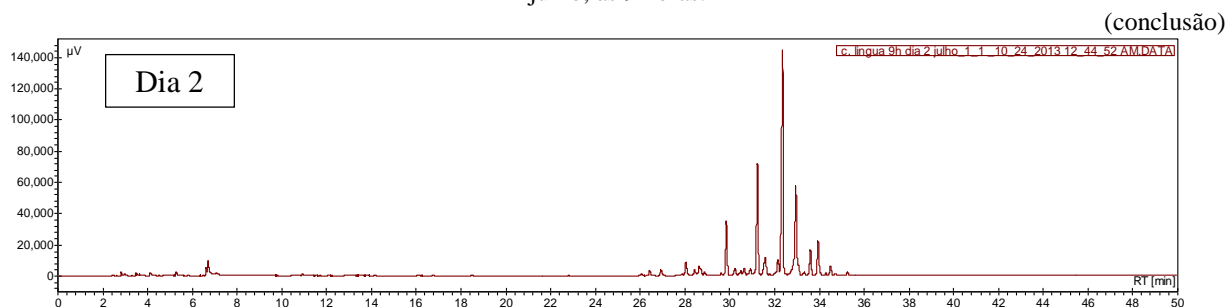
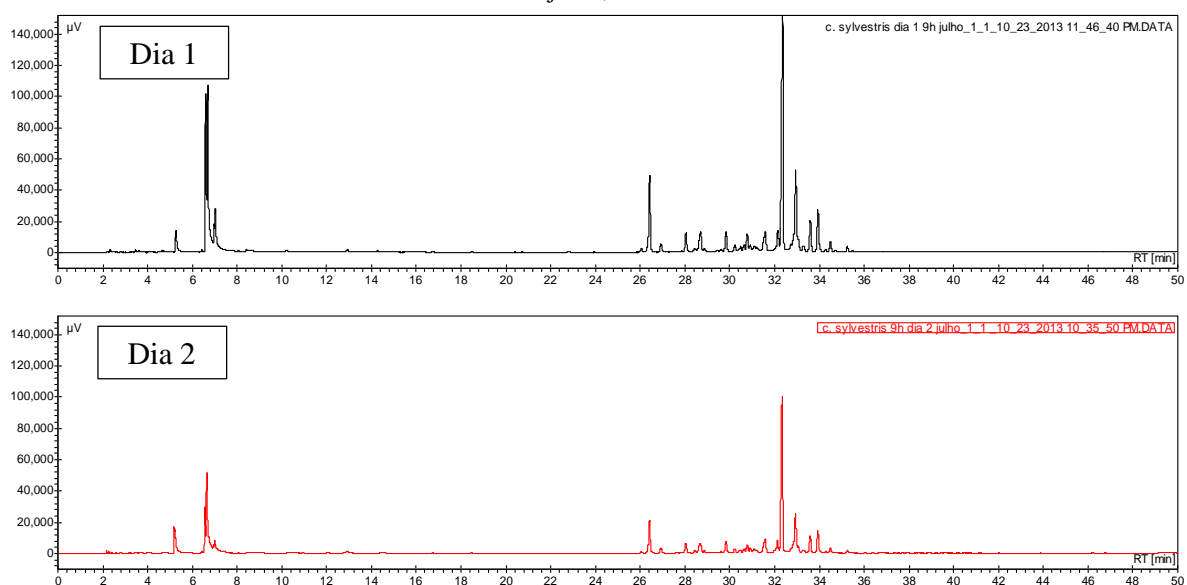


FIGURA 12. Cromatogramas dos voláteis de folhas de *C. sylvestris* variedade Sylvestris, obtidos para dias 1 e 2, em julho, às 9 horas.



Dessa forma, optou-se por iniciar as análises com amostras obtidas apenas no primeiro dia de coleta, nos horários de 09 horas, 15 horas, 21 horas e 03 horas, sendo os meses de floração (maio, junho e julho) escolhidos como ponto de partida para tais análises. Esta estratégia foi adotada para minimizar o tempo de equipamento necessário para se obter um panorama anual de eventuais variações na composição de constituintes voláteis de folhas.

A proposta de identificação dos constituintes voláteis foi obtida após análise de amostras representativas por GC-MS, seguida comparação dos espectros de massas obtidos com espectros

das bibliotecas *Nist* e *Wiley*, através do software *GCMS solutions*. A identificação dos compostos voláteis foi reforçada com a comparação dos índices de retenção lineares (RI), calculados (fórmula 6) para os constituintes voláteis das amostras de *C. sylvestris*, com os encontrados na literatura (Tabela 12). Para a comparação dos índices de retenção, utilizou-se uma faixa de ± 5 unidades em relação aos valores encontrados na literatura, assim para um mesmo IR calculado um ou mais compostos foram sugeridos.

$$IR \text{ calculado} = 100n + 100 \times \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} \right) \quad (6)$$

Onde,

n = número de carbonos do n-alcano com o tempo de retenção anterior ao metabólito de interesse;

tr_x = tempo de retenção do metabólito de interesse;

(t_{Rz}) = imediatamente anterior ao padrão;

t_{Rz+1} = tempo de retenção do n-alcano localizado imediatamente após o padrão avaliado.

TABELA 12. Índices de retenção encontrados na literatura e índices de retenção calculados para as substâncias identificadas no espectro de massas.

Substância	RI lit.	RI cal.	Substância	RI lit.	RI cal.
2-trans-Hexenal	854	858	Murolo-4(14),5-dieno <cis->	1462	1460
3-Hexen-1-ol	856	858	Cadina-1(6),4-dieno	1463	1460
2-Hexenal	850	858	Muroleno	1496	1500
Heptan-2-ol	900	905	Germacreno d	1497	1501
α-Copaeno	1377	1379	Viridifloreno	1495	1493
β-Bourboneno	1384	1379	Bicidlogemacreno	1493	1492
β-Cubebeno	1390	1390	α-Muroleno	1499	1502
β-Elementeno	1391	1391	β-Cadineno	1523	1520
β-Cariofileno	1420	1417	Cadina-1,4-dieno	1526	1522
Calareno	1432	1433	Cadala-1(10),3,8-trieno	1562	1561
α-Humuleno	1456	1460	Germacreno B	1558	1561
Aloaromadendreno	1459	1460			

RI lit. - índice de retenção (literatura)

RI cal. - índice de retenção calculado

Através das análises observa-se algumas diferenças importantes entre a composição de compostos voláteis emitidos pelas folhas de cada variedade. É nítida a ocorrência de teores maiores de *trans* 2-hexenal, 3-hexen-1-ol, (E) 2-hexen-1-ol, heptan-2-ol, α -copaeno e β -bourboneno na variedade Sylvestris quando comparada à variedade Lingua. Em relação aos sesquiterpenos, principalmente aqueles majoritários, eluídos entre 24 e 34 minutos, observa-se grande semelhança na composição, mas a variedade Lingua apresenta teores maiores de sesquiterpenos em relação à variedade Sylvestris (FIGS 13 e 14).

FIGURA 13. Cromatogramas representativos da variedade Lingua.

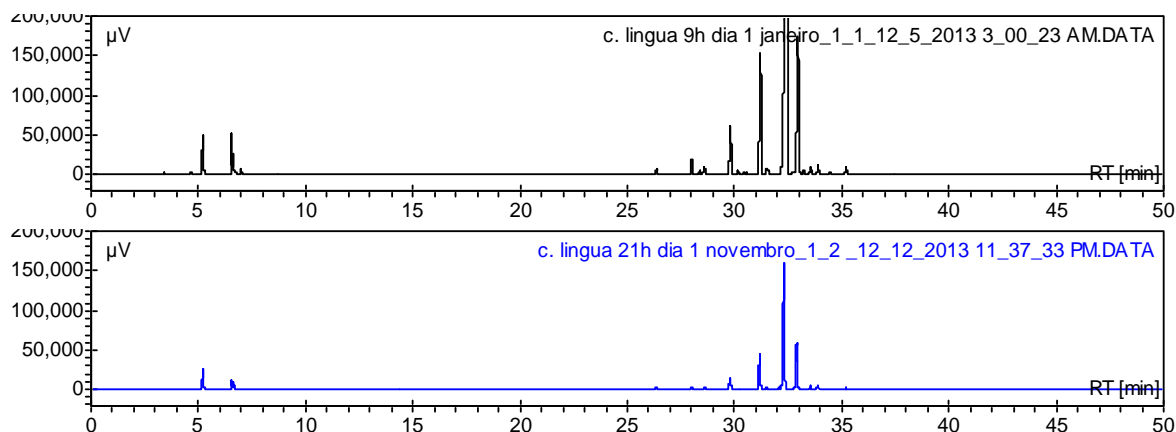
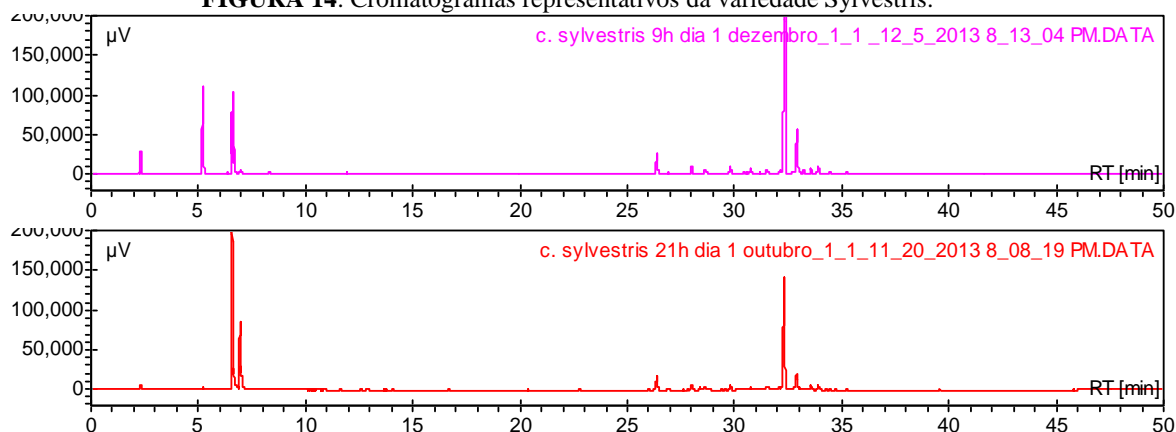


FIGURA 14. Cromatogramas representativos da variedade Sylvestris.



Para a variedade *Lingua* notou-se que os picos mais intensos apresentaram-se entre 30 e 35 minutos nos cromatogramas, nesse intervalo foi possível propor a identificação das substâncias: biciclogermacreno, viridifloreno, muroleno, germacreno d, beta-cadineno, cadina-1,4-dieno, cadala-1(10),3,8-trieno e germacreno b. A análise dos cromatogramas da variedade *Sylvestris* revelou que, além dos compostos encontrados na variedade *Lingua*, houve também picos intensos na região de 4 a 7 minutos nos cromatogramas, os quais foram identificados como 3-hexen-1-ol, 2-hexen-1-ol(E) e 2-trans-hexenal.

Na figura 15 há uma relação de sesquiterpenos e outros compostos que foram identificados segundo a proposta apresentada.

FIGURA 15. Sesquiterpenos e outros compostos identificados.

Sesquiterpenos		Outros Compostos
α -copaeno	murola-4(14),5-dieno	2-trans-hexenal
β -elemeno	muroleno	3-hexen-1-ol
β -cariofileno	α -muroleno	2-hexenal
α -humuleno	germacreno d	heptan-2-ol
aloaromadendreno	germacreno b	
β -cubebeno	bicilogermacreno	
β -cadineno	viridifloreno	
cadina-1(6),4-dieno	cadala-1(10),3,8-trieno	
β -bourboneno	calareno	
cadina-1,4-dieno		

O Apêndice A contém uma relação de tabelas com os resultados da proposta de identificação feita para todas as amostras analisadas, sendo possível verificar o tempo de retenção, o índice de retenção calculado e a área dos picos.

No apêndice B encontram-se os gráficos de variação nos teores de cada substância identificada.

5.4 ESTUDOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

A partir dos resultados obtidos na análise sazonal e circadiana, foram selecionadas as amostras obtidas nos meses de fevereiro e abril para os experimentos de análise diferencial de SDH e GGPP sintases, uma vez que entre meses foram observadas as diferenças mais marcantes nos teores de fenólicos e diterpenos – para fevereiro verificam-se os maiores teores para fenólicos e diterpenos, nas duas variedades, enquanto os menores teores, também para fenólicos e diterpenos, foram observados no mês de abril.

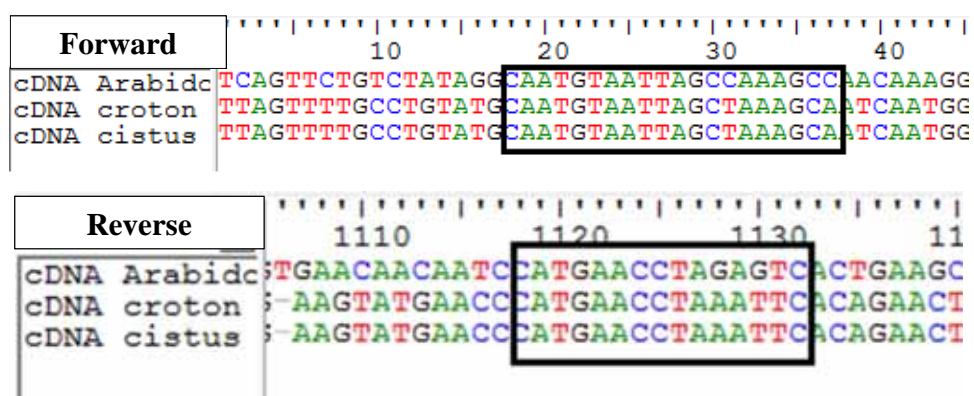
5.4.1 Desenhos do primer GGPP

Utilizando as bases de dados GeneBank, a partir da ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), buscou-se sequências para o gene da enzima geranylgeranyl pirofosfato sintase. Dentre os resultados obtidos selecionou-se as sequências de nucleotídeos de *Ricinus communis* (RCOM_0013160/ ID 8268116) por pertencer ao mesmo reino (Plantae), mesma divisão (Magnoliophyta), mesma classe (Magnoliopsida) e mesma ordem (Malpighiales) que a *Casearia sylvestris*. A sequência da região genômica, em formato FASTA (NCBI Reference Sequence: NW_002994764.1), foi obtida e utilizada para a montagem dos *primers* GGPP (região codificante, *coding sequence* ou CDS).

A sequência nucleotídica foi analisada via blastx, a qual realiza uma busca em um banco de dados de proteínas a partir da de nucleotídeos traduzida para as 6 possíveis fases abertas de leitura. Dentre os resultados encontrados, selecionou-se as sequências de cDNA da *Arabidopsis thaliana* (AAM 65107.1), do *Croton sublyratus* (BAA86284.1), do *Cistus creticus* (AAM21639.1) e *Solanum pennelli* (ADZ24718.1). Essas plantas foram escolhidas por apresentarem o mesmo

reino, mesma divisão e mesma classe da *C. sylvestris*. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o software Bio Edit Sequence Alignment Editor ® (HALL, 1999). No alinhamento observou-se maior similaridade entre as sequências de *Arabidopsis thaliana*, o *Croton sublyratus* e o *Cistus creticus*, optando-se por excluir a sequência de cDNA do *Solanum pennelli*. O próximo passo consistiu em escolher as regiões mais conservadas dentre as plantas selecionadas para desenho dos *primers forward* e *reverse*, porém como a sequência consenso não apresenta 100% de similaridade, os *primers* apresentam degenerações para contemplar tais diferenças. Após desenho dos *primers*, esses foram transferidos para o programa GeneRunner para verificação da temperatura de anelamento (T_m), %CG, formação de emparelhamento de pares de base intramoleculares (*Hairpin loops*), de dímeros e *loops* internos. A figura 16 mostra a região utilizada para desenho dos *primers* GGPP.

FIGURA 16. Alinhamento e região dos *primers* GGPP.

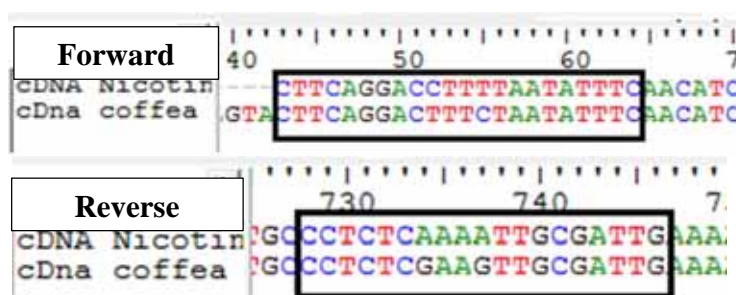


5.4.2 Desenhos do primer SDH

Na base de dados do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), buscou-se sequências para o gene da enzima chiquimato desidrogenase (SDH). Dentre os resultados obtidos selecionou-se

novamente o *Ricinus communis* (RCOM_2109380/ ID 82662180). A sequência da região genômica, em formato FASTA (NCBI Reference Sequence: NW_002994764.1), foi acessada e, em *Display settings*, escolheu-se a opção *GenBank (full)*. Entretanto apareceram sequências apenas de micro-organismos, então digitou-se o nome da enzima e fez-se uma busca por *Expressed Sequence Tag* (EST). As sequências de mRNA que foram escolhidas pertencem às plantas *Glycine soja* (BF598705.1), *Coffea arábica* (GW490866.1), *Nicotiana tabacum* (GR994208.1), as quais foram analisadas por pertencerem ao mesmo reino, mesma divisão e mesma classe que a *C. sylvestris*. Em seguida, as sequências complementares, ou seja, os cDNAs foram obtidos com o auxílio do programa GeneRunner. Posteriormente, fez-se o alinhamento no *software Bio Edit Sequence Alignment Editor*® (HALL, 1999). Houve maior semelhança entre os cDNAs da *Nicotiana tabacum* e da *Coffea arábica*. Os *primers forward* e *reverse* foram desenhados a partir das regiões conservadas no início e final das sequências selecionadas, respectivamente, e analisados no GeneRunner para verificação dos mesmos parâmetros descritos no item anterior. O *primer* final amplificará um fragmento de 679 pb, sendo o tamanho do *forward* de 22 bases (da posição 43 a 64 no BioEdit) e do *reverse* de 19 bases (da posição 728 a 746). A figura 17 mostra a região utilizada para desenho dos *primers* SDH.

FIGURA 17. Alinhamento e região dos *primers* SDH.



5.4.3 Quantificação do DNA

A extração do DNA foi feita de folhas provenientes da coleta das 6h do mês de fevereiro/2013 e das 9h do mês de abril/2013 pois, de acordo com os resultados obtidos na análise circadiana e sazonal concluída, notou-se que os teores dos compostos fenólicos e diterpênicos foram maiores no mês de fevereiro e menores no mês de abril, para ambas as variedades estudadas.

Os resultados obtidos na quantificação estão contidos na tabela 13. Os volumes de água encontrados na tabela referem-se à quantidade de água a ser adicionada para se obter uma concentração de 10 ng/μL de DNA extraído.

TABELA 13. Quantificação do DNA extraído.

	ng/μL	260/280	H ₂ O (μL)
<i>C. sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> (fevereiro)	372,19	2,03	362
<i>C. sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> (abril)	307,03	1,92	297
<i>C. sylvestris</i> var. <i>língua</i> (fevereiro)	248,89	2,02	239
<i>C. sylvestris</i> var. <i>língua</i> (abril)	258,03	2,03	248

5.4.4 Resultados das Reações em cadeia da polimerase (PCR)

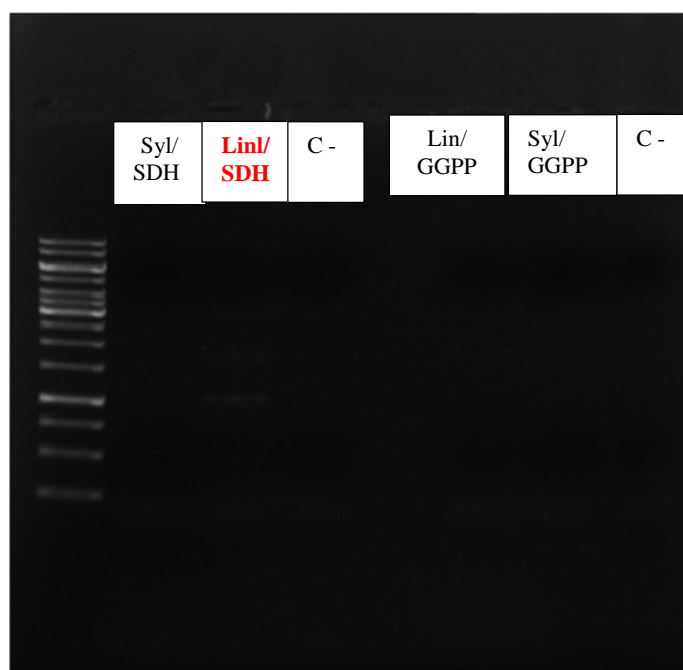
Diversos testes foram feitos para conseguir a amplificação do DNA referentes aos genes das enzimas GGPP sintase e SDH. Até o momento foram realizadas reações de PCRs alterando a enzima utilizada, a concentração do DNA, temperatura de anelamento e quantidade de *primer* adicionada.

A PCR realizada com a enzima Platinum® Taq Polimerase e par de *primers* controle, cedido pela aluna de mestrado Lais Simões Sampaio, confirmou que o DNA extraído encontrava-se íntegro e, portanto, pronto para ser utilizado nas análises.

Ao se verificar os resultados das eletroforeses para as outras PCR feitas, não foi verificada nenhuma banda demonstrando que não houve amplificação do DNA nas tentativas feitas com as enzimas Pfu e AmpliTaq. A tentativa de alterar a concentração do DNA utilizada também não demonstrou resultado positivo.

Entretanto, quando foi feito o teste com a enzima *Phusion* utilizando 48 °C como temperatura de anelamento verificou-se a presença de algumas bandas no gel de agarose para o gene da enzima SDH da variedade Língua (Figura 18).

FIGURA 18. Fotocópia do resultado da amplificação utilizando enzima *Phusion* e 48 °C como temperatura de anelamento.



Syl = *C. sylvestris* variedade Sylvestris; Lin = *C. sylvestris* variedade Língua; C - = controle negativo

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise circadiana e sazonal evidenciaram uma maior incidência de compostos fenólicos na variedade *Lingua* e de diterpenos na variedade *Sylvestris*. A partir desses dados, foram selecionadas as amostras para serem analisadas no estudo de expressão gênica dos genes SDH e GGPP sintases, uma vez que entre meses foram observadas as diferenças mais marcantes nos teores de fenólicos e diterpenos, ou seja, para fevereiro verificam-se os maiores teores para fenólicos e diterpenos, nas duas variedades, enquanto os menores teores, também para fenólicos e diterpenos, foram observados no mês de abril.

A análise por cromatografia gasosa dos compostos voláteis, emitidos pelas folhas, indicaram que a variedade *Lingua* contém maior teor de compostos sesquiterpenos e a variedade *Sylvestris* apresenta, além dos sesquiterpenos, teores importantes de 2-trans-hexenal, 3-hexen-1-ol, 2-hexen-1-ol(E), heptan-2-ol, alfa-Copaeno e beta-Bourboneno. Além disso, os compostos cadin-4-em-10-ol e alfa-cadinol foram identificados somente a partir do meio do ano, apresentando teores mais elevados para a variedade *Lingua*.

As tentativas feitas para amplificação do DNA referentes aos genes das enzimas GGPP sintase e SDH não apresentaram resultados satisfatórios, verificando-se a presença de bandas indicando possível amplificação do gene referente à enzima SDH das folhas de *C. sylvestris* variedade *Lingua*. Este resultado indica que é necessário um estudo mais minucioso para encontrar as condições ideais de amplificação do DNA das folhas de *Casearia sylvestris*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALI, M.A., GYULAI, G., HIDVÉGI, N., KERTI, B., AL HEMAID, F.M.A., PANDEY, A.K., LEE, J. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. **Saudi Journal of Biological Sciences**. p. 1-28, 2014.

ANGIOSPERMAS WEBSITE FILOGENIA. Disponível em: <
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 05/05/2014.

BARAK, S., TOBIN, E.M., ANDRONIS, C., SUGANO S. E GREEN, R.M. All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. **Trends in plant science**. Elsevier Science. v. 5, n. 12, p. 517-522, 2000.

BHARGAVA, M. e SHARMA, A. DNA barcoding in pants: Evolution and applications of *in silico* approaches and resources. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 67, p. 631-641, 2013.

CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. **PNAS**. v. 106, n. 31, p. 12794-12797, 2009.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

CAVALLARI, M. M. **Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (SALICACEAE) no Estado de São Paulo**. 2008. 103f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008.

CAVALLARI, M. M.; GIMENES, M. A.; BILLOT, C.; TORRES, R. B.; CAVALHEIRO, A. J. BOUVET, J. M. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. **Annals of Botany**, v. 106, p. 627–636, 2010.

CERMAKIAN, N. e SASSONE-CORSI, P. Multilevel regulation of the circadian clock. **Nature reviews | Molecular cell biology**. v. 1, p 59-67, 2000.

CHASE, M. W., & REVEAL, J. L. A phylogenetic classification of land plants to accompany APG III. **Bot. J. Linnean Soc.** 161, p. 122-127, 2009.

DODD, A.N., SALATHIA, N., HALL, A., KÉVEI, E., TÓTH, R., NAGY, F., HIBBERD, J.M., MILLAR, A.J., WEBB, A.A.R Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. **Science**. v. 309, p. 630-633, 2005. Disponível em: <www.sciencemag.org>. Acesso em: 03 jul. 2013.

DUNLAP J.C, LOROS J.J, DECOURSEY P.J. **Chronobiology: Biological Timekeeping**. Ed. Sinauer Associates, Inc., 2004.

ESTEVES, I.; SOUZA, I.R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIÉ, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

FAZEKAS, A.J.; BURGESS, K.S.; KESANAKURTI, P.R.; GRAHAM, S.W.; NEWMASER, S.G.; HUSBAND, B.C.; PERCY, D.M.; HAJIBABAEI, M.; BARRETT, S.C.H. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. **Plos One**, v.3, n.7, 2008.

GARDNER, M.J., HUBBARD, K.E., HOTTA, C.T., DODD, A.N. e WEBB A.R. How plants tell the time. Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Cambridge, U.K. **Biochem. J.** v. 397, p. 15–24, 2006.

GOBBO-NETO, L. e LOPES N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GULDEN, R.H., LEVY-BOOTH, D., CAMPBELL, R., POWELL, J.R., HART, M.M., DUNFIELD, K.E., TREVORS, J.T., PAULS, K.P., KLIRONOMOS, J.N., SWANTON, C.J. An empirical approach to target DNA quantification in environmental samples using real-time polymerase chain reactions. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 39, p. 1956-1967, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, n. 41, p.95-98. Raleigh. North Carolina State University, 1999. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>. Acesso em: 10/03/2014

HARMER, S. L. The Circadian System in Higher Plants. Department of Plant Biology, College of Biological Sciences, University of California, Davis, California. **Annual Rev. Plant Biol.** v. 60, p. 357-377, 2009. Disponível em < www.annualreviews.org >. Acesso e: 20 ago. 2013.

HAYDON, M.J., HEARNA, T.J., BELLA, L.J., HANNAHB, M.A., WEBB, A.A.R. Metabolic regulation of circadian clocks. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Elsevier. p. 1-8, 2013.

KINMONTH-SCHULTZ H. A., GOLEMBESKI G. S., IMAIZUMI T. Circadian clock-regulated physiological outputs: Dynamic responses in nature. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Elsevier, p. 1-7, 2013.

KONDO, T. E ISHIURA M. The circadian clocks of plants and cyanobacteria. **Trends in plant science**. Elsevier Science. v. 4, n. 5, p. 171-177, 1999.

KRESS, W.J e ERICKSON, D.L . A two-Locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLOSone**. 2007.

MÁS, P. E YANOVSKY, M.J. Time for circadian rhythms: plants get synchronized. **Plant Biology**. Elsevier. v.12, p. 574–579, 2009.

MAYNOR, M., SCOTT, S.A., RICKERT, E.L. e GIBBS, R.A. Synthesis and evaluation of 3- and 7-substituted geranylgeranyl pyrophosphate analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 18, p. 1889-1892, 2008.

MICALLEF, B.J. Circadian Clocks/Photoperiodism and Crop Quality. University of Guelph, Guelph, Canada. **Elsevier B.V.** p. 220-234, 2011.

MURRAY, M.G. e THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> >. Acesso em 20/03/2014.

NIST Livro de Química na Web Base de dados de Referência padrão do NIST nº 69. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 20.dez.2013.

NIINEMETS, U., ARNETH, A., KUHN, U., MONSON, R. K., PENUELAS, J. e STAUDT, M. The emission factor of volatile isoprenoids: stress, acclimation, and developmental responses. **Biogeosciences**. v. 7, p. 2203–2223, 2010.

PADYANA, A.K e BURLEY S.K. Crystal Structure of Shikimate 5-Dehydrogenase (SDH) Bound to NADP: Insights into Function and Evolution. **Elsevier Science, Structure**. v. 11, p. 1005-1013, 2003.

PALÁ-PAÚL, J., PEREZ-ALONSO, M. J., VELASCO-NEGUERUELA, A., PALÁ-PAÚL, R., SANZ, J., CONEJERO, F. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 29, p. 663–672, 2001.

PAVARINI, D.P., PAVARINI, S.P., NIEHUESA, M., LOPES, N.P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**. Elsevier. v. 176. p. 5–16, 2012.

SALLES, I.S. E BUCKERIDGE, M.S. **Cronobiologia vegetal: aspectos fisiológicos de um relógio verde**. Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. *Revista da Biologia*. v. 9, n.3, p. 45–49, 2012.

SANTOS, A. G.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* SWARTZ. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SAVAZZINI, F. e MARTINELLI, L. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. **Analytica Chimica Acta**. v. 563, p. 274-282, 2006.

SINGH, D., SINGH, P.K., CHAUDHARY, S., MEHLA, K, KUMAR, S. Exome sequencing and advances in crop improvement. **Advances in Genetics**. Cap. 3, v. 79, p. 97-108, 2012.

SOUSA, F. G.; SCHNEIDER, F. Z.; MENDES, C. E.; MOURA, N. F.; DENARDIN, R. B. N.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, p.376-378, 2007.

STAIGER, D. e GREEN, R. RNA-based regulation in the plant circadian clock. **Trends in Plant Science**. v. 16, n.10, p. 517-523, 2011.

THE PLANT CELL. **American Society of Plant Biologists**. v. 18, p. 792-803, 2006. Disponível em < www.plantcell.org >

TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

YANOVSKY, M. J. e KAY, S. A. Signaling networks in the plant circadian system. **Cell signalling and gene regulation**. Elsevier. p. 429-435, 2001.

ZAGARI, N. Molecular mechanisms involved in hyponastic growth of terpene overexpressor plants. Wageningen University. **Plant Physiology Department**. p. 3-28, 2012.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.; SMILLIE, T. A. GUO, D.; KHAN, I. A. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 404–407, 2009.

APÊNDICE A

Este apêndice contém uma relação de tabelas com os resultados da proposta de identificação feita para todas as amostras analisadas, sendo possível verificar o tempo de retenção. Nota-se que há casos em que para os mesmos valores de tempo de retenção, índice de retenção e área do pico, diferentes substâncias foram identificadas. Isso ocorre, pois a proposta de identificação é feita comparando-se o índice de retenção calculado com o obtido na literatura (Tabela 12), utilizando uma faixa de ± 5 unidades. Assim substâncias com índices de retenção próximos agruparam-se nessas tabelas.

TABELA 14. Proposta de identificação para mês de janeiro.

Lingua 9h janeiro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	0.834
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	1.637
beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.527
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.81	1460.019	4.936
Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d	31.21	1493.697	12.585
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.43	1524.155	59.287

Lingua 9h janeiro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	0.603
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	1.302
beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.225
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.79	1459.538	4.19
Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d	31.18	1492.976	12.224
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.35	1522.138	59.392

Lingua 21h janeiro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	2.411
alfa-Copaeno	26.37	1378.355	0.514
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.016
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.8	1459.779	4.532
Biclogermacreno Viridifloreno Murolo germacreno d	31.18	1492.976	12.802
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.33	1521.634	54.594
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.89	1560.968	1.499

Lingua 21h janeiro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.19	857.5719	3.936
alfa-Copaeno	26.37	1378.355	0.7
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.056
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.79	1459.538	4.85
Biclogermacreno Viridifloreno Murolo germacreno d	31.18	1492.976	13.589
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.33	1521.634	52.922
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.89	1560.968	1.701

Sylvestris 9h janeiro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	2.332
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	6.003
alfa-Copaeno	26.37	1378.355	2.535
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.075
Calareno	28.59	1430.671	0.994
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.8	1459.779	1.348
beta-cadineno	32.2	1518.356	0.881
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.33	1521.634	41.453
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.724

Sylvestris 9h janeiro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	4.89
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	7.508
alfa-Copaeno Beta-Bourboneno	26.38	1378.585	3.568
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.27
Calareno	28.65	1432.115	1.29
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.8	1459.779	1.354
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.34	1521.886	49.124
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.803

Sylvestris 21h janeiro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
alfa-Copaeno Beta-Bourboneno	26.37	1378.355	5.413
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.66
Calareno	28.65	1432.115	2.109
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.79	1459.538	2.372
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.3	1520.877	64.718
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.89	1560.968	3.088

Sylvestris 21h janeiro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
alfa-Copaeno Beta-Bourboneno	26.38	1378.585	5.629
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.661
Calareno	28.66	1432.355	1.969
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-humuleno	29.8	1459.779	2.088
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.33	1521.634	70.741
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	2.781

TABELA 15. Proposta de identificação para mês de fevereiro.

Lingua 9h fevereiro (1)					Lingua 9h fevereiro (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area		Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	0.412		3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	0.681	
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	0.564		3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	0.828	
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.203		beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.707	
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	5.225		Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	6.497	
Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d	31.2	1493.457	12.912		Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d	31.19	1493.216	14.963	
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.36	1522.39	51.896		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.36	1522.39	49.074	
Germacreno B	33.57	1552.9	1.179		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.36	1522.39	49.074	
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.92	1561.725	1.763		Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.89	1560.968	2.826	
Lingua 21h fevereiro (1)					Lingua 21h fevereiro (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area		Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	0.42		3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	0.69	
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.25	860.1459	0.311		2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	0.956	
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.069		beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.164	
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	5		Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	4.834	
Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d	31.2	1493.457	13.069		Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d alfa-Murolo	31.21	1493.697	12.638	
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.37	1522.642	57.905		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.4	1523.399	58.067	
Germacreno B	33.57	1552.9	1.254		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.4	1523.399	58.067	
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.635		Germacreno B	33.56	1552.648	0.846	
					Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.107	
Sylvestris 9h fevereiro (1)					Sylvestris 9h fevereiro (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area		Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	8.61		3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	1.603	
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	6.115		3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	1.898	
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	2.283		Heptan-2-ol	6.37	905.4996	0.16	
Calareno	28.6	1430.912	0.721		beta-Cariofileno	28	1416.478	2.619	
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	6.035		Calareno	28.59	1430.671	0.811	
Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d alfa-Murolo	31.22	1493.938	17.907		Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	7.551	
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.34	1521.886	30.836		Biclogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d alfa-Murolo	31.21	1493.697	23.646	
Germacreno B	33.57	1552.9	1.118		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.34	1521.886	42.214	
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.229		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.34	1521.886	42.214	
					Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.011	
Sylvestris 21h fevereiro (1)					Sylvestris 21h fevereiro (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area		Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	10.396		2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	5.171	
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	11.302		2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	5.451	
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.38	1378.585	5.547		Heptan-2-ol	6.36	905.2116	0.257	
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.559		alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.37	1378.355	5.923	
Calareno	28.66	1432.355	1.899		beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.432	
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.8	1459.779	1.762		Calareno	28.64	1431.874	1.576	
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.33	1521.634	35.719		Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.79	1459.538	1.421	
Germacreno B	33.56	1552.648	2.277		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.32	1521.382	43.253	
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	2.874		beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.32	1521.382	43.253	
					Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.88	1560.716	1.899	

TABELA 16. Proposta de identificação para mês de março.

Lingua 9h março (1)				Lingua 9h março (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	0.733	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	0.507
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	0.322	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	0.908
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.79	1459.538	4.782	Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	4.531
Bicidogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d	31.18	1492.976	12.726	Bicidogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d	31.2	1493.457	12.606
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.36	1522.39	57.339	beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.35	1522.138	55.117
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.88	1560.716	1.22	Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.335

Lingua 21h março (1)				Lingua 21h março (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	0.128	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	0.367
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.25	860.1459	0.354	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	0.609
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.333	beta-Cariofileno	28	1416.478	1.186
Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.83	1460.5	4.538	Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.8	1459.779	4.408
Bicidogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d alfa-Murolo	31.23	1494.178	11.464	Bicidogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d alfa-Murolo	31.21	1493.697	11.304
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.44	1524.407	55.486	beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.43	1524.155	61.294
Germacreno B	33.57	1552.9	0.864	Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	0.863
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.053				

Sylvestris 9h março (1)				Sylvestris 9h março (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.19	857.5719	11.576	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.19	857.5719	7.316
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	7.515	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	9.489
alfa-Copaeno	26.35	1377.897	5.486	Heptan-2-ol	6.35	904.9237	0.517
beta-Cariofileno	27.98	1415.997	1.125	alfa-Copaeno	26.37	1378.355	6
Calareno	28.63	1431.633	1.72	beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.187
Aloaromadendreno alfa-Humuleno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno	29.77	1459.057	1.341	Calareno	28.65	1432.115	1.67
beta-cadineno	32.27	1520.121	23.036	Aloaromadendreno alfa-Humuleno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno	29.78	1459.298	1.379
Germacreno B	33.87	1560.464	1.444	beta-cadineno	32.28	1520.373	22.178
Cadala-1(10),3,8-trieno				Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.88	1560.716	1.442

Sylvestris 21h março (1)				Sylvestris 21h março (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.19	857.5719	2.764	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	2.689
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	4.537	3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	2.046
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.69	Heptan-2-ol	6.36	905.2116	0.176
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	8.947	beta-Cariofileno	28	1416.478	2.044
Viridifloreno Murolo				Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	8.459
Bicidogermacreno Germacreno d alfa-Murolo	31.25	1494.66	27.938	Bicidogermacreno Viridifloreno Murolo Germacreno d alfa-Murolo	31.24	1494.419	27.829
alfa-Murolo Germacreno d Murolo	31.51	1500.958	0.44	alfa-Murolo Germacreno d Murolo Viridifloreno	31.48	1500.202	0.534
alfa-Murolo Germacreno d	31.56	1502.219	0.498	alfa-Murolo Germacreno d	31.55	1501.967	0.485
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.35	1522.138	32.154	beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.37	1522.642	40.271
Germacreno B	33.56	1552.648	1.006	Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.141
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.033				

TABELA 17. Proposta de identificação para mês de abril.

Lingua 9h abril (1)					Lingua 9h abril (2)				
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area		Compostos	Tempo (Min)	IR	Area	
2-Hexen-1-ol (E)					2-Hexen-1-ol (E)				
3-Hexen-1-ol	5.22	858.8589	1.236		3-Hexen-1-ol	5.22	858.8589	0.413	
2-trans-Hexenal					2-trans-Hexenal				
alfa-Copaeno	26.36	1378.126	0.523		alfa-Copaeno	26.36	1378.126	0.524	
beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.502		beta-Cariofileno	28	1416.478	1.273	
beta-Cariofileno	28.37	1425.379	0.614		beta-Cariofileno	28.37	1425.379	0.509	
Calareno	28.58	1430.431	0.529		Calareno	28.58	1430.431	0.541	
Calareno	28.61	1431.152	0.52		Calareno	28.62	1431.393	0.362	
Aloaromadendreno					Aloaromadendreno				
Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.8	1459.779	5.784		Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.81	1460.019	5.087	
Cadina-1(6),4-dieno					Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno					alfa-Humuleno				
Biciclogermacreno					Biciclogermacreno				
Viridifloreo	31.2	1493.457	13.445		Viridifloreo	31.22	1493.938	12.924	
Muroloeno					Muroloeno				
Germacreno d					Germacreno d				
alfa-Muroloeno					alfa-Muroloeno				
Germacreno d	31.48	1500.202	0.542		Germacreno d	31.47	1499.952	0.584	
Muroloeno					Muroloeno				
Viridifloreo					Viridifloreo				
alfa-Muroloeno					alfa-Muroloeno				
Germacreno d	31.54	1501.715	0.561		Germacreno d	31.54	1501.715	0.436	
beta-cadineno					beta-cadineno				
Cadina-1,4-dieno	32.37	1522.642	55.478		Cadina-1,4-dieno	32.44	1524.407	56.967	
Cadala-1(10),3,8-trieno					Cadala-1(10),3,8-trieno				
Germacreno B	33.89	1560.968	0.999		Germacreno B	33.89	1560.968	0.815	
Lingua 21h abril (1)					Lingua 21h abril (2)				
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area		Compostos	Tempo (Min)	IR	Area	
3-Hexen-1-ol					3-Hexen-1-ol				
2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	0.283		2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	0.368	
2-trans-Hexenal					2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol					3-Hexen-1-ol				
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	0.373		2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	0.334	
2-trans-Hexenal					2-trans-Hexenal				
alfa-Copaeno	26.37	1378.355	0.569		alfa-Copaeno	26.38	1378.585	0.566	
beta-Bourboneno					beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.288		beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.466	
Calareno	28.59	1430.671	0.57		Calareno	28.6	1430.912	0.556	
Calareno	28.62	1431.393	0.483		Calareno	28.62	1431.393	0.535	
Aloaromadendreno					Aloaromadendreno				
Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.81	1460.019	5.111		Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.82	1460.26	5.439	
Cadina-1(6),4-dieno					Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno					alfa-Humuleno				
Biciclogermacreno					Biciclogermacreno				
Viridifloreo	31.2	1493.457	13.245		Viridifloreo	31.22	1493.938	13.533	
Muroloeno					Muroloeno				
Germacreno d					Germacreno d				
alfa-Muroloeno					alfa-Muroloeno				
Germacreno d	31.48	1500.202	0.53		Germacreno d	31.49	1500.454	0.561	
Muroloeno					Muroloeno				
Viridifloreo					Viridifloreo				
alfa-Muroloeno					alfa-Muroloeno				
Germacreno d	31.54	1501.715	0.692		Germacreno d	31.56	1502.219	0.528	
beta-cadineno					beta-cadineno				
Cadina-1,4-dieno	32.38	1522.895	55.23		Cadina-1,4-dieno	32.42	1523.903	55.741	
Cadala-1(10),3,8-trieno					Cadala-1(10),3,8-trieno				
Germacreno B	33.89	1560.968	0.987		Germacreno B	33.56	1552.648	0.848	
Germacreno B					Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.003	
					Germacreno B				
Sylvestris 9h abril (1)					Sylvestris 9h abril (2)				
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area		Compostos	Tempo (Min)	IR	Area	
3-Hexen-1-ol					3-Hexen-1-ol				
2-Hexen-1-ol (E)	5.19	857.5719	15.756		2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	18.128	
2-trans-Hexenal					2-trans-Hexenal				
alfa-Copaeno	26.36	1378.126	5.489		alfa-Copaeno	26.38	1378.585	5.517	
beta-Bourboneno					beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.742		beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.388	
Aloaromadendreno					Aloaromadendreno				
alfa-Humuleno	29.78	1459.298	1.619		Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.81	1460.019	1.473	
Murola-4(14),5-dieno <cis->					Cadina-1(6),4-dieno				
Cadina-1(6),4-dieno					alfa-Humuleno				
beta-cadineno	32.3	1520.877	32.822		beta-cadineno	32.34	1521.886	36.395	
Cadina-1,4-dieno					Cadina-1,4-dieno				
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.88	1560.716	2.109		Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.692	
Germacreno B					Germacreno B				
Sylvestris 21h abril (1)					Sylvestris 21h abril (2)				
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area		Compostos	Tempo (Min)	IR	Area	
3-Hexen-1-ol					3-Hexen-1-ol				
2-Hexen-1-ol (E)	5.19	857.5719	1.998		2-Hexen-1-ol (E)	5.21	858.4299	0.751	
2-trans-Hexenal					2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol					3-Hexen-1-ol				
2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	1.991		2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	0.979	
2-trans-Hexenal					2-trans-Hexenal				
alfa-Copaeno	26.36	1378.126	4.884		alfa-Copaeno	26.37	1378.355	5.061	
beta-Cariofileno	27.98	1415.997	1.722		beta-Cariofileno	28	1416.478	1.768	
Calareno	28.59	1430.671	0.643		Calareno	28.62	1431.393	0.994	
Calareno	28.63	1431.633	0.977		Calareno	28.65	1432.115	1.059	
Aloaromadendreno					Aloaromadendreno				
Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.77	1459.057	1.912		Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.79	1459.538	2.068	
Cadina-1(6),4-dieno					Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno					alfa-Humuleno				
alfa-Muroloeno					alfa-Muroloeno				
Germacreno d	31.45	1499.471	0.632		Germacreno d	31.49	1500.454	0.863	
Muroloeno					Muroloeno				
Viridifloreo					Viridifloreo				
alfa-Muroloeno					alfa-Muroloeno				
Germacreno d	31.52	1501.21	0.95		Germacreno d	31.54	1501.715	1.303	
Muroloeno					Muroloeno				
beta-cadineno					beta-cadineno				
Cadina-1,4-dieno	32.32	1521.382	56.426		Cadina-1,4-dieno	32.32	1521.382	61.734	
Germacreno B					Germacreno B				
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.87	1560.464	2.204		Cadala-1(10),3,8-trieno	33.89	1560.968	3.075	
Germacreno B					Germacreno B				

TABELA 18. Proposta de identificação para mês de maio para a variedade Sylvestris.

Sylvestris 9h maio (1)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	1.085	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol	5.23	859.2879	1.233	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
Heptan-2-ol	6.37	905.4996	0.195	
alfa-Copaeno	26.39	1378.814	3.266	
beta-Bourboneno				
beta-Elemeno				
beta-Cubebeno	26.91	1390.724	0.265	
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.386	
Calareno	28.67	1432.596	1.463	
Calareno	28.84	1436.685	0.12	
Aloaromadendreno	29.82	1460.26	1.453	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.56	1502.219	1.602	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
beta-cadineno	32.39	1523.147	53.666	
Cadina-1,4-dieno				
Germacreno B				
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.57	1552.9	1.183	
Germacreno B	33.91	1561.473	1.863	

Sylvestris 9h maio (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	2.39	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol	5.23	859.2879	2.588	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
Heptan-2-ol	6.37	905.4996	0.388	
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	6.76	
beta-Bourboneno				
beta-Cubebeno				
beta-Elemeno	26.9	1390.495	0.388	
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.514	
Calareno	28.66	1432.355	2.201	
Calareno	28.74	1434.28	0.183	
Aloaromadendreno	29.8	1459.779	1.41	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.55	1501.967	1.203	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
beta-cadineno	32.33	1521.634	34.795	
Cadina-1,4-dieno				
Germacreno B				
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.62	1554.16	0.029	
Germacreno B	33.9	1561.22	2.018	

Sylvestris 15h maio (1)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	3.759	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol	5.23	859.2879	5.387	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
Heptan-2-ol	6.37	905.4996	0.608	
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	3.419	
beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno				
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.151	
Aloaromadendreno	29.8	1459.779	1.507	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.54	1501.715	1.893	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
beta-cadineno	32.31	1521.13	30.643	
Cadina-1,4-dieno				
Germacreno B				
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	2.247	
Germacreno B				

Sylvestris 15h maio (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	2.422	
3-Hexen-1-ol				
2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol	5.23	859.2879	1.712	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
Heptan-2-ol	6.36	905.2116	0.463	
alfa-Copaeno	26.37	1378.355	3.543	
beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno				
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.626	
Aloaromadendreno	29.8	1459.779	0.862	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.53	1501.462	1.73	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
Muroloeno	32.29	1520.625	27.842	
beta-cadineno				
Cadina-1,4-dieno				
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.678	
Germacreno B				

Sylvestris 21h maio (1)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	3.42	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol	5.23	859.2879	2.307	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
alfa-Copaeno	26.4	1379.043	7.563	
beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno				
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.788	
Calareno	28.67	1432.596	2.089	
Aloaromadendreno	29.81	1460.019	1.8	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.54	1501.715	0.855	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
alfa-Muroloeno	31.56	1502.219	0.704	
Germacreno d				
Germacreno d				
beta-cadineno	32.36	1522.39	36.207	
Cadina-1,4-dieno				
Germacreno B				
Germacreno B	33.57	1552.9	1.077	
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	2.065	
Germacreno B				

Sylvestris 21h maio (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	3.42	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol	5.23	859.2879	2.307	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
alfa-Copaeno	26.4	1379.043	7.563	
beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno				
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.788	
Calareno	28.67	1432.596	2.089	
Aloaromadendreno	29.81	1460.019	1.8	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.54	1501.715	0.855	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
alfa-Muroloeno	31.56	1502.219	0.704	
Germacreno d				
Germacreno d				
beta-cadineno	32.36	1522.39	36.207	
Cadina-1,4-dieno				
Germacreno B				
Germacreno B	33.57	1552.9	1.077	
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	2.065	
Germacreno B				

Sylvestris 03h maio (1)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	2.772	
3-Hexen-1-ol				
2-trans-Hexenal				
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	2.547	
3-Hexen-1-ol				
2-trans-Hexenal				
Heptan-2-ol	6.36	905.2116	0.625	
alfa-Copaeno	26.39	1378.814	2.355	
beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno				
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	0.974	
Calareno	28.67	1432.596	1.041	
Aloaromadendreno	29.81	1460.019	1.039	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.56	1502.219	1.111	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
beta-cadineno	32.3	1520.877	17.605	
Cadina-1,4-dieno				
Germacreno B				
Germacreno B	33.56	1552.648	1.013	
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.143	
Germacreno B				

Sylvestris 03h maio (2)				
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	
3-Hexen-1-ol	5.19	857.5719	5.366	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
3-Hexen-1-ol	5.22	858.8589	2.686	
2-Hexen-1-ol (E)				
2-trans-Hexenal				
Heptan-2-ol	6.37	905.4996	0.254	
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	5.182	
beta-Bourboneno				
beta-Cariofileno				
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.47	
Calareno	28.65	1432.115	2.182	
Aloaromadendreno	29.8	1459.779	2.065	
Murolo-4(14),5-dieno <cis->				
Cadina-1(6),4-dieno				
alfa-Humuleno	31.54	1501.715	1.726	
alfa-Muroloeno				
Germacreno d				
beta-cadineno	32.33	1521.634	47.92	
Cadina-1,4-dieno				
Germacreno B				
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.89	1560.968	1.609	
Germacreno B				

TABELA 19. Proposta de identificação para mês de maio para a variedade Língua.

Língua 9h maio (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	2.228
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal			
2-Hexen-1-ol (E)	5.24	859.7169	1.23
3-Hexen-1-ol			
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	0.744
beta-Bourboneno			
beta-Cubebeno			
beta-Elemeno	26.89	1390.266	0.207
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.503
Calareno	28.59	1430.671	1.121
Aloaromadendreno	29.82	1460.26	4.79
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.22	1493.938	11.289
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.56	1502.219	1.482
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.44	1524.407	52.395
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno			
Germacreno B	33.57	1552.9	0.962
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.351
Germacreno B			

Língua 9h maio (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	1.01
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal			
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	1.099
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal	26.37	1378.355	0.716
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno			
beta-Cubebeno	26.89	1390.266	0.131
beta-Elemeno	28	1416.478	1.277
beta-Cariofileno			
Calareno	28.59	1430.671	1.142
Aloaromadendreno	29.81	1460.019	4.313
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.2	1493.457	11.642
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.55	1501.967	1.612
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.4	1523.399	52.885
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.508
Germacreno B			

Língua 15h maio (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	1.461
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal			
2-trans-Hexenal	26.37	1378.355	0.392
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno	28	1416.478	1.006
beta-Cariofileno			
Calareno			
Aloaromadendreno	29.8	1459.779	4.582
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.19	1493.216	11.971
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.55	1501.967	1.668
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.35	1522.138	52.078
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	2.32
Germacreno B			

Língua 15h maio (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	2.373
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal			
2-trans-Hexenal	26.37	1378.355	0.541
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno	28	1416.478	0.953
beta-Cariofileno			
Calareno			
Aloaromadendreno	29.79	1459.538	3.834
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.18	1492.976	10.757
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.54	1501.715	1.408
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.34	1521.886	54.013
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.89	1560.968	1.561
Germacreno B			

Língua 21h maio (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	1.381
2-Hexen-1-ol (E)			
2-trans-Hexenal			
2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	1.502
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	26.38	1378.585	0.574
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno	28.01	1416.719	1.438
beta-Cariofileno			
Calareno	28.6	1430.912	0.875
Aloaromadendreno	29.81	1460.019	5.146
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.21	1493.697	12.359
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.56	1502.219	1.367
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.22	1518.86	0.854
beta-cadineno			
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno	32.4	1523.399	54.357
Germacreno B	33.56	1552.648	1.037
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.089
Germacreno B			

Língua 21h maio (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	2.065
2-Hexen-1-ol (E)			
2-trans-Hexenal			
2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	2.116
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	26.37	1378.355	0.26
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno	28	1416.478	1.32
beta-Cariofileno			
Calareno	28.58	1430.431	1.008
Aloaromadendreno	29.8	1459.779	5.012
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.18	1492.976	12.223
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.54	1501.715	1.903
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.33	1521.634	49.046
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno			
Germacreno B	33.55	1552.395	1.448
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.89	1560.968	1.737
Germacreno B			

Língua 03h maio (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	2.874
2-Hexen-1-ol (E)			
2-trans-Hexenal			
2-trans-Hexenal	5.22	858.8589	1.92
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	26.38	1378.585	0.286
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno	28	1416.478	1.385
beta-Cariofileno			
Calareno	28.59	1430.671	1.085
Aloaromadendreno	29.81	1460.019	4.57
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.2	1493.457	11.821
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.55	1501.967	1.58
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.2	1518.356	0.664
beta-cadineno			
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno	32.38	1522.895	49.485
Germacreno B	33.57	1552.9	0.906
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.052
Germacreno B			

Língua 03h maio (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol	5.2	858.0009	0.78
2-Hexen-1-ol (E)			
2-trans-Hexenal			
2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	1.281
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	26.39	1378.814	0.336
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno	28.01	1416.719	1.221
beta-Cariofileno			
Calareno	28.6	1430.912	0.953
Aloaromadendreno	29.82	1460.26	4.369
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieneo			
alfa-Humuleno	31.22	1493.938	11.717
Biciclogermacreno			
Viridifloreno			
Murolo			
Germacreno d	31.56	1502.219	0.946
alfa-Murolo			
Germacreno d	32.21	1518.608	0.463
beta-cadineno			
beta-cadineno			
Cadina-1,4 dieno	32.42	1523.903	57.539
Germacreno B	33.57	1552.9	0.906
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.18
Germacreno B			

TABELA 20. Proposta de identificação para mês de junho para a variedade Sylvestris.

Sylvestris 9h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.25	860.1459	0.558
3-Hexen-1-ol			
Heptan-2-ol	6.37	905.4996	0.485
alfa-Copaeno	26.39	1378.814	2.725
beta-Bourboneno			
beta-cadineno	32.21	1518.608	0.685
beta-cadineno	32.29	1520.625	12.614
Cadina-1,4-dieno			

Sylvestris 9h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol	5.21	858.4299	1.772
2-Hexen-1-ol (E)			
2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	4.244
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	6.37	905.4996	0.414
2-trans-Hexenal			
Heptan-2-ol	26.37	1378.355	4.732
alfa-Copaeno	32.3	1520.877	39.72
beta-cadineno			
Cadina-1,4-dieno			

Sylvestris 15h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.24	859.7169	2.883
3-Hexen-1-ol			
alfa-Copaeno	26.39	1378.814	3.152
beta-Bourboneno			
beta-cadineno	32.31	1521.13	21.418
Cadina-1,4-dieno			

Sylvestris 15h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	4.573
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal	26.38	1378.585	4.123
alfa-Copaeno			
beta-Bourboneno	32.3	1520.877	31.849
beta-cadineno			
Cadina-1,4-dieno			

Sylvestris 21h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
alfa-Copaeno	26.4	1379.043	0.976
beta-Bourboneno			
beta-Elemento	26.91	1390.724	0.574
beta-Cubebeno			
beta-Cariofileno	28.03	1417.2	1.599
Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.83	1460.5	5.444
Alloaromadendreno			
Cadina-1(6),4-dieno	31.23	1494.178	13.804
alfa-Humuleno			
Biclogermacreno	31.23	1494.178	13.804
Viridifloreno			
Murolo	31.58	1502.723	2.246
Germacreno d			
alfa-Murolo	32.4	1523.399	47.287
beta-cadineno			
Cadina-1,4-dieno	33.59	1553.404	3.303
Germacreno B			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.93	1561.977	3.733
Germacreno B			

Sylvestris 21h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cubebeno	26.9	1390.495	0.3
beta-Elemento			
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	2.067
Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.83	1460.5	10.651
Alloaromadendreno			
Cadina-1(6),4-dieno	31.24	1494.419	31.901
alfa-Humuleno			
Biclogermacreno	31.24	1494.419	31.901
Viridifloreno			
Murolo	31.56	1502.219	1.914
Germacreno d			
alfa-Murolo	31.56	1502.219	1.914
beta-cadineno			
alfa-Murolo	32.34	1521.886	29.601
Germacreno d			
beta-cadineno	33.56	1552.648	2.014
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.91	1561.473	2.227
Cadala-1(10),3,8-trieno			
Germacreno B			

Sylvestris 03h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.25	860.1459	1.172
3-Hexen-1-ol			
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.482
Alloaromadendreno	29.81	1460.019	6.211
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieno	31.19	1493.216	18.51
alfa-Humuleno			
Biclogermacreno	31.19	1493.216	18.51
Viridifloreno			
Murolo	31.55	1501.967	1.439
Germacreno d			
alfa-Murolo	32.29	1520.625	20.959
Germacreno d			
beta-cadineno	33.91	1561.473	2.122
Cadina-1,4-dieno			
Cadala-1(10),3,8-trieno			
Germacreno B			

Sylvestris 03h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.25	860.1459	2.153
3-Hexen-1-ol			
beta-Cariofileno	28.03	1417.2	0.462
Alloaromadendreno	29.82	1460.26	3.896
Murolo-4(14),5-dieno <cis->			
Cadina-1(6),4-dieno	31.2	1493.457	9.476
alfa-Humuleno			
Biclogermacreno	31.2	1493.457	9.476
Viridifloreno			
Murolo	31.57	1502.471	0.85
Germacreno d			
alfa-Murolo	32.29	1520.625	7.524
Germacreno d			
beta-cadineno	33.58	1553.152	1.028
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.92	1561.725	1.793
Cadala-1(10),3,8-trieno			
Germacreno B			

TABELA 21. Proposta de identificação para mês de junho para a variedade Língua.

Língua 9h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.553
Calareno	28.6	1430.912	1.654
Aloaromadendreno Murola-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	6.099
Biciclogermacreno Viridifloreno Muroleno Germacreno d	31.2	1493.457	15.764
alfa-Muroleno Germacreno d	31.56	1502.219	3.002
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.34	1521.886	43.374
Germacreno B	33.56	1552.648	2.37
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	3.068

Língua 9h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.385
Calareno	28.61	1431.152	1.573
Aloaromadendreno Murola-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	5.964
Biciclogermacreno Viridifloreno Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno	31.22	1493.938	15.344
alfa-Muroleno Germacreno d	31.56	1502.219	1.91
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.38	1522.895	47.441
Germacreno B	33.57	1552.9	2.037
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	2.434

Língua 15h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28.03	1417.2	1.309
Calareno	28.61	1431.152	0.859
Calareno	28.65	1432.115	0.678
Murola-4(14),5-dieno <cis-> Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.83	1460.5	5.203
Biciclogermacreno Viridifloreno Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno	31.22	1493.938	13.62
alfa-Muroleno Germacreno d Muroleno	31.51	1500.958	0.637
alfa-Muroleno Germacreno d	31.57	1502.471	2.389
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.37	1522.642	45.247
Germacreno B	33.58	1553.152	3.069
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.92	1561.725	4.062

Língua 15h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.085
Calareno	28.6	1430.912	0.768
Calareno	28.63	1431.633	0.545
Aloaromadendreno Murola-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.8	1459.779	4.657
Biciclogermacreno Viridifloreno Muroleno Germacreno d	31.18	1492.976	11.938
alfa-Muroleno Germacreno d Muroleno	31.51	1500.958	0.747
alfa-Muroleno Germacreno d	31.54	1501.715	1.509
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.32	1521.382	47.703
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.89	1560.968	2.37

Língua 21h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28.05	1417.681	2.614
Murola-4(14),5-dieno <cis-> Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.85	1460.981	10.017
Viridifloreno Muroleno Biciclogermacreno Germacreno d alfa-Muroleno	31.25	1494.66	29.449
alfa-Muroleno Germacreno d	31.56	1502.219	0.711
alfa-Muroleno	31.59	1502.975	1.002
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.37	1522.642	38.008
Germacreno B	33.59	1553.404	2.369
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.94	1562.229	2.609

Língua 21h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.529
Aloaromadendreno Murola-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	5.243
Biciclogermacreno Viridifloreno Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno	31.21	1493.697	12.932
alfa-Muroleno Germacreno d Muroleno	31.5	1500.706	0.636
alfa-Muroleno Germacreno d	31.55	1501.967	1.431
beta-cadineno	32.2	1518.356	0.889
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.4	1523.399	53.892
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.988

Língua 03h junho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28.03	1417.2	1.488
Murola-4(14),5-dieno <cis-> Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.83	1460.5	5.952
Biciclogermacreno Viridifloreno Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno	31.22	1493.938	14.768
alfa-Muroleno Germacreno d	31.57	1502.471	3.795
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.35	1522.138	43.243
Germacreno B	33.58	1553.152	4.164
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.93	1561.977	4.975

Língua 03h junho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.541
Aloaromadendreno Murola-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	5.331
Biciclogermacreno Viridifloreno Muroleno Germacreno d	31.19	1493.216	12.529
alfa-Muroleno Germacreno d	31.55	1501.967	1.949
beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	32.37	1522.642	55.116
Germacreno b	33.55	1552.395	1.61
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.89	1560.968	2.034

TABELA 22. Proposta de identificação para mês de julho para a variedade Sylvestris.

Sylvestris 9h julho (1)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.25	860.1459	0.479
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.27	861.0039	1.442
3-Hexen-1-ol			
alfa-Copaeno	26.42	1379.501	7.756
beta-Bourboneno			
beta-Elemeno	26.93	1391.182	0.834
beta-Cubebano			
beta-Cariofileno	28.04	1417.44	1.851
Calareno	28.7	1433.317	2.793
Murola-4(14),5-dieno <cis->			
Aloaromadendreno	29.84	1460.741	2.396
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.55	1501.967	1.325
Germacreno d			
alfa-Muroloeno	31.58	1502.723	1.687
beta-cadineno	32.36	1522.39	27.399
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.6	1553.656	3.184
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.94	1562.229	4.581
Germacreno B			

Sylvestris 9h julho (2)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.21	858.4299	2.885
2-trans-Hexenal			
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	2.606
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno	26.41	1379.272	7.664
beta-Bourboneno			
beta-Elemeno	26.92	1390.953	0.679
beta-Cubebano			
beta-Cariofileno	28.03	1417.2	1.905
Calareno	28.65	1432.115	0.612
Calareno	28.69	1433.077	1.284
Murola-4(14),5-dieno <cis->			
Aloaromadendreno	29.83	1460.5	1.931
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.52	1501.21	0.658
Germacreno d			
Muroloeno			
alfa-Muroloeno	31.57	1502.471	0.793
Germacreno d			
beta-cadineno	32.35	1522.138	32.355
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.58	1553.152	1.72
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.92	1561.725	2.272
Germacreno B			

Sylvestris 15h julho (1)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.27	861.0039	2.981
3-Hexen-1-ol			
alfa-Copaeno	26.43	1379.73	4.751
beta-Bourboneno			
beta-Elemeno	26.94	1391.411	0.655
beta-Cubebano			
beta-Cariofileno	28.05	1417.681	1.549
Calareno	28.7	1433.317	1.728
Murola-4(14),5-dieno <cis->			
Aloaromadendreno	29.85	1460.981	2.004
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.6	1503.227	3.011
beta-cadineno	32.38	1522.895	34.587
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.61	1553.908	2.961
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.95	1562.481	3.805
Germacreno B			

Sylvestris 15h julho (2)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.24	859.7169	3.026
3-Hexen-1-ol			
alfa-Copaeno	26.4	1379.043	3.304
beta-Bourboneno			
beta-Elemeno	26.92	1390.953	0.38
beta-Cubebano			
beta-Cariofileno	28.03	1417.2	0.955
Calareno	28.68	1432.836	1.648
Aloaromadendreno			
Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.82	1460.26	1.564
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.57	1502.471	1.855
Germacreno d			
beta-cadineno	32.36	1522.39	38.333
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.58	1553.152	2.202
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.92	1561.725	2.462
Germacreno B			

Sylvestris 21h julho (1)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	3.633
2-trans-Hexenal			
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.21	858.4299	6.756
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno	26.39	1378.814	8.762
beta-Bourboneno			
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.978
Calareno	28.66	1432.355	2.807
Aloaromadendreno			
Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.81	1460.019	2.249
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.55	1501.967	2.447
Germacreno d			
beta-cadineno	32.32	1521.382	31.922
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.56	1552.648	2.496
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	3.577
Germacreno B			

Sylvestris 21h julho (2)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	1.691
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal			
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	2.875
3-Hexen-1-ol			
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno	26.42	1379.501	7.457
beta-Bourboneno			
beta-Cariofileno	28.04	1417.44	1.603
Calareno	28.69	1433.077	2.368
Murola-4(14),5-dieno <cis->			
Aloaromadendreno	29.84	1460.741	1.837
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.59	1502.975	2.022
beta-cadineno	32.37	1522.642	42.374
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.59	1553.404	1.876
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.94	1562.229	2.874
Germacreno B			

Sylvestris 03h julho (1)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
2-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.21	858.4299	0.735
2-trans-Hexenal			
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	1.035
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno	26.4	1379.043	8.426
beta-Bourboneno			
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	2.127
Calareno	28.61	1431.152	0.533
Calareno	28.67	1432.596	1.932
Aloaromadendreno			
Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.81	1460.019	2.104
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.56	1502.219	2.108
Germacreno d			
beta-cadineno	32.36	1522.39	36.044
Cadina-1,4-dieno			
Germacreno B	33.57	1552.9	1.957
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	3.012
Germacreno B			

Sylvestris 03h julho (2)			
Compostos	Tempo (Min)	IR	Area
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	0.88
2-trans-Hexenal			
3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	0.781
2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	6.616
beta-Bourboneno			
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.817
Calareno	28.63	1431.633	0.791
Calareno	28.66	1432.355	1.28
Aloaromadendreno			
Murola-4(14),5-dieno <cis->	29.8	1459.779	1.725
Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno			
alfa-Muroloeno	31.54	1501.715	2.009
Germacreno d			
beta-cadineno	32.32	1521.382	29.628
Cadina-1,4-dieno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	2.316
Germacreno B			

TABELA 23. Proposta de identificação para mês de julho para a variedade Lingua.

Lingua 9h julho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno Aloaromadendreno alfa-Humuleno	29.85	1460.981	6.739
Murolo Germacreno d alfa-Murolo beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.24	1494.419	19.488
Cadina-1,4-dieno	31.59	1502.975	4.29
Germacreno B	33.6	1553.656	3.781
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.94	1562.229	5.677

Lingua 9h julho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	6.881
Murolo Germacreno d alfa-Murolo beta-cadineno	31.2	1493.457	16.754
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	1.532
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	2.298

Lingua 15h julho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.25	860.1459	0.911
beta-Cariofileno	28.05	1417.681	1.607
Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.85	1460.981	5.162
Germacreno d alfa-Murolo Murolo beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.25	1494.66	13.287
Cadina-1,4-dieno	31.6	1503.227	2.766
Germacreno B	33.61	1553.908	2.941
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.95	1562.481	3.267

Lingua 15h julho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	1.954
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.217
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	5.084
Murolo Germacreno d alfa-Murolo beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.21	1493.697	12.841
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	1.626
Germacreno B	33.56	1552.648	1.269
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.454

Lingua 21h julho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	5.803
Murolo Germacreno d alfa-Murolo beta-cadineno	31.2	1493.457	13.876
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.56	1502.219	2.757
Germacreno B	33.56	1552.648	3.661
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	5.327

Lingua 21h julho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	7.021
Murolo Germacreno d alfa-Murolo beta-cadineno	31.19	1493.216	14.862
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.56	1502.219	3.781
Germacreno B	33.56	1552.648	3.49
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	4.297

Lingua 03h julho (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
Aloaromadendreno Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	5.638
Murolo Germacreno d alfa-Murolo beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.22	1493.938	13.73
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.56	1502.219	2.106
Germacreno B	33.57	1552.9	2.267
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	2.822

Lingua 03h julho (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
Murolo-4(14),5-dieno <cis-> Cadina-1(6),4-dieno Aloaromadendreno alfa-Humuleno	29.83	1460.5	7.894
Murolo Germacreno d alfa-Murolo beta-cadineno	31.2	1493.457	15.176
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.93	1561.977	4.406

TABELA 24. Proposta de identificação para mês de agosto.

Lingua 9h agosto (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	0.51
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	4.023
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno	31.2	1493.457	9.915
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.57	1502.471	2.275
Germacreno B	33.58	1553.152	1.88
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.92	1561.725	2.193

Lingua 9h agosto (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.762
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	4.733
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno	31.2	1493.457	11.221
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	1.666
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.991

Lingua 21h agosto (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.39	1378.814	0.735
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.41
Calareno	28.61	1431.152	1.356
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	4.658
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.21	1493.697	12.069
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno alfa-Muroleno	31.53	1501.462	0.87
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.56	1502.219	1.238
Germacreno B	33.57	1552.9	1.839
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	2.042

Lingua 21h agosto (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.38	1378.585	0.745
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.48
Calareno	28.6	1430.912	1.448
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	5.349
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno	31.2	1493.457	13.047
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno alfa-Muroleno Germacreno d	31.49	1500.454	0.61
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	1.528
Germacreno B	33.56	1552.648	1.738
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	2.048

Sylvestris 9h agosto (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	3.263
Heptan-2-ol	6.37	905.4996	0.486
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.4	1379.043	1.924
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	0.748
Calareno	28.62	1431.393	0.87
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	1.024
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.57	1502.471	1.196
Germacreno B	33.58	1553.152	1.014
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.92	1561.725	1.041

Sylvestris 9h agosto (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	3.368
Heptan-2-ol	6.36	905.2116	0.556
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.39	1378.814	2.249
beta-Cariofileno	28.02	1416.959	0.692
Calareno	28.66	1432.355	0.656
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	0.584
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	0.751
Germacreno B	33.57	1552.9	0.59
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	0.806

Sylvestris 21h agosto (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.26	860.5749	4.678
beta-Cariofileno	28.04	1417.44	0.814
Calareno	28.63	1431.633	1.426
Cadina-1(6),4-dieno Aloaromadendreno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.83	1460.5	3.145
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.57	1502.471	2.245
Germacreno B	33.58	1553.152	1.983
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.93	1561.977	1.794

Sylvestris 21h agosto (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	3.516
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.193
Calareno	28.6	1430.912	0.868
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	3.312
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	1.606
Germacreno B	33.56	1552.648	1.395
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.126

TABELA 25. Proposta de identificação para mês de setembro.

Lingua 9h setembro (1)				Lingua 9h setembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
alfa-Copaeno	26.37	1378.355	0.721	alfa-Copaeno	26.38	1378.585	0.672
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.32	beta-Bourboneno	28.01	1416.719	1.657
Calareno	28.59	1430.671	1.207	beta-Cariofileno	28.6	1430.912	1.108
Aloaromadendreno				Calareno			
Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.8	1459.779	4.45	Aloaromadendreno			
Cadina-1(6),4-dieno				Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.82	1460.26	5.108
alfa-Humuleno				Cadina-1(6),4-dieno			
Murolo				alfa-Humuleno			
Germacreno d	31.21	1493.697	11.484	Murolo			
alfa-Murolo				Germacreno d	31.22	1493.938	11.34
beta-cadineno				alfa-Murolo			
Cadina-1,4-dieno				beta-cadineno			
Cadina-1,4-dieno	31.52	1501.21	0.803	Cadina-1,4-dieno			
beta-cadineno				Cadina-1,4-dieno	31.49	1500.454	0.798
alfa-Murolo				beta-cadineno			
Cadina-1,4-dieno	31.55	1501.967	0.847	alfa-Murolo			
beta-cadineno				Germacreno d			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.551	Cadina-1,4-dieno	31.56	1502.219	0.727
Germacreno B				beta-cadineno			
				Germacreno B	33.57	1552.9	1.168
				Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.438
				Germacreno B			

Lingua 21h setembro (1)				Lingua 21h setembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.432	beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.21
Calareno	28.59	1430.671	1.158	Calareno	28.6	1430.912	0.688
Aloaromadendreno				Aloaromadendreno			
Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.8	1459.779	4.764	Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.82	1460.26	4.466
Cadina-1(6),4-dieno				Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno				alfa-Humuleno			
Murolo				Murolo			
Germacreno d	31.18	1492.976	11.376	Germacreno d	31.21	1493.697	11.823
alfa-Murolo				alfa-Murolo			
beta-cadineno				beta-cadineno			
Cadina-1,4-dieno	31.51	1500.958	0.913	Cadina-1,4-dieno			
beta-cadineno				Cadina-1,4-dieno	31.52	1501.21	0.748
alfa-Murolo				beta-cadineno			
Cadina-1,4-dieno	31.54	1501.715	1.422	alfa-Murolo			
beta-cadineno				Cadina-1,4-dieno	31.56	1502.219	1.27
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	2.027	beta-cadineno			
Germacreno B				Germacreno B	33.57	1552.9	1.377
				Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.534
				Germacreno B			

Sylvestris 9h setembro (1)				Sylvestris 9h setembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.24	859.7169	1.771	2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	0.821
3-Hexen-1-ol				3-Hexen-1-ol			
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	4.937	2-trans-Hexenal			
beta-Bourboneno	28	1416.478	1.773	alfa-Copaeno	26.39	1378.814	4.276
beta-Cariofileno	28.66	1432.355	1.646	beta-Bourboneno	28.01	1416.719	1.424
Calareno				beta-Cariofileno	28.66	1432.355	0.886
Aloaromadendreno				Calareno			
Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.8	1459.779	1.8	Aloaromadendreno			
Cadina-1(6),4-dieno				Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.81	1460.019	1.581
alfa-Humuleno				Cadina-1(6),4-dieno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.687	alfa-Humuleno			
Germacreno B				Germacreno B	33.56	1552.648	1.286
				Cadala-1(10),3,8-trieno	33.91	1561.473	1.541
				Germacreno B			

Sylvestris 21h setembro (1)				Sylvestris 21h setembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)	5.24	859.7169	1.024	2-Hexen-1-ol (E)	5.23	859.2879	1.543
3-Hexen-1-ol				3-Hexen-1-ol			
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	7.436	2-trans-Hexenal			
beta-Bourboneno	28	1416.478	1.784	alfa-Copaeno	26.4	1379.043	6.225
beta-Cariofileno	28.66	1432.355	2.578	beta-Bourboneno	28.02	1416.959	1.837
Calareno				beta-Cariofileno	28.68	1432.836	1.95
Aloaromadendreno				Calareno			
Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.79	1459.538	2.207	Aloaromadendreno			
Cadina-1(6),4-dieno				Murolo-4(14),5-dieno <cis->	29.82	1460.26	2.018
alfa-Humuleno				Cadina-1(6),4-dieno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	2.395	alfa-Humuleno			
Germacreno B				Germacreno B	33.58	1553.152	1.504
				Cadala-1(10),3,8-trieno	33.92	1561.725	1.683
				Germacreno B			

TABELA 26. Proposta de identificação para mês de outubro.

Lingua 9h outubro (1)				Lingua 9h outubro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	2.737	2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.25	860.1459	3.368
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	5.585	Cadina-1(6),4-dieno Aloaromadendreno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.83	1460.5	4.635
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno	31.19	1493.216	14.682	Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.22	1493.938	13.612
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	1.699	Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.57	1502.471	1.672
Germacreno B	33.56	1552.648	1.345	Germacreno B	33.58	1553.152	1.367
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.718	Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.92	1561.725	1.588

Lingua 21h outubro (1)				Lingua 21h outubro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	1.918	2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	1.84
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.8	1459.779	4.874	Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	4.589
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno	31.18	1492.976	12.501	Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno	31.2	1493.457	11.751
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.54	1501.715	2.176	Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.57	1502.471	1.883
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	2.172	Germacreno B	33.57	1552.9	1.587
				Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.92	1561.725	1.811

Sylvestris 9h outubro (1)				Sylvestris 9h outubro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.26	860.5749	0.462	2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	1.719
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.4	1379.043	4.19	alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.39	1378.814	4.272
beta-Cariofileno	28.03	1417.2	1.279	beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.251
Calareno	28.67	1432.596	1.78	Calareno	28.67	1432.596	1.323
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	1.926	Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	1.301
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.57	1502.471	2.18	Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.56	1502.219	1.172
Germacreno B	33.58	1553.152	2.647	Germacreno B	33.56	1552.648	1.033
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.92	1561.725	3.042	Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.425

Sylvestris 21h outubro (1)				Sylvestris 21h outubro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	0.428	2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	0.436
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.38	1378.585	3.852	alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.4	1379.043	4.733
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	1.344	beta-Cariofileno	28.02	1416.959	1.441
Calareno	28.66	1432.355	1.448	Calareno	28.68	1432.836	1.42
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.8	1459.779	1.485	Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biciclogermacreno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	1.505
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno alfa-Muroleno	31.51	1500.958	0.701	Cadina-1,4-dieno beta-cadineno alfa-Muroleno	31.53	1501.462	0.722
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.54	1501.715	0.897	Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.56	1502.219	0.805
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.661	Germacreno B	33.57	1552.9	1.563

TABELA 27. Proposta de identificação para mês de novembro.

Lingua 9h novembro (1)				Lingua 9h novembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol				3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.19	857.5719	0.936	2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	1.841
2-trans-Hexenal				2-trans-Hexenal			
3-Hexen-1-ol				3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	2.859	2-Hexen-1-ol (E)	5.21	858.4299	2.631
2-trans-Hexenal				2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	0.612	alfa-Copaeno	26.37	1378.355	0.469
beta-Bourboneno				beta-Cariofileno	28	1416.478	1.242
beta-Cariofileno	28	1416.478	1.113	Aloaromadendreno			
Aloaromadendreno				Cadina-1(6),4-dieno	29.8	1459.779	5.587
Cadina-1(6),4-dieno	29.81	1460.019	4.77	Bicidogermacreno			
Bicidogermacreno				alfa-Humuleno			
alfa-Humuleno				Muroleno			
Muroleno				Germacreno d	31.2	1493.457	14.325
Germacreno d	31.2	1493.457	13.638	alfa-Muroleno			
alfa-Muroleno				beta-cadineno			
beta-cadineno				Cadina-1,4-dieno	31.54	1501.715	1.219
Cadina-1,4-dieno	31.55	1501.967	1.603	beta-cadineno			
beta-cadineno				Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.058
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.558	Germacreno B			
Germacreno B							

Lingua 21h novembro (1)				Lingua 21h novembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)				3-Hexen-1-ol			
3-Hexen-1-ol	5.22	858.8589	0.763	2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	5.518
2-trans-Hexenal				2-trans-Hexenal			
Aloaromadendreno				Aloaromadendreno			
alfa-Humuleno	29.78	1459.298	5.613	Cadina-1(6),4-dieno	29.79	1459.538	4.799
Cadina-1(6),4-dieno				Bicidogermacreno			
Bicidogermacreno				alfa-Humuleno			
Muroleno				Muroleno			
Germacreno d	31.18	1492.976	15.444	Germacreno d	31.17	1492.735	13.092
alfa-Muroleno				alfa-Muroleno			
beta-cadineno				beta-cadineno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.88	1560.716	1.545	Cadala-1(10),3,8-trieno	33.89	1560.968	1.643
Germacreno B				Germacreno B			

Sylvestris 9h novembro (1)				Sylvestris 9h novembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E)				3-Hexen-1-ol			
3-Hexen-1-ol	5.22	858.8589	7.59	2-Hexen-1-ol (E)	5.2	858.0009	6.421
2-trans-Hexenal				2-trans-Hexenal			
2-Hexen-1-ol (E)	5.24	859.7169	11.99	3-Hexen-1-ol			
3-Hexen-1-ol				2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	4.471
alfa-Copaeno	26.38	1378.585	2.257	2-trans-Hexenal			
beta-Bourboneno				alfa-Copaeno	26.36	1378.126	3.895
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	0.857	beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.245
Calareno	28.65	1432.115	1.033	Calareno	28.64	1431.874	1.397
Aloaromadendreno				Aloaromadendreno			
Cadina-1(6),4-dieno	29.8	1459.779	1.166	alfa-Humuleno	29.78	1459.298	1.734
Bicidogermacreno				Cadina-1(6),4-dieno			
alfa-Humuleno				Bicidogermacreno			
Cadina-1,4-dieno	31.55	1501.967	1.399	Cadina-1,4-dieno	31.52	1501.21	1.809
beta-cadineno				beta-cadineno			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	1.951	alfa-Muroleno			
Germacreno B				Cadala-1(10),3,8-trieno	33.88	1560.716	2.121
				Germacreno B			

Sylvestris 21h novembro (1)				Sylvestris 21h novembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area	Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol				3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.19	857.5719	3.866	2-Hexen-1-ol (E)	5.19	857.5719	7.091
2-trans-Hexenal				2-trans-Hexenal			
3-Hexen-1-ol				3-Hexen-1-ol			
2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	6.172	2-Hexen-1-ol (E)	5.22	858.8589	7.792
2-trans-Hexenal				2-trans-Hexenal			
alfa-Copaeno	26.39	1378.814	3.281	alfa-Copaeno	26.36	1378.126	3.879
beta-Bourboneno				beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.194
beta-Cariofileno	28.01	1416.719	2.004	Aloaromadendreno			
Aloaromadendreno				alfa-Humuleno	29.78	1459.298	1.777
Cadina-1(6),4-dieno	29.81	1460.019	2.243	Cadina-1(6),4-dieno			
Bicidogermacreno				Bicidogermacreno			
alfa-Humuleno				Cadala-1(10),3,8-trieno	33.88	1560.716	2.059
Germacreno B	33.56	1552.648	1.741	Germacreno B			
Cadala-1(10),3,8-trieno	33.9	1561.22	2				
Germacreno B							

TABELA 28. Proposta de identificação para mês de dezembro.

Lingua 9h dezembro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	2.147
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.82	1460.26	5.34
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.21	1493.697	13.987

Lingua 9h dezembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	2.157
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.8	1459.779	6.107
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno	31.18	1492.976	16.161

Lingua 21h dezembro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal	5.23	859.2879	0.567
2-Hexen-1-ol (E) 3-Hexen-1-ol	5.24	859.7169	1.042
Cadina-1(6),4-dieno Aloaromadendreno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.83	1460.5	6.681
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.22	1493.938	17.073
Germacreno B	33.57	1552.9	1.125
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.257

Lingua 21h dezembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	1.444
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.21	858.4299	1.712
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.81	1460.019	5.299
Muroleno Germacreno d alfa-Muroleno beta-cadineno Cadina-1,4-dieno	31.21	1493.697	14.121
Germacreno B	33.56	1552.648	0.925
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.91	1561.473	1.101

Sylvestris 9h dezembro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	12.99
alfa-Copaeno beta-Bourboneno beta-Cariofileno	26.38	1378.585	4.195
Calareno	28.01	1416.719	1.564
Calareno	28.66	1432.355	1.478
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.8	1459.779	1.481
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno	31.55	1501.967	1.399
Germacreno B	33.56	1552.648	1.006
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.9	1561.22	1.738

Sylvestris 9h dezembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.19	857.5719	17.744
Heptan-2-ol	6.35	904.9237	0.381
alfa-Copaeno	26.37	1378.355	4.581
beta-Cariofileno	27.99	1416.238	1.652
Calareno	28.64	1431.874	1.496
Aloaromadendreno Cadina-1(6),4-dieno Biclogermacreno alfa-Humuleno	29.79	1459.538	1.903
Cadina-1,4-dieno beta-cadineno alfa-Muroleno	31.53	1501.462	1.386
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.88	1560.716	1.49

Sylvestris 21h dezembro (1)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal 2-Hexen-1-ol (E)	5.18	857.1429	2.853
3-Hexen-1-ol 2-trans-Hexenal 2-Hexen-1-ol (E)	5.21	858.4299	3.265
alfa-Copaeno	26.36	1378.126	7.972
Germacreno B Cadala-1(10),3,8-trieno	33.87	1560.464	2.833

Sylvestris 21h dezembro (2)			
Compostos	Tempo [Min]	IR	Area
3-Hexen-1-ol 2-Hexen-1-ol (E) 2-trans-Hexenal	5.2	858.0009	6.223
alfa-Copaeno beta-Bourboneno	26.38	1378.585	5.837
Cadala-1(10),3,8-trieno Germacreno B	33.89	1560.968	2.484

APÊNDICE B

Neste apêndice encontram-se os gráficos de cada substância identificada, nos quais comparou-se a média das áreas dos picos de cada composto para os dias 1 e 2 de coleta para todos os meses de coleta e os horários analisados. Nos meses de floração (maio, junho e julho) foram monitorados quatro horários de coleta (9h, 15h, 21h e 03h), para o restante dos meses foram monitoradas as amostras referentes às coletas das 9h e 21h.

Para a confecção dos gráficos contidos neste apêndice, utilizou-se a maior área do pico encontrado para aquela substância. Por exemplo, para a variedade *Lingua*, coleta das 9h, do dia 1 do mês de janeiro, os picos cujos tempos de retenção foram 5.2 e 5.21 minutos tiveram a mesma proposta de identificação (tabela 1, apêndice A), porém o pico com maior área, ou seja, 1,637%, foi o utilizado como dado para o gráfico.

FIGURA 19. Substâncias identificadas
(continuação)

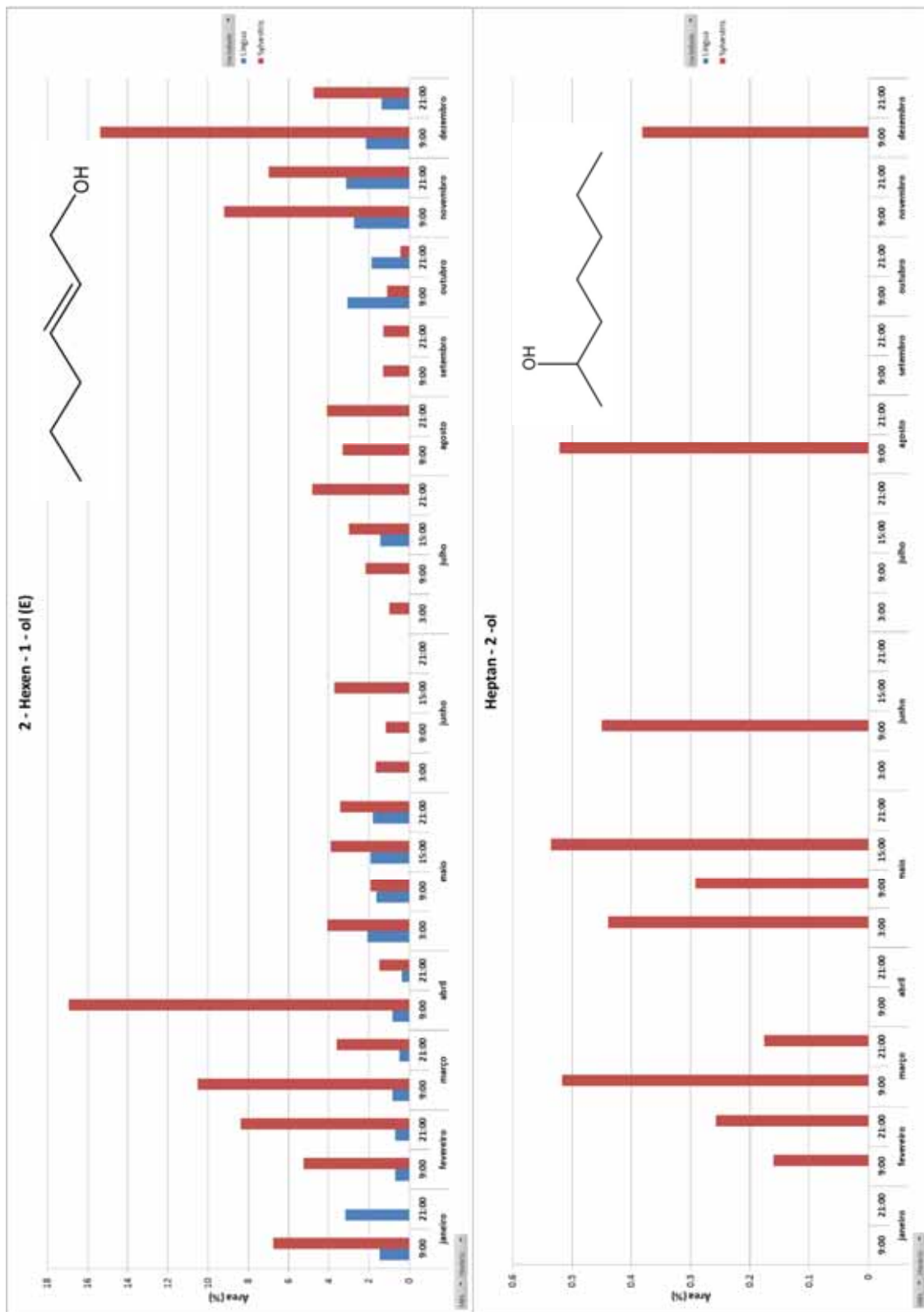


FIGURA 19. Substâncias identificadas (continuação)

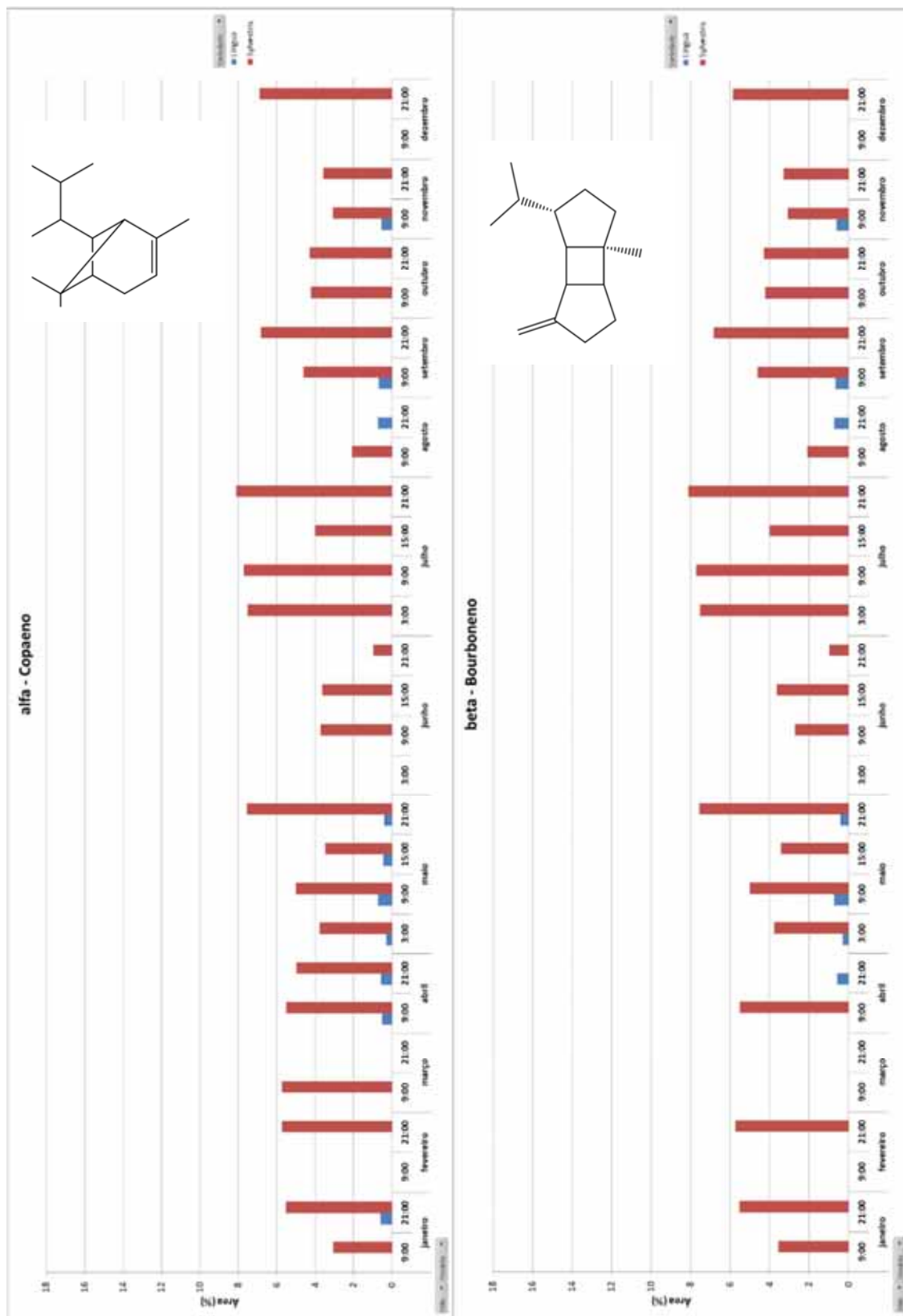


FIGURA 19. Substâncias identificadas
(continuação)

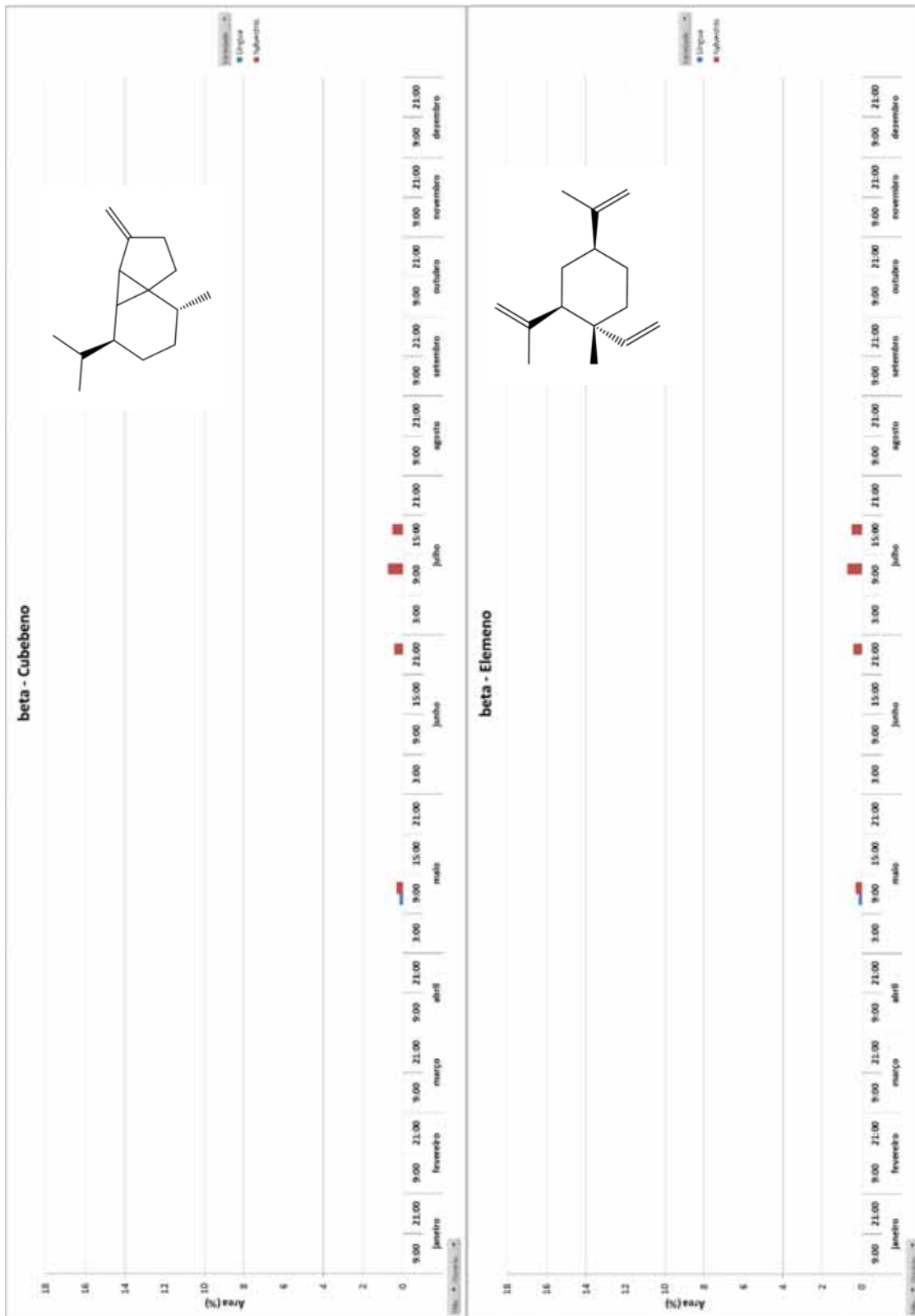


FIGURA 19. Substâncias identificadas
(continuação)

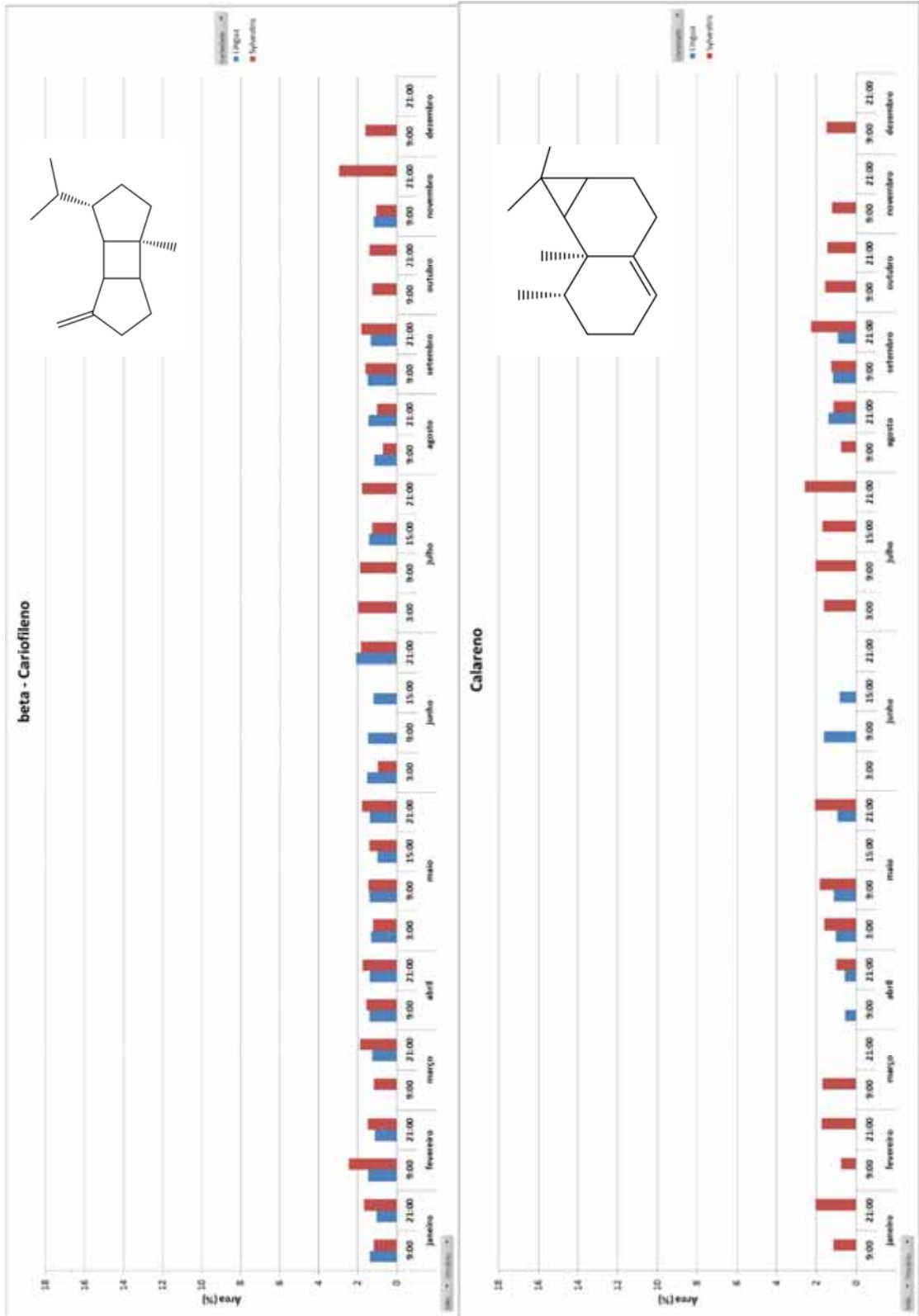


FIGURA 19. Substâncias identificadas
(continuação)

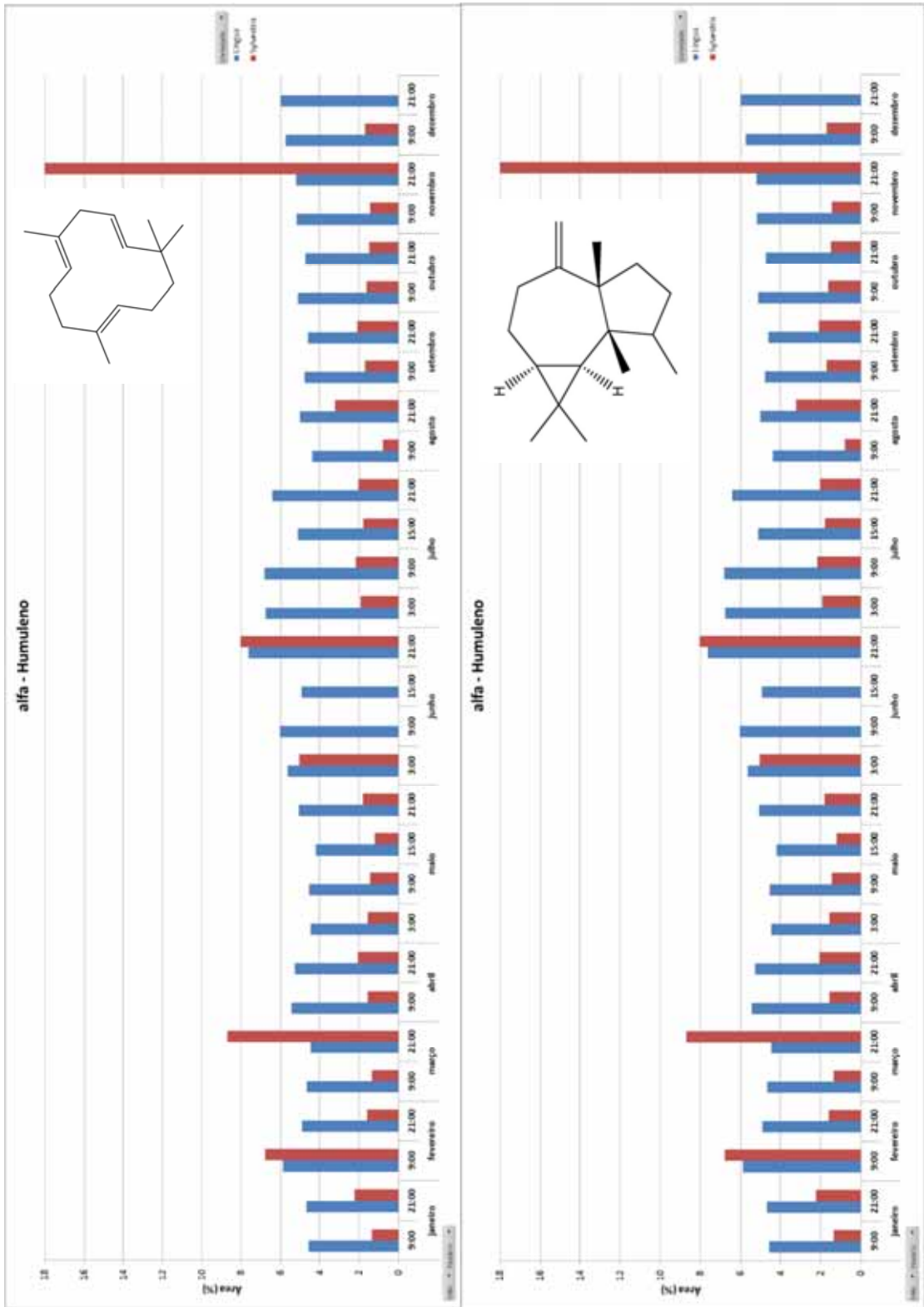


FIGURA 19. Substâncias identificadas
(continuação)

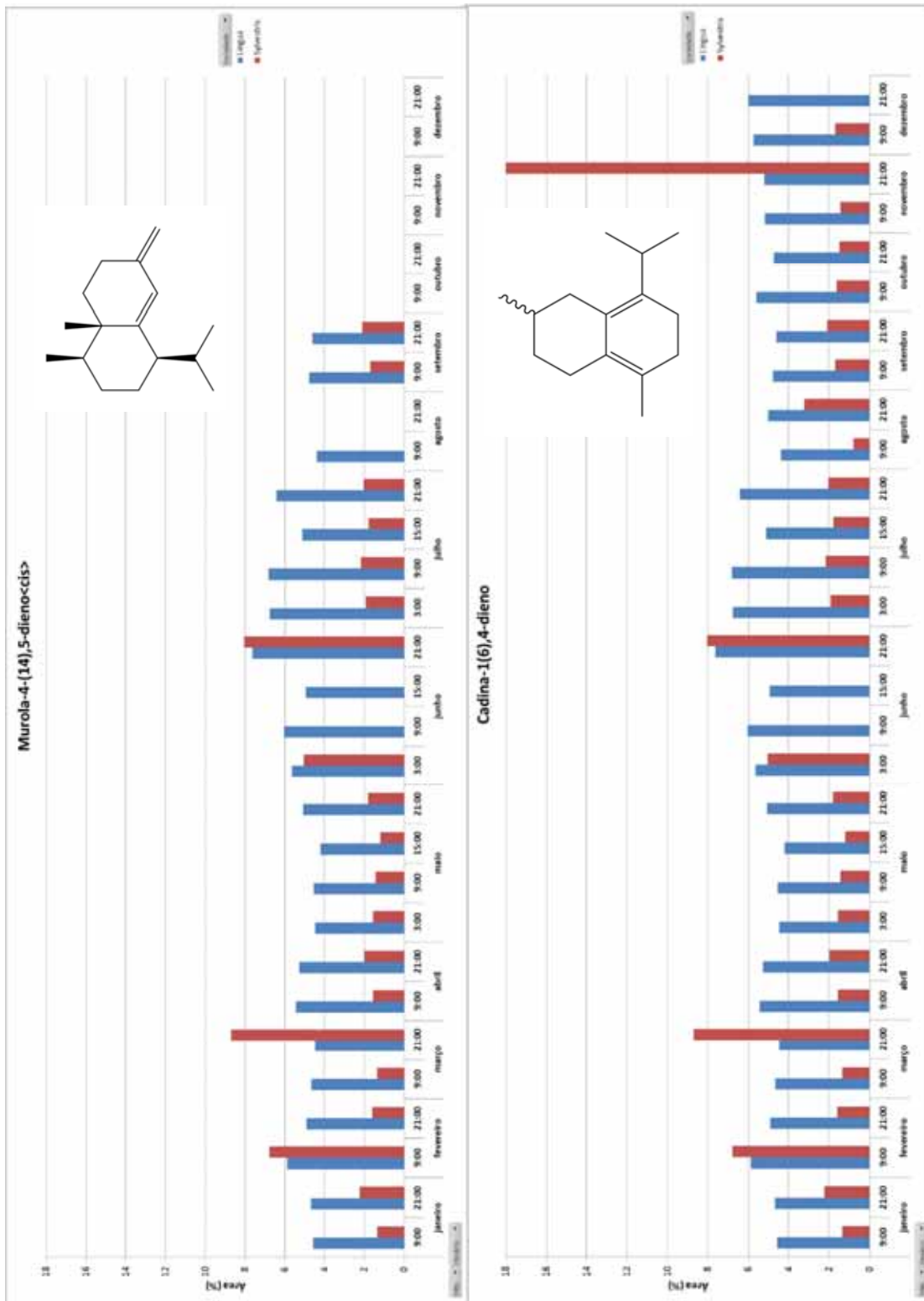


FIGURA 19. Substâncias identificadas (continuação)

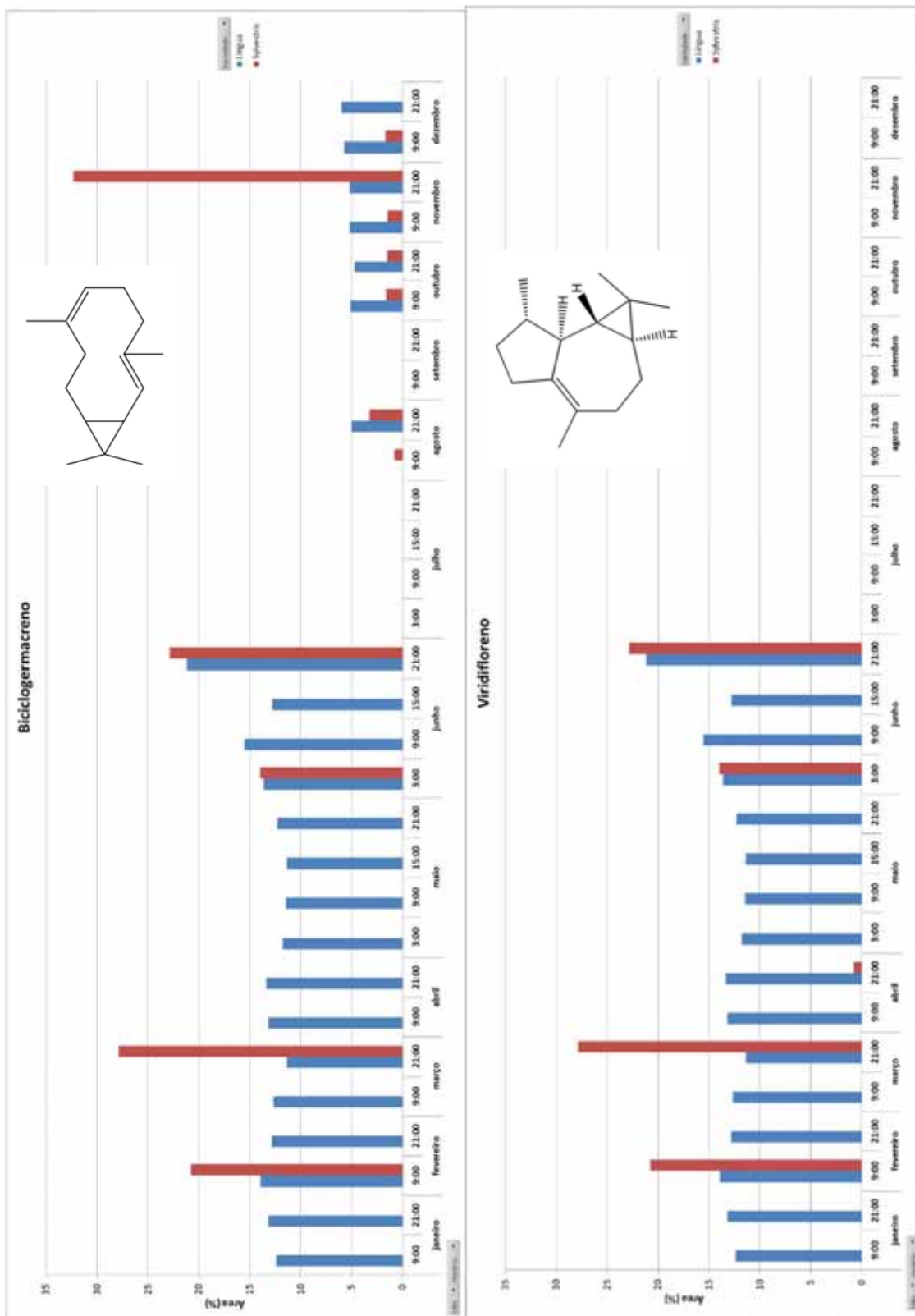


FIGURA 19. Substâncias identificadas (continuação)

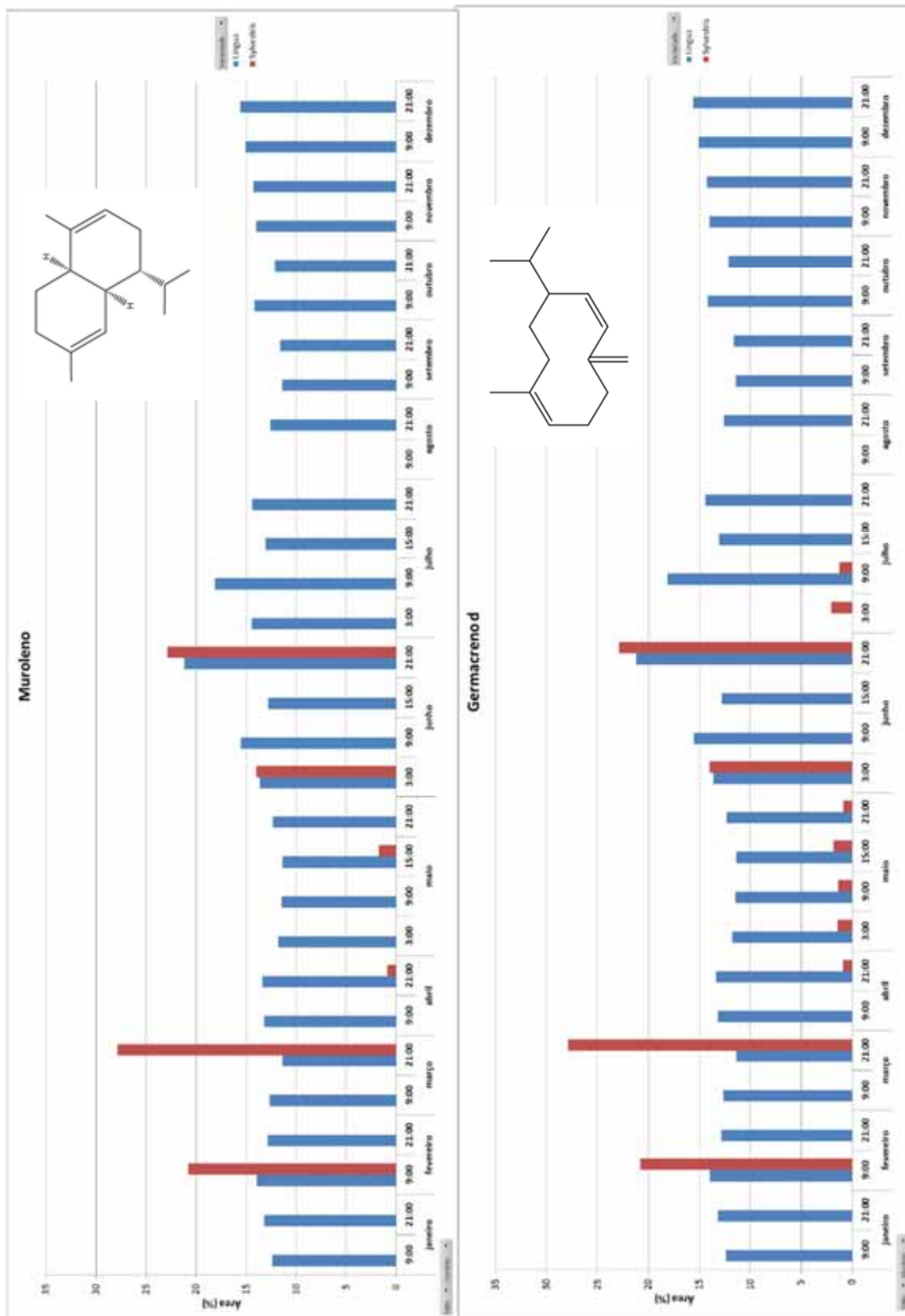


FIGURA 19. Substâncias identificadas (continuação)

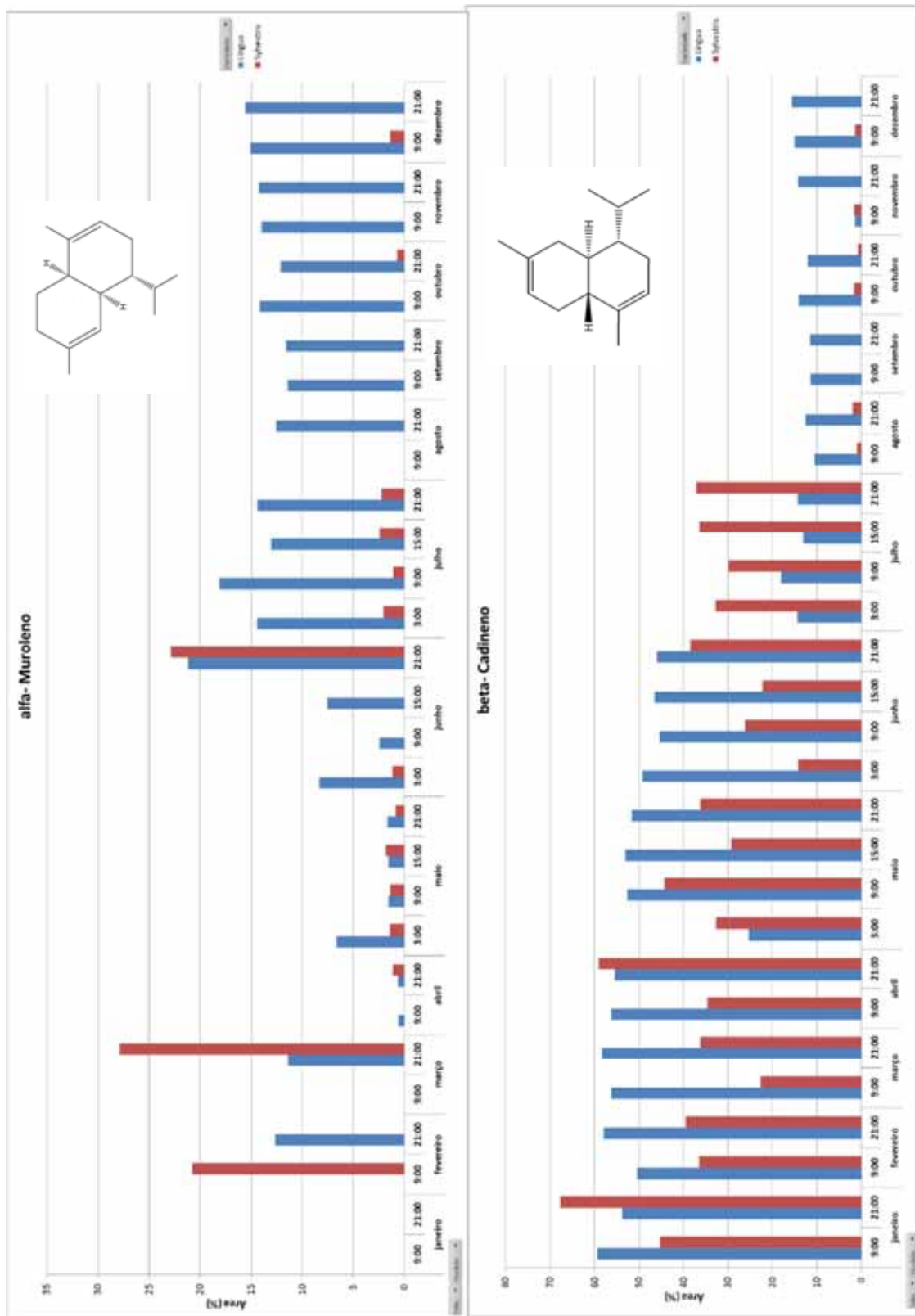


FIGURA 19. Substâncias identificadas
(continuação)

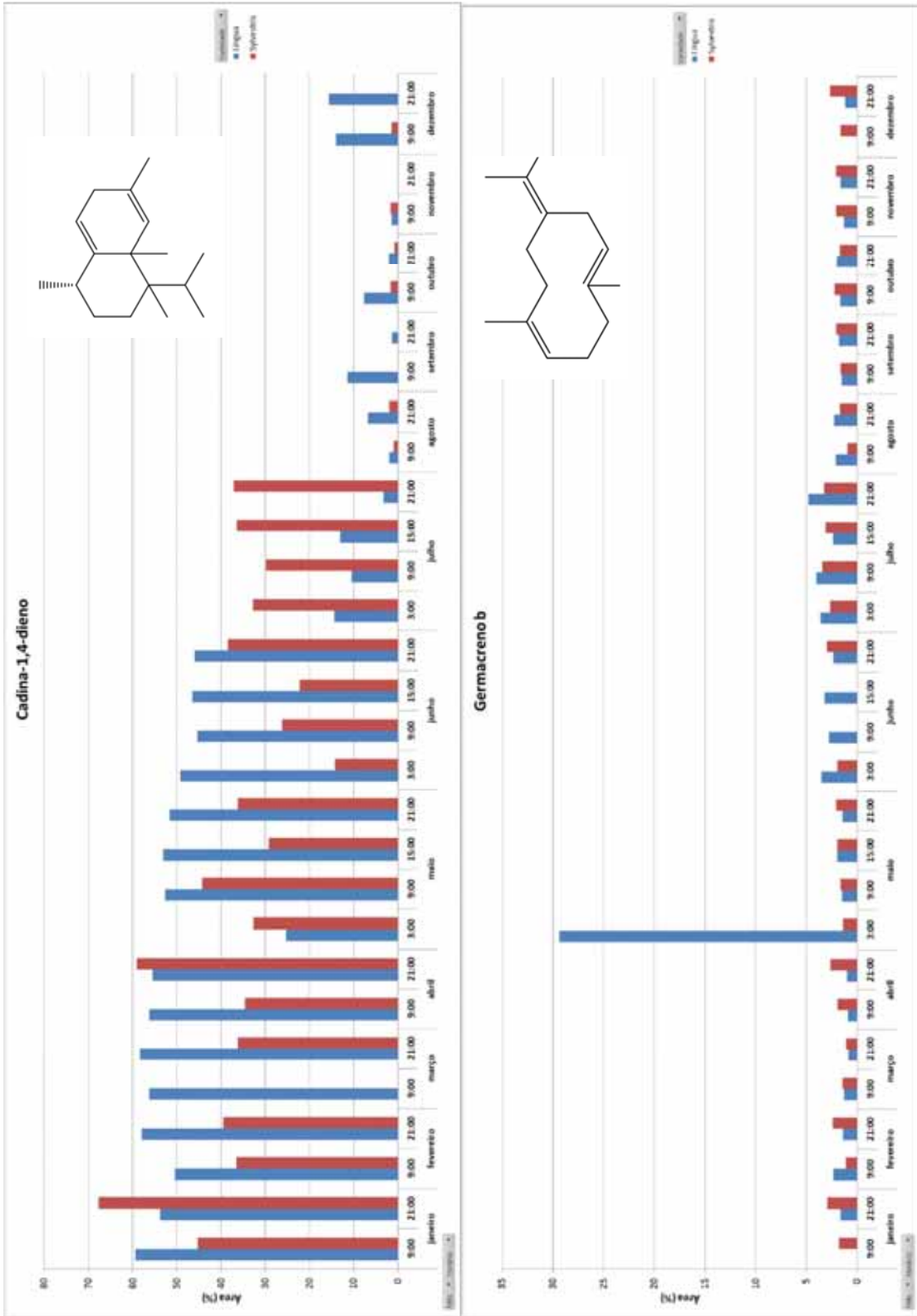
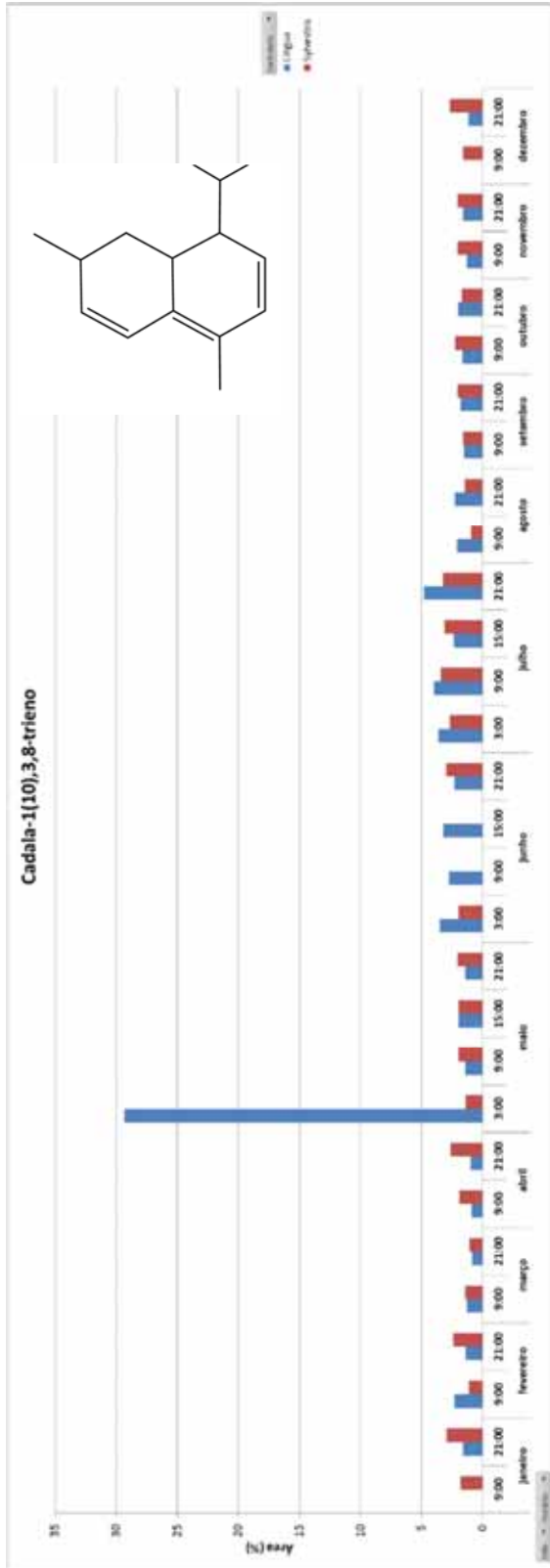
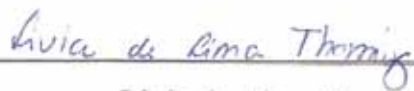


FIGURA 19. Substâncias identificadas
(conclusão)



Araraquara, 07 de outubro de 2014.

De acordo,



Livia de Lima Thomaz



Alberto José Cavaleiro