

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ESPÉCIES DE *NECTANDRA* E *STEVIA REBAUDIANA***

ELZA DE OLIVEIRA FERRAZ

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp-
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Agronomia
(Horticultura).

BOTUCATU-SP

Maio - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ESPÉCIES DE *NECTANDRA* E *STEVIA REBAUDIANA***

ELZA DE OLIVEIRA FERRAZ

Orientadora: Prof. Dra Giuseppina Pace Pereira Lima

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp-
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Agronomia
(Horticultura).

BOTUCATU-SP

Maio – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F381c Ferras, Elsa de Oliveira, 1985-
Composição química e atividade biológica de espécies de Nectandra e Stevia rebaudiana / Elsa de Oliveira Ferras. - Botucatu : [s.n.], 2015
ix, 66 f. : ils. color., grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015
Orientador: Giuseppina Pace Pereira Lima
Inclui bibliografia

1. Nectandra. 2. Stevia rebaudiana. 3. Compostos orgânicos voláteis. 4. Antioxidantes. I. Lima, Giuseppina Pace Pereira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ESPÉCIES DE *Nectandra* e *Stevia rebaudiana*"

AUTORA: ELZA DE OLIVEIRA FERRAZ

ORIENTADORA: Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA
(HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. PAOLO SAMBO

Università Degli studi di Padova - Itália

Profa. Dra. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos / Instituto Agrônomo de
Campinas

Profa. Dra. CAMILA RENATA CORREA CAMACHO

UNIPEX - Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Prof. Dr. JAY FERNANDES JUNIOR

Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Data da realização: 13 de maio de 2015.

À minha família

Pelo amor incondicional, força e apoio

OFEREÇO

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por abrir portas para a realização de sonhos e oportunidades de progresso intelectual.

Em segundo lugar, à minha família, que me proporcionou força para enfrentar todos os obstáculos da escalada me transferindo esperança, coragem e amor para que conseguisse chegar ao final.

À minha orientadora e amiga Professora Giuseppina Pace Pereira Lima, por ajudar-me a descobrir os melhores caminhos dentro da minha pesquisa, pela atenção e paciência desprendida, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis, e por acreditar nas minhas capacidades me encorajando quando precisava. Uma pessoa que sempre estará em meu coração.

Ao meu orientador durante o estágio de doutorado sanduíche, Prof. Dr. Paolo Sambo, pela oportunidade, apoio e disponibilidade durante o tempo de aprendizado na Itália.

Ao Professor Dr. Paolo Zanini, pela assessoria durante à realização da pesquisa na Itália.

À pesquisadora Dra. Márcia Ortiz, por sempre me receber com um sorriso no rosto, pelo auxílio nos experimentos e por aconselhar-me a encontrar direções mais adequadas a seguir dentro da pesquisa.

Ao Professor Dr. Ary Fernandes e suas orientadas, em especial Mariana e Fernanda, pela disponibilidade e assistência durante a montagem dos experimentos.

Ao Professor Dr. Lin Chau Ming pela grande ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos que encontrei durante estes quatro anos de Botucatu, pelos bate-papos, conselhos e pelas risadas que ajudam a levar a vida com mais leveza e alegria.

Aos amigos que fiz na Itália, principalmente à Iudita e Carlo pela paciência, compreensão e amizade construídas durante os nove meses.

À Professora Dra. Camila Camacho pelas contribuições com este trabalho, fazendo parte da banca examinadora.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Horticultura, pelos ensinamentos e apoio em todas as horas e pela amizade.

Ao Professor de graduação, Ernane Ronie Martins, que me apresentou a o encanto de se pesquisar as plantas medicinais e ao meu amigo de graduação e agora Professor Filipe Giardini pela amizade e consideração oferecidas.

Às minhas amigas que mesmo distantes participam da minha vida, me ouvindo, aconselhando e torcendo pelas minhas conquistas, Priscila, Bibian, Clarissa e Marcela, amo vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

A todos que de alguma maneira contribuíram para esta conquista.

Grata!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
1.RESUMO	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1 A Família lauraceae	7
4.1.1 Histórico e importância das Lauráceas	7
2.1.1 Gênero Nectandra e suas aplicações.....	10
4.2 <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni.....	13
4.2.1 Características da espécie <i>S. rebaudiana</i> Bertoni.....	13
4.2.2 Os glicosídeos.....	14
3 REFERENCIAS	16
CAPÍTULO 1: Antioxidantes e teor de óleo essencial em três espécies brasileiras de Nectandra (Lauraceae) influenciadas pela sazonalidade.....	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1 Caracterização do local e material vegetal.....	23
2.2 Produtos químicos e equipamentos utilizados.....	23
2.3 Análises Bioquímicas.....	24
2.3.1 Teor de Fenóis Totais.....	24
2.3.2 Flavonóides Totais.....	24
2.3.4. Atividade antioxidante pelo método pelo DPPH.....	24
2.3.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.....	25
2.3.6 Extração do óleo essencial.....	25
2.4 Análise estatística.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1 Flavonoides.....	26
3.2 Atividade antioxidante e fenóis totais.....	28
3.3 Método DppH.....	29
3.4 Frap.....	31
4. CONCLUSÃO.....	32
5. REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 2 Rendimento, composição química e atividade microbiológica de óleos essenciais de espécies de lauráceas influenciadas pela sazonalidade.....	34
RESUMO.....	34

ABSTRACT.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Caracterização do local e material vegetal.....	36
2.2 Extração e análise do óleo essencial	37
2.2.1 Extração do óleo essencial.....	37
2.2.2. Análise dos óleos essenciais.....	37
2.3 Atividade antimicrobiana pelo método de concentração inibitória mínima (CIM)	38
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Rendimento e composição dos óleos essenciais.....	39
5.2 Composição química dos óleos essenciais.....	40
5.3 Atividade antimicrobiana pelo método de concentração inibitória mínima (CIM)	46
6. CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO 3: Efeito das doses de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento e na qualidade de Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) cultivados em vasos.....	52
Resumo.....	52
Abstract.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Os tratamentos experimentais.....	55
2.2 A identificação e quantificação dos glicosídeos de esteviol.....	56
2.3 Determinação dos macronutrientes.....	56
3. A ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Crescimento das plantas.....	57
4.2 Teor e absorção de nutrientes.....	59
4.3 Conteúdo de glicosídeos.....	60
5. CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa com a distribuição mundial.....	8
Capítulo 1 Antioxidantes e teor de óleo essencial em três espécies brasileiras de <i>Nectandra</i> (Lauraceae) influenciadas pela sazonalidade.....	21
Figura 1 – Diferentes efeitos da sazonalidade em teores de flavonoides em folhas (A) e casca (B) de espécies de <i>Nectandra</i>	27
Figura 2 -2 Efeito das diferentes estações do ano na atividade antioxidante pelo método DPPH em folhas (A) e casca (B) de três espécies de <i>Nectandra</i>	30
Figura 3 – Efeito das diferentes estações do ano na atividade antioxidante pelo método FRAP em folhas (A) e casca (B) de três espécies de <i>Nectandra</i>	31
Capítulo 2- Rendimento, composição química e atividade microbiológica de óleos essenciais de espécies de lauráceas influenciadas pela sazonalidade	34
Figura 1 - Rendimento de óleo essencial (%) de espécies de lauráceas do gênero <i>Nectandra</i> em função com sazonalidade.....	40
Figura 2- . Composição química dos óleos essenciais de todos os indivíduos de três espécies de <i>Nectandra</i> coletados em função da sazonalidade.....	45

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 Antioxidantes e teor de óleo essencial em três espécies brasileiras de <i>Nectandra</i> (Lauraceae) influenciadas pela sazonalidade.....	21
Tabela 1 - Conteúdo de flavonoides nas folhas e cascas do gênero <i>Nectandra</i> em diferentes estações.....	26
Tabela 2 -. Conteúdo de fenóis, atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP e teor de óleo essencial em folhas do gênero <i>Nectandra</i>	28
Tabela 3 -3 Conteúdo de fenóis e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e da FRAP em casca de três espécies <i>Nectandra</i>	29
Capítulo 2 Rendimento, composição química e atividade microbiológica de óleos essenciais de espécies de lauráceas influenciadas pela sazonalidade	34
Tabela 1 - Composição química média (%) dos óleos essenciais das espécies de <i>Nectandra</i> em função da sazonalidade (1. Inverno/2012; 2. Primavera/2012; 3. Verão/2013 e 4. Outono/2013).....	43
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes óleos essenciais de Lauráceas em função com a sazonalidade frente à cepa de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Capítulo 3 Efeito das doses de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento e na qualidade de <i>Stevia</i> (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) cultivados em vasos	52
Tabela 1 Produtividade folhas e caules, teor de nutrientes nos <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni sob diferentes doses de adubação na primeira colheita.....	62
Tabela 2 - Produtividade folhas e caules, teor de nutrientes nos <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni sob diferentes doses de adubação na segunda colheita.....	63
Tabela 3 - Percentual em teor de matéria seca e esteviosídeo e rebaudiosídeo em <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni cultivadas em vasos sob diferentes doses de fertilizante mineral na primeira colheita.....	64
Tabela 4 - Percentual em teor de matéria seca e esteviosídeo e rebaudiosídeo em <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni cultivadas em vasos sob diferentes doses de fertilizante mineral na segunda colheita.....	65

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *Nectandra* E *Stevia rebaudiana*

Botucatu, 2014. 77p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista .

Autor: ELZA DE OLIVEIRA FERRAZ

Orientador: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

1. RESUMO

Com o aumento no interesse por produtos naturais o estudo de plantas medicinais nativas tornou-se relevante quanto aos componentes fitoquímicos e as atividades biológicas desconhecidas, em contraste com plantas nativas da Europa, que já foram exaustivamente estudadas. O presente estudo foi dividido em três artigos, a temática dos dois primeiros artigos foi a caracterização bioquímica de espécies nativas do gênero *Nectandra*. Durante um ano foram realizadas coletas, no meio de cada estação do ano, de folhas e cascas das espécies *Nectandra lanceolata*, *Nectandra grandiflora* e *Nectandra megapotânica*, na Fazenda experimental Edgárdia e Fazenda Lageado pertencentes ao Campus Botucatu – Unesp, situadas no município de Botucatu, São Paulo. O primeiro artigo objetivou avaliar a efeito da sazonalidade nos teores de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em folhas e cascas de *Nectandras*. Os resultados evidenciaram que a época de coleta influenciou a presença de compostos fenólicos nas espécies nas diferentes partes da planta, dando-se um maior destaque para a espécie *N. megapotânica*. Assim como, para a atividade antioxidante, cuja espécie em evidência foi *N. lanceolata*. O segundo artigo avaliou a influência da sazonalidade no teor, caracterização química e atividade antimicrobiana frente à cepas de *Escherichia coli* sp. e *Staphylococcus aureus* sp. Os resultados deste estudo mostraram que as espécies *N. grandiflora* e *N. lanceolata* apresentaram muita semelhança em seus compostos voláteis durante o ano, diferentemente da *N. megapotânica*. As espécies *N. megapotânica* e *N. lanceolata* se mostraram promissoras quanto à atividade antibacteriana. O terceiro artigo, realizado durante o estágio de Doutorado Sanduiche em Padova, visou avaliar o efeito das diferentes doses de macronutrientes (NPK) no

rendimento e qualidade de *Stevia rebaudiana* Berth. O experimento foi conduzido durante a estação de verão na Itália em ambiente protegido, com esquema fatorial split-plot de 3 x 3 x 3. A dosagem mais adequada que relaciona a produtividade da espécie e o teor de glicosídeos de esteviol foi a N 0.25g/L P 0.5g/planta e K 1.5g/planta.

Palavras-chave: Época de coleta, compostos voláteis, atividade antioxidante, estevia.

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF SPECIES

Nectandra AND *Stevia rebaudiana*

Botucatu, 2014. 77p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista .

Author: ELZA DE OLIVEIRA FERRAZ

Adviser: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

2. SUMMARY

The growing of the interest in natural products, the study about native medicinal plants has been relevant as the phytochemical constituents and biological activities, in contrast to Europe plants, which have been extensively studied. This study was divided into three articles, the theme of the first two articles was the biochemical characterization of native species of *Nectandra* genre. For a year have been collected, in the middle of each season, leaves and bark of the species *Nectandra lanceolata*, *Nectandra grandiflora* and *Nectandra megapotâmica* in the Edgardia Farm and Lageado Farm belonging to the Campus Botucatu - UNESP, located in Botucatu, Sao Paulo. The first article aimed to evaluate the effect of seasonality in phenolic content and antioxidant activity in leaves and bark of *Nectandras*. The results showed that the sampling time influenced the presence of phenolic compounds in the species in different parts of the plant, giving greater prominence to the species *N. megapotamica*. As for the antioxidant activity whose species was evidence *N. lanceolata*. The second article assessed the influence of seasonality in content, chemical and antimicrobial activity of strains of *Escherichia coli* sp. and *Staphylococcus aureus* sp. The results of this study showed that species *N. grandiflora* and *N. lanceolata* showed a lot of similarity in their volatile compounds during the year, differently of *N. megapotamica*. The species *N. megapotamica* and *N. lanceolata* proved promising on the antibacterial activity. The third article, accomplished during Sanduiche Doctoral stage in Padova, aimed to evaluate the effect of different doses of macronutrients (NPK) on the yield and quality of *Stevia rebaudiana* Berth. The experiment was conducted during the summer season in Italy in greenhouse, with a factorial split-plot 3 x 3 x 3. The most appropriate

dose that relates the productivity of the species and the steviol glycosides content was 0.25g/L N, 0.5g/plant and K 1.5g/plant.

Keywords: Collection epoch, volatile compounds , antioxidant activity, stevia.

3. INTRODUÇÃO

Atualmente, está fundamentado nas pesquisas científicas que a produção de metabólitos secundários representa uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais, tornando-se relevante associar as condições intrínsecas e extrínsecas mais apropriadas com o maior teor de princípios ativos de interesse nas espécies medicinais.

Uma diversidade de espécies medicinais e aromáticas contém compostos químicos que apresentam propriedades biológicas, como a atividade antioxidante e antimicrobiana. Pesquisas estão sendo desenvolvidas com intuito de descobrir novos antioxidantes naturais para a futura aplicação em formulações de alimentos, de produtos cosméticos e farmacêuticos. Outra linha de pesquisas com extratos e óleos essenciais visa uma possível aplicação racional de princípios ativos no tratamento de doenças (NASCIMENTO et al., 2000). No entanto, a informação científica sobre as propriedades biológicas de várias plantas, particularmente aquelas que são menos utilizadas na culinária ou na medicina, como é o caso de algumas espécies florestais, ainda é bastante escassa, abrindo uma lacuna para o desenvolvimento de tais produtos.

Deste modo, devido ao contemporâneo interesse por investigações de novas substâncias naturais provindas de espécies inexploradas, permite-se o aprofundamento de estudos que viabilizem uma exploração de metabólitos secundários benéficos ao ser humano de uma maneira sustentável e consciente.

A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni. é nativa da América do Sul, na região fronteira entre Brasil e Paraguai. Sua utilização remete aos costumes indígenas por ser fonte de glicosídeos diterpênicos derivados de esteviol que possuem alto poder adoçante. Devido à abertura no comércio desta espécie no mercado europeu, desperta a necessidade de estudos agrônômicos que respaldam o seu cultivo e sua produtividade. Assim, o presente estudo vem à colaborar com uma parte das informações ainda incipientes na região do norte da Itália.

A Tese foi dividida em três capítulos, o primeiro intitulado “Atividade antioxidantes em três espécies brasileiras de *Nectandra* (Lauraceae) influenciadas pela sazonalidade” foi formatado de acordo com as normas da Revista Industrial Crops and Products, o segundo cujo o título é “Sazonalidade: Influência sobre o rendimento, composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de lauráceas” foi formatado de acordo com as normas da Revista Natural Product Research e o terceiro capítulo, desenvolvido durante o estágio de doutorado sanduiche, intitula-se “Efeito das doses de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento e na qualidade de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) cultivados em vasos” foi adequado às normas da Revista Industrial Crops and Products.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A Família Lauraceae

4.1.1. Histórico e importância das Lauráceas

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à civilização humana. Por muito tempo, produtos manipulados à base de minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas utilizadas pelos seres humanos. A busca por alívio e cura de enfermidades empregando-se as plantas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos de recursos naturais na medicina que foram utilizados no controle de pragas e em mecanismos de defesa.

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais, os quais determinaram as várias disputas de posse da nova terra e, por fim, a colonização portuguesa. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e interação ambiente-planta. Assim sendo, a natureza forneceu muitos modelos moleculares que inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (VIEGAS JUNIOR, 2006).

As Lauráceas formam uma grande família de árvores e arbustos, predominantemente tropicais, com a exceção de *Cassytha*, popularmente conhecida

como cipó-chumbo, uma herbácea parasita. A família está mais representada nos trópicos americanos e asiáticos, tendo também um grande número de espécies na Austrália e Madagascar, mas é pobremente representada na África (Figura 1). Atualmente são reconhecidos por volta de 50 gêneros e o número estimado está entre 2.500 - 3.000 espécies (MORAES, 2005; WERFF; RICHTER, 1996).

Na região neotropical ocorrem 30 gêneros da família Lauraceae, sendo que, no Brasil identificaram-se 22 gêneros. Destes, apenas 16 estão representados nos atuais remanescentes da Mata Atlântica brasileira: *Aiouea*, *Aniba*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Licaria*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Persea*, *Phyllostemonodaphne*, *Rhodostemonodaphne*, *Urbanodendron* e *Williamodendron*. Apenas o gênero monotípico *Phyllostemonodaphne* é exclusivo do bioma. Sua ocorrência é restrita à floresta pluvial atlântica da região sudeste. Dentro dos gêneros estão espécies com ocorrência igualmente restrita, constituindo-se em exemplos de endemismos, restritos ou não. Entre estes podemos citar *Mezilaurus navalium* Taubert ex Mez, única espécie do gênero da floresta pluvial atlântica do sudeste, muito explorada para a construção naval, pois produz madeira de alta densidade e durabilidade (BAITELLO, 2014).

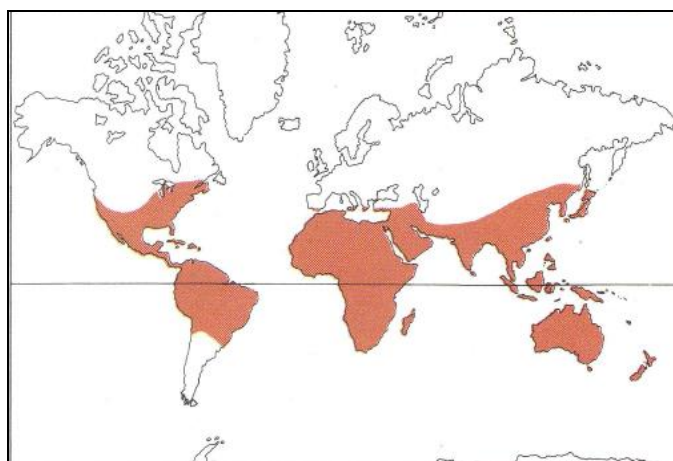


Figura 1- Mapa com a distribuição mundial

Do ponto de vista econômico, formam um importante grupo, pois muitas espécies são produtoras de madeira de alta qualidade e frutos comestíveis, sintetizam metabólitos secundários que são usados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Somando-se à importância econômica, as lauráceas neotropicais, incluindo as brasileiras, são também ecologicamente importantes (BAITELLO, 2001).

As espécies aromáticas pertencentes à família Lauraceae estão entre as mais utilizadas por essas indústrias. *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. e

Lindera benzoin (L.) Blume são reconhecidas como algumas das principais espécies produtoras de óleos essenciais da família. A espécie *C. camphora* (L.) Presl., popularmente conhecida como cânfora, é conhecida desde a Grécia antiga. Possui utilização na indústria de perfumaria e medicamentos, devido ao odor agradável produzido pelo linalol. Da espécie *L. benzoin* (L.) Blume, se extrai o óleo de benjoin (COE-TEIXEIRA, 1980). As espécies do gênero *Aniba* Aubl. destacam-se pelo alto valor econômico, devido a constituição do óleo essencial encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca.

Dentre as espécies mais famosas podemos citar *Aniba rosaeodora* Ducke, espécie nativa da Região da Amazônica. O óleo essencial desta é caracterizado pelo alto teor de linalol, substância química muito utilizada na indústria cosmética, em especial na área de perfumaria. Esta espécie, até a década de 1950, representou grande parcela na balança comercial da Amazônia através da exportação do seu óleo essencial. Porém, a intensa exploração do pau-rosa nas matas naturais, aliada à falta de uma política de reposição contribuiu fortemente para que esta espécie tivesse seus recursos genéticos empobrecidos (MARQUES, 2001; OHASHI et al., 2004).

O gênero *Laurus*, considerado bastante representativo para a família, é composto somente por duas espécies nativas da Região Mediterrânea: o *Laurus azorica* (Seub.) ranco e o *Laurus nobilis* L. As folhas de *Laurus nobilis* L., o loureiro, eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos, e estão entre os condimentos conhecidos da culinária de todo o mundo. As folhas são utilizadas como aromatizante na indústria alimentícia devido à presença de óleos essenciais. Além disso, o extrato aquoso na medicina popular turca é considerado anti-inflamatório, antisséptico, digestivo, diurético e como antídoto contra picada de cobra. Estas atividades biológicas são atribuídas devido à presença de flavonóides, lactonas e alcaloides (MUNIZ-MÁRQUEZ et al., 2013).

As espécies do gênero *Cinnamomum* são conhecidas pela grande produção de óleo essencial e o valor comercial dos óleos depende da espécie e da parte da planta utilizada. Os óleos essenciais mais importantes no mercado mundial são os obtidos de *Cinnamomum verum* J. Presl, popularmente conhecida como “canela condimento”, *Cinnamomum cássia* (L.) J. Presl, “canela cheirosa”, *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl, “cânfora” e *Cinnamomum zeylanicum* Blume, “canela-da-índia” e “canela-do-ceilão”. Este gênero é originário de algumas regiões da Ásia, como a Índia

e o Ceilão. As partes internas da casca do tronco e dos ramos constituem a canela do comércio, com vasto uso mundial na perfumaria e na culinária, devido suas propriedades aromáticas e condimentares além de ser, popularmente, utilizada como estimulante, tônica, carminativa e antiespasmódica. A canela e o seu óleo essencial são empregados como corretivos do odor e do sabor na preparação de alguns medicamentos (PIO CORRÊA, 1984; COSTA, 2002; LIMA et al., 2005).

No Brasil, destacam-se especialmente as espécies de *Ocotea* e de *Nectandra*, conhecidas popularmente como canelas, loureiros ou embuias, que remontam ao começo da colonização, quando foram exploradas para o emprego na construção naval e movelaria de luxo (CANTE, 1988; QUINET; ANDREATA, 2002). O gênero *Ocotea* destaca-se pelo maior número de espécies que são empregadas como medicinais, sendo utilizadas contra cefaleias, reumatismo, intoxicações metálicas, sífilis, dermatoses, problemas no trato urinário, como tônicas, estomáquicas, diuréticas, etc. (ZSCHOCKE et al., 2000a; 2000b; MARQUES, 2001; BACKES; IRGANG, 2009). A *Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher, conhecida como canela-sassafrás, é uma das espécies nativas mais populares, distribuindo-se nos domínios da Mata Atlântica, do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul. É considerada uma espécie importante no processo de recuperação de matas ciliares, além de possuir destaque por sua composição fitoquímica, pela síntese de flavonóides, polipropanóides, esteróides, sesquiterpenos e óleos essenciais (CARVALHO 1994). Um dos principais componentes do seu OE, o safrol, foi o motivo pelo qual milhares de indivíduos de canela-sassafrás foram sacrificados nas matas do sul do País até a década de 1990, levando a espécie a ser incluída na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (CARMO et al., 2007).

4.1.2 Gênero *Nectandra* e suas aplicações

No Estado de São Paulo, através de levantamentos florísticos realizados, a família Lauraceae figura entre aquelas que apresentam maior número de espécies no bioma da Mata Atlântica, e os gêneros *Nectandra* se encontram bem representados e caracterizados pela presença de alcaloides na sua composição fitoquímica (TABARELLI; MANTOVANI, 1999). Espécies do gênero *Nectandra* são amplamente utilizadas na medicina popular devido à sua atividade antirreumática, digestiva e diurética. Algumas das propriedades medicinais foram comprovadas por alguns estudos, como em *Nectandra salicifolia* (Kunth) Nees, cujo extrato alcoólico da casca evidenciou propriedade relaxante muscular, atividade antifúngica e antimalárica,

devido à presença do alcaloide costaricina obtido do extrato metanólico da casca (GUTERREZ, 2008). Propriedades anti-inflamatórias também foram relatadas para a espécie *N. angustifolia* (Schrad.) Nees (MELO et al., 2006). Segundo Marques (2001), frutos e folhas de *N. pichurim* (Kunth) Mez são odoríferos e usados contra cólicas e problemas gástricos e o lenho de *N. rodiei* Schomb. é reconhecido como tônico, antipirético, relaxante vascular e antimalárico.

Dentre outras espécies representativas na região sudeste do Brasil pode-se citar *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, vulgarmente conhecida como canela-louro, canela-preta, canela-ferrugem e canela-fedorenta, muito utilizada como planta ornamental no Estado de São Paulo (LORENZI, 2002). Ocorre desde o sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e também na região Centro-Oeste. Segundo Lorenzi (1998), trata-se de uma planta perenifoliada ou semidecídua, sem preferência definitiva por tipo de solo, desenvolvendo-se em solos úmidos até os de drenagem rápida. Apresenta ampla dispersão pela floresta ombrófila em geral, sendo menos frequente nas associações pioneiras e secundárias. É uma que integra a lista das espécies ameaçadas de extinção (BAITELLO, 2001).

Estudos relatam que a espécie possui ação anti-inflamatória e analgésica (SILVA FILHO et al. 2004). A composição química do óleo essencial provindo das folhas e galhos evidenciou a presença de sesquiterpenos como o *E*-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno e guaiol. Nas folhas, o componente majoritário do óleo essencial foi o *E*-nerolidol e este é conhecido pela sua atividade antimalárica. Já nos galhos, o guaiol foi encontrado como componente majoritário do óleo essencial e lhe é atribuída atividade antibacteriana (MARIN et al., 2010). A casca de *N. megapotamica* é utilizada na medicina popular como antirreumático e analgésico (DA SILVA FILHO et al., 2004).

A espécie *N. grandiflora* é encontrada predominantemente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, entre os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. (QUINET et al., 2010). Também é considerada como uma espécie ameaçada de extinção. Conhecida popularmente como canela-amarela, canela-fedida e canela-cheirosa, é uma planta heliófila e secundária, sendo uma das espécies de melhor regeneração dentro da floresta (LORENZI, 2002). Na medicina popular, a espécie é utilizada como anti-reumática, diurética e digestiva (RAGGI, 2008). A atividade antimicrobiana em *Nectandra grandiflora*, sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* foi descrita por Cunico et al. (2010). Os mesmos autores aferem a presença de

espatulenol, α -pineno, cariofileno e copaeno no óleo essencial da espécie. Estudo cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *N. grandiflora* verificaram que o isolamento de dois flavonóides glicosilados tiveram atividade antioxidante inibindo a oxidação do β -caroteno (RIBEIRO et al., 2005). Estudos químicos e farmacológicos preliminares realizados com essa espécie evidenciaram atividade antitumoral do extrato etanólico de sua casca, que produziu efeito inibitório do sarcoma 180 e do carcinoma de Ehrlich implantados em ratos (MORENO et al, 1993).

A espécie *N. grandiflora*, por possuir comportamento sazonal na produção de sementes pode-se tornar vulnerável à ações antrópicas e susceptíveis ao processo de extinção.

A *N. laceolata* caracteriza-se por ser árvore perenifólia, com 10 a 15 m de altura e 20 a 50 cm de Dap, ocorrendo principalmente na Floresta Ombrófila. Sua madeira é indicada na construção civil, para ser usada como materiais de sustentação e móveis, além de ser também fonte de energia quando usada como lenha e carvão (CARVALHO, 2002). São inexistentes estudos sobre a caracterização química e atividade biológica nesta espécie.

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor de grande biodiversidade no planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. Muitas das plantas medicinais nativas são consumidas e propagadas por usuários ou comerciantes, porém possuem incipiente comprovação de suas propriedades farmacológicas, bem como, de seus constituintes químicos. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Não obstante, a escassa inovação tecnológica em pesquisa e exploração de produtos naturais é uma das características marcantes de países em desenvolvimento. Em consequência disso, torna-se relevante o trabalho conjunto de pesquisadores na universidade com agências de fomento que estimulem e promovam o descobrimento de novas substâncias biologicamente ativas que possuam futura aplicação na indústria farmacêutica, cosmética ou em alimentos.

4.2 *Stevia Rebaudiana* Bertoni

4.2.1 . Características da espécie *S. rebaudiana* Bertoni

A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni é um arbusto ramificado pertencente à família Asteraceae, nativa da região de fronteira entre Brasil e Paraguai,

estendendo-se também pelo Brasil e Argentina. Conhecida popularmente como estêvia, folha-doce ou erva-doce, caracteriza-se por ser uma espécie herbácea perene, semiereta, com altura variando entre 40 a 80 cm, folhas lanceoladas e flores esbranquiçadas eunidas em capítulos terminais (SOEJARTO, 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

A tribo indígena “Guaranis” utilizava a espécie de *Stevia rebaudiana*, que eles chamaram caá-hé-e ("erva doce"), como adoçante em erva-mate e chás medicinais para o tratamento de azia e outras doenças (BRANDLE; TELMER, 2007). Por meio desses conhecimentos étnicos, a espécie *S. rebaudiana* tem promovido crescente interesse científico como fonte de compostos secundários, em especial o esteviosídeo, presente abundantemente nas folhas. Atualmente, o cultivo de estêvia abrange outras regiões do mundo além do Brasil, incluindo Canadá e algumas partes da Ásia e Europa (LEMUS-MONDACA, 2012).

A estêvia é uma espécie com grande sensibilidade ao fotoperíodo, exigindo dias curtos para seu melhor desenvolvimento. A exigência de fotoperíodo fez com que pesquisadores concluíssem que o cultivo em áreas temperadas no verão seria ideal para alta produção de esteviosídeo. A temperatura ideal para o seu cultivo varia em torno de 20° a 25°C, porém a espécie tolera ocasionalmente temperaturas inferiores à 9°C (RAMESH et al. 2006).

Quanto à exigência nutricional, a espécie caracteriza-se pela adaptabilidade a solos pobres em macro e micronutrientes, desde que estes forneçam umidade e drenagem adequada para um bom desenvolvimento das plantas (GOENADI, 1987). Porém, estudos revelam estreita correlação entre o suprimento nutricional e o acúmulo de glicosídeos (RAMESH et al., 2006).

A baixa taxa de germinação das sementes é um fator que limita a sua produção em larga escala, além de não permitir a produção de populações homogêneas, resultando grande variabilidade em características importantes, como os níveis de edulcorantes e composição (NAKAMURA; TAMURA, 1985). Usualmente a propagação da espécie é feita por estacas, entretanto, a técnica é ainda limitada para a estêvia, devido ao pequeno número de indivíduos que podem ser obtidos simultaneamente a partir de uma única planta. Devido a estas dificuldades, a técnica de propagação via cultura de tecidos têm sido a melhor alternativa para a propagação em massa da espécie, todavia, envolve altos custos de produção, e muitas vezes não é economicamente viável a sua aplicação (SIVARAM; MUKUNDAM, 2003).

As plantas se regeneram após a colheita e a produção pode durar até oito anos em uma mesma área, sendo que, as plantas podem ser colhidas até seis vezes por ano. A produção de folhas secas por planta varia de 15 a 35 gramas por planta e um hectare pode produzir entre 1000 e 1200 kg de folhas secas por colheita (MISHRA et al., 2010).

4.2.2 .Os glicosídeos

O composto esteviosídeo ocorre principalmente nas folhas e o seu teor pode variar entre 4% a 20 % da biomassa seca das folhas, dependendo do cultivar e das condições de cultivo. O esteviosídeo 3 é o principal responsável pelas propriedades edulcorantes da planta. Outros compostos presentes, mas em menor concentração são: steviolbioside 2, rebaudioside A 4, B 5, C 6 D 7 E 8, F 9 e dulcoside A 10. O esteviosídeo apresenta a fórmula química de um glicosídeo diterpeno ($C_{38}H_{60}O_{18}$) (KENNELLY, 2001). Todos os glicosídeos diterpenos isolados de folhas de *S. rebaudiana* tem a mesma estrutura química do esteviol e diferem principalmente na quantidade de hidratos de carbono (R1 e R2) (KOVYLYAEVA et al., 2007).

Os diferentes órgãos das plantas sintetizam quantidades de glicosídeos, que diminuem na seguinte ordem: folhas, flores, caule, sementes e raízes. De acordo com Bondarev et al. (2003), a razão pelas folhas possuírem altos níveis de esteviosídeo, se deve ao fato destas servirem como principal tecido entre a síntese e acumulação primária do composto. Durante a ontogenia, o aumento gradual na concentração de esteviosídeo foi observado em folhas maduras e nos caules, e este processo durou da fase de brotamento ao início da floração. Observou-se também que o conteúdo de glicosídeos diminuiu gradualmente até o início do florescimento. E durante a frutificação os níveis encontrados foram muito baixos.

Durante anos a estévia têm sido empregada como adoçante na América do Sul, Ásia, Japão, China, e em diferentes países da União Europeia. No Brasil, Coréia do Sul e Japão as folhas de estévia são transformadas em edulcorante de baixa caloria (MIZUTANI; TANAKA, 2002). Nos Estados Unidos o extrato das folhas de estévia é consumido como um suplemento dietético. A utilização do esteviosídeo como suplemento alimentar é vantajosa devido ao baixo teor calórico do composto e possibilidade de ser implementado na dieta de pessoas diabéticas e obesas como alternativa para a ingestão do açúcar (GEUNS, 2003). A comissão da OMS / FAO em Aditivos Alimentares (JECFA) aprovou como seguro o uso de glicosídeos de esteviol

como aditivo alimentar e recomendou uma taxa de ingestão diária aceitável de 2 mg/kg de peso corporal/dia expresso como esteviol (EFSA, 2011). O comitê da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) aceitou o uso de glicosídeos extraídos das folhas de Stevia como aditivo alimentar, apenas em 2011.

Observando a crescente demanda por matéria prima de qualidade pelo mercado europeu existe a necessidade de estudos que estabeleçam as técnicas agronômicas adequadas, em decorrência das condições ambientais, visando a máxima produtividade de glicosídeos de esteviol.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAITELLO, J. B. A Importância das Lauraceae na Mata Atlântica Brasileira. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2014. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/pesquisaambiental/pesquisas/a-importancia-das-lauraceae-na-mata-atlantica-brasileira/>>. Acesso em: 4 fev. 2014.

BAITELLO, J. B. Novas espécies de Lauraceae para a Flora brasileira. *Acta Botânica Brasileira*, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 445-450, 2001.

BRANDLE, J.; TELMER, P. Steviol glycoside biosynthesis, *Phytochemistry*, New York, v. 68, n. 14, p. 1855–1863, 2007.

CANTE, T. O móvel do século XIX no Brasil. Rio de Janeiro: CGPM, 1988. 190 p.

CARMO, F. M. S.; BORGES, E. E. L; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v.21, n.3, pp. 697-705, 2007.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas Florestais, 1994.

CARVALHO, P. E. R. Canela-branca. Circular técnica Embrapa 63. Colombo Colombo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas Florestais, 2002.

COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1036 p.

CRONQUIST, A. The Evolution and classification of flowering plants. New York: Botanical Garden, 1988. 517 p.

CUNICO, M. M.; VIEIRA, G.; LIMA, C. P.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; AUER, C. G.; SANQUETTA, C. R. Estudo Preliminar Antimicrobiano e Fitoquímico do Óleo Essencial Foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). In:

INTERNATIONAL CONFERENCE ON EDUCATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 2010, Curitiba. Anais... Curitiba, 2010.

DA SILVA FILHO, A. A.; SILVA, M. L. A.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Evaluation of analgesic and antiinflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London, v. 56, n. 9, p. 1179-1184, 2004.

EFSA. Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *The EFSA Journal* v.9, n.1, p.1972, 2011.

GEUNS, J.M.C., AUGUSTIJNS, P., MOLS, R., BUYSE, J.G., DRIESSEN, B. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of Stevioside, Rebaudioside A and Steviol. *Food and Chemical Toxicology*. New York, v. 41, n. 11, p. 1599–1607, 2003.

GOENADI, D. H. Effect of slope position on growth of *Stevia rebaudiana* in Indonesia. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 18, n.11, p. 1317-1328, 1987.

GUTERRES, Z. R. Investigação das atividades mutagênica, anti-mutagênica e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos alcaloides triptofol, ocateína e dicentrina. 2008. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

KENNELLY, E.J., Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*. Taylor and Francis, London, v. 19, p. 78-195, 2002.

KOVYLYAEVA, G.I.; BAKALEINIK, G.A.; I. STROBYKINA, YU.; GUBSKAYA, V.I.; SHARIPOVA, R. R.; AL'FONSOV, V.A.; KATAEV, V.E., TOLSTIKOV, A.G. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, New York, v.43, n 1, p. 81-85, 2007.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEND, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, London, v.132, n. 3, p.1121–1132, 2012.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazonica*, Manaus, v. 35, p. 363-366, 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1, 384 p.

LORENZI, H.E.; MATOS, F.J. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, v.1, 512 p.

MARIN, R.; SILVA, G. T.; FONTOURA, J. B.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; APEL, M. A. Composição química do óleo essencial obtido de *Nectandra megapotamica* (Spreng) Chodat et Hassler do Sul do Brasil. In: 33A REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2010, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia, 2010.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente Seropédica*, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*, Kansas, v.44, n. 2, p.198–206, 2006.

MELO, J. O. et al. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 29, n. 11, p. 2241-2245, 2006.

MISHRA P, SINGH R, KUMAR U, PRAKASH V. *Stevia rebaudiana* – A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, Dubai, v. 5, p.62–74, 2010.

MIZUTANI K, TANAKA O Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*, Taylor and Francis, London, v. 19, p. 78-195, 2002.

MORAES, P. L. R. Sinopse das lauráceas nos estados de goiás e tocantins, Brasil. *Biota Neotropica*, Campinas, v. 5, n. 2, p. 253-270, 2005.

MORENO, P. R. H. et al. Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. *International Journal of Pharmacognosy*, v.31, p.189-192, 1993

MUÑIZ-MÁRQUEZA, D. B.; MARTÍNEZ-ÁVILAB, G. C.; WONG-PAZA, J. E.; BELMARES-CERDAA, R.; RODRÍGUEZ-HERRERAA, R.; AGUILARA, C. N. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, Kansas, v. 20, p. 1149-1154, 2013.

NAKAMURA, S. AND TAMURA, Y. Variations in the main glycosides of stevia. *Jap. Journal of Tropical Agriculture*, Kerala, v. 29, p. 109–115, 1985.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

OHASHI, S. T.; ROSA, L. S.; MEKDECE, F. S. Influência do diâmetro e da altura de corte das cepas na brotação de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Revista de Ciências Agrárias*, Belém, n. 41, p. 137-144, 2004.

PIO CORRÊA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. p. 458-459.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 53, n. 82, p. 59-121, 2002.

RAGGI, L. Estudo da composição química e das atividades biológicas dos óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano. 2008. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N.W. Cultivation of stevia [*stevia rebaudiana* (Bert.) Berton]: a comprehensive review. *Advances in Agronomy*, San Diego, v. 89, p. 137–177, 2006.

RANK A. H., MIDMORE D. J. 2006. Stevia, an intense, natural sweetener. Australian Government: Rural Industries Research and Development Corporation. < Disponível em file:///C:/Users/admin/Downloads/06-020%20(1).pdf >

RIBEIRO, A. B.; BOLZANI, V. S.; YOSHIDAB, M.; SANTOS, L. S.; EBERLIND, M. N.; SILVA, D. H. S. A New Neolignan and Antioxidant Phenols from *Nectandra grandiflora*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Campinas, v. 16, n. 3, p. 526-530, 2005.

SAHIN, K., KUCUK, O., SAHIN, N., & SARI, M. Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation status, some serum hormone, metabolite, and mineral concentrations of Japanese quails reared under heat stress (34 °C). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, Berne, v. 72, p. 91–100, 2002.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, New York, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

SILVA FILHO, A. A.; SILVA, M. L. A.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, London, v. 56, n. 9, p. 1179-1184, 2004.

SIVARAM, L.; U. MUKUNDAN. In Vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, Columbia, v. 39, p. 520–523. 2003.

SOEJARTO, D. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*. Taylor and Francis, London, p. 18–39, 2002.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A riqueza da floresta Atlântica de encosta no Estado de São Paulo (Brasil). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 217-223, 1999.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WERFF, H. W. D.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden, Missouri*, v. 83, p. 419-432, 1996.

Capítulo 1: Atividade antioxidante em três espécies brasileiras de *Nectandra* (Lauraceae) influenciadas pela sazonalidade.

Ferraz, E.O.¹; Lima, G. P. P.¹; Borguini, M. G.¹; Nicoletto, C.²; Sambo, P.².

1 Departamento de Agronomia/ Horticultura, Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Parque Residencial Primavera – CEP 18610307 - Botucatu, SP

2 Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE), Agripolis – Università degli Studi di Padova, Viale dell’Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy

RESUMO

A família Lauraceae é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. As Lauraceas se destacam entre as outras famílias pela sua importância econômica pelo fornecimento de recursos madeireiros, óleos aromáticos e outros metabólitos importantes que são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica e alimentícia. O objetivo foi avaliar o efeito da sazonalidade nos níveis de flavonóides, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em folhas e casca, e o teor de óleo essencial em *Nectandra lanceolata*, *N. megapotamica* e *N. grandiflora*. Os resultados mostraram diferenças nos níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante entre as espécies durante as estações do ano e evidenciaram o conteúdo de compostos fenólicos em *N. megapotamica* em relação às outras espécies. No que diz respeito à ação antioxidante das espécies, estas não exibiram a mesma resposta para ambos os métodos, no entanto, pode dar-se um destaque para a espécie *N. lanceolata*.

PALAVRAS CHAVE: Compostos fenólicos, compostos voláteis, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The Lauraceae family is widely distributed in tropical and subtropical regions of the planet. The Lauraceae stand out among the other families for their economic importance as they provide valuable timber, aromatic oils and important substances that are widely employed in the pharmaceutical and food industries. The aim was to evaluate the effect of seasonality in the levels of flavonoids, total phenolics and antioxidant activity (DPPH and FRAP) in leaves and bark and yield essential oil in *Nectandra lanceolata*, *N. megapotamica* and *N. grandiflora*. The results showed differences in the levels of phenolic compounds and evidence the antioxidant activity between species during each season and compounds phenolics in *N. megapotamica* was higher than others. In respect

to the antioxidant action of the species was not the same answer for both methods, however can give a highlight for the specie *N. lanceolata*.

KEYWORDS: Phenolic compounds, volatile compounds, antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as plantas medicinais têm sido extensivamente estudadas com o intuito de descobrir novos antioxidantes, alimentos funcionais e nutracêuticos. O uso de antioxidantes naturais é amplamente aceito, porque eles não são materiais sintéticos. Globalmente, a família Lauraceae tem aproximadamente 50 gêneros e 2.500 espécies e, no Brasil existem cerca de 25 gêneros e 400 espécies (Cronquist, 1981; Chanderbali et al, 2001). Espécies de considerável interesse do ponto de vista econômico pertencem a esta família. Alguns exemplos podem ser citados como o abacate (*Persea americana*), canela (*Cinnamomum verum*) e espécies de plantas aromáticas que são utilizadas para perfumes, como o sassafrás (*Ocotearea odorifera*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) (Marques, 2001; Quinet; Andreatta de 2002) cujos produtos possuem alto valor comercial e são utilizados em larga escala em todo o mundo. As espécies do gênero *Nectandra* são importantes do ponto de vista econômico, pela utilização da madeira em construção civil e indústria de móveis, sendo considerada de boa qualidade (Rohwer, 1993). Algumas espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina popular, como diuréticos, anti-fúngico e anestésicos (Melo et al. 2006; Brito, 2009).

Os estudos que confirmam o potencial farmacológico do gênero são ainda incipientes e também sugerem um destino de partes de plantas que são consideradas como remanescentes, folhas e casca, como potenciais matrizes úteis de extração para produtos farmacológicos ativos. Trabalho realizado pelo Ciccio et al., (2009) e Werka et al. (2007), confirmaram as propriedades antitumorais de *Nectandra salicina* e *Nectandra membranosa*. O óleo essencial de *Nectandra megapotamica* mostrou potencial antimicrobiano contra a bactéria gram-positivas *Staphylococcus aureus* (Britto, 2009), propriedades anti-inflamatórias (Apel et al., 2006), e atividade anestésica (Tondolo, 2011).

Atualmente, existem literaturas bem fundamentadas que comprovem que a quantidade e qualidade dos metabólitos secundários sintetizados pelas plantas está intimamente associado com a radiação, a temperatura, a precipitação, ventos fortes, a altitude, a nutrição do solo e a época de coleta. Guenther (1997) citou que outros fatores podem afetar os terpenos de emissões, tais como a idade da folha, os eventos fenológicos, o acúmulo de nitrogênio na folha, herbivoria, ferimentos e outras formas de

estresse que pode variar durante o ano. Assim, este é o primeiro estudo que objetivou avaliar o potencial antioxidante da casca e folhas de três espécies de gênero *Nectandra* nativas. Neste contexto, o nosso objetivo foi avaliar o potencial antioxidante, bem como os níveis de flavonóides e fenóis, em folhas e casca, e óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees *Nectandra lanceolata* Nees & Mart. nas quatro estações do ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do local e material vegetal

O material vegetal das espécies *Nectandra lanceolata* Nees & Mart. foi coletado na Fazenda Experimental Edgardia (latitude: 22° 49'S, longitude: 48° 23'W e a altitude variando entre 500 e 800 m). E as demais espécies, *Nectandra megapotânica* (Spreng.) Mez, *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees foram coletadas na Fazenda Lageado (latitude 22° 53' altitude 48° 29' e altitude 966m). Ambas as fazendas pertencem à Universidade Estadual Paulista UNESP Campus de Botucatu no Estado de São Paulo, Brasil. Durante todas as coletas considerou-se 5 indivíduos para a espécie *N. lanceolata* e *N. megapotânica* e 4 para a espécie *N. grandiflora*.

As matas da Fazenda Edgardia enquadram-se na unidade fitogeográfica denominada Floresta Estacional Semidecidual (IBGE, 1991) ou no tipo Floresta Mesófila Semidecídua (Rizzini, 1979), ocorrendo na área de transição da Depressão Periférica para Cuesta Basáltica.

Foram preparadas, identificadas e depositadas exsicatas das três espécies de Lauráceas, *N. megapotânica*, *N. grandiflora* e *N. lanceolata*, no Herbário “Irina Delanova Gemtchüjnicov” – BOTU, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, que sob os respectivos número de registro 30066, 30011 e 30067.

As coletas das folhas e cascas de cada espécie foram realizadas no meio de cada estação do ano, assim sendo no mês de agosto (inverno) e novembro (primavera) do ano de 2012 e, fevereiro (verão) e maio (outono) do ano de 2013. Após a coleta, o material foi colocado em estufa de circulação forçada de ar (40°C) para o processo de secagem até que o material estivesse com o peso constante.

2.2 Produtos químicos e equipamentos utilizados

Os produtos utilizados para as análises de antioxidante foram o metanol, ácido acético, acetona, Folin–Ciocalteu, carbonato de sódio, acetato de sódio anidro, cloreto de ferro III da marca Merck (Darmstadt, Alemanha). O 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

(DPPH), 24,6- tris(4-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), o padrão rutina e ácido gálico da marca Sigma-Aldrich Corporation (ST. Louis, Estados Unidos). Os equipamentos empregados nas análises foram estufa de circulação forçada de ar, moinho tipo Willey, balança analítica, banho ultrassônico, centrífuga e espectrofotômetro UV-VIS (Schimadzu – UV 1800).

2.3 Análises Bioquímicas

2.3.1 Teor de Fenóis Totais

A análise de fenóis totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico com o uso do reativo de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi Jr., 1965). Utilizou-se três repetições para cada espécie. As amostras das folhas e cascas secas foram pesadas (30mg e 50mg, respectivamente), colocadas em tubos contendo acetona 50% e transferidas à centrífuga. Em seguida, foram levados para o banho ultrassônico por 20 minutos e posteriormente centrifugados a 6.000 x g (Hettich Zentrifugen Mikro 220R) durante 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido. O precipitado foi re-extraído e os sobrenadantes combinados. Alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram transferidas para tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de solução saturada de Na_2CO_3 . Após 1 hora de reação a leitura de absorbância foi feita à 725 nm (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000) e os resultados expressos em mg g^{-1} de massa seca, em equivalente de ácido gálico.

2.3.2 Flavonóides Totais

A extração para análise dos teores dos flavonóides totais foram feitas de acordo com o método de Awad et al. (2000), segundo as adaptações realizadas por Popova et al. (2004). Utilizou-se três repetições para cada espécie. As amostras de folhas e cascas secas foram pesadas (0,01g e 0,03, respectivamente), adicionou-se metanol acidificado à 10%. Posteriormente, foram levadas para banho ultrassônico durante 30 minutos e adicionado ao conteúdo cloreto de alumínio 5% e centrifugadas por 20 minutos a 10000 x g (Jouan MR 18 12). Em seguida, as amostras foram filtradas e a leitura de absorbância realizada a 425 nm. Os resultados foram expressos em mg 100g^{-1} de amostra seca, em equivalente de rutina.

2.3.4. Atividade antioxidante pelo método pelo DPPH

A metodologia utilizada foi a de Brand-Williams et al. (1995). A solução de DPPH foi preparada a $2,10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$ (0,010 mg de DPPH em 50 mL de metanol a 99,8%). Para a extração das amostras foram pesados 0.03 g da amostra e diluídas em 10 mL de metanol a 99,8% em tubo para centrífuga, utilizou-se três repetições por espécie.

As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g (Hettich Zentrifugen Mikro 220R) por 10 minutos a 5°C. Para a análise das amostras provenientes das folhas, foram coletadas alíquotas de 0.05 mL do sobrenadante das espécies *Nectandra megapotâmica*, *N. grandiflora* e adicionou-se 3.45 mL de metanol P.A. Para as espécies *N. lanceolata* coletou-se a alíquota de 0.03 mL do sobrenadante completando o volume para 3.5 mL com metanol P.A. As amostras providas das cascas coletaram-se 0.03 mL do sobrenadante de todas as espécies. Adicionou-se 300 µl de DPPH 2×10^{-4} g.mL⁻¹, e após a homogeneização, os tubos de ensaios foram armazenados no escuro por 60 minutos. Um controle negativo foi feito com 0.3 mL de DPPH em metanol. A leitura obtida a 517 nm foi convertida em porcentagem de atividade antioxidante pela fórmula: % Inibição = [(Aa – Ab) / Aa] x 100, na qual Aa é a absorbância da solução de DPPH e Ab é a absorbância da solução de DPPH reduzido nas amostras.

2.3.5 Atividade antioxidante pelo método FRAP

Foi utilizada a metodologia de Benzie & Strain (1996). Para a extração foram pesados 0.030 g da amostra de folhas e cascas secas, depois foram diluídas em 10 mL de metanol a 99,8% em tubo para centrífuga. As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g (Hettich Zentrifugen Mikro 220R) por 10 minutos a 5°C. Após, adicionou-se 900 µL do reagente FRAP aquecido a 37°C, 30 µL das amostras 90 µL de água destilada. Após adicionar todos os reagentes e aguardar 10 minutos foi feita a leitura no comprimento de onda 593-595 nm (subtraindo o branco). As leituras foram feitas utilizando a cubeta com uma largura de 1 cm e volume de 1mL. Com base na calibração com FeSO₄, a atividade foi expressa em micromoles Fe reduzido por g (Fe² L⁻¹).

2.3.6 Extração do óleo essencial

A extração dos óleos essenciais das folhas foi realizada por hidrodestilação em Clevenger, utilizando-se 100 g de matéria seca em 1000 mL de água destilada por um período de 120 min. Para o cálculo do rendimento de óleo essencial, foram feitas extrações em triplicata de cada repetição. O óleo extraído foi armazenado em frascos eppendorf, protegido da luz e refrigerado a 0°C.

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com um esquema fatorial com 3 espécies e 4 estações com o total de 12 tratamentos com 3 repetições. Os dados foram analisados por meio de análise de variância. No caso de um valor de F significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de $P \leq 0,01$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Flavonoides

O gênero *Nectandra* mostrou diferenças significativas em teores de flavonoides em todas as espécies para a época de coleta. A espécie *N. megapotamica* apresentaram níveis mais elevados de flavonoides em relação às outras duas espécies em ambas as amostras provenientes das folhas e casca da planta (Tabela 1). Para a sazonalidade, o alto conteúdo de flavonoides nas folhas não apresentaram diferença significativa entre o inverno, primavera e verão, com a exceção à estação do outono que se obteve menores teores (148 mg).

Tabela 1 Conteúdo de flavonoides nas folhas e cascas do gênero *Nectandra* em diferentes estações.

Tratamentos	Flavonoides (mg eq. rutina 100 g ⁻¹)	
	Folhas	Casca
Espécies		
<i>Nectandra lanceolata</i>	153 b	30.053 b
<i>Nectandra grandiflora</i>	167 b	31.241 b
<i>Nectandra megapotamica</i>	247a	51.880 a
Significance (ANOVA)	**	***
Estações		
Inverno	207 a	39.0 b
Primavera	200 a	33.8 d
Verão	201 a	41.3 a
Outono	148 b	36.6 c
Significância (ANOVA)	*	***
Espécie x Sazonalidade	**	***

n.s., *, **, ***: não significativo, significativo a $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$.

Dentro de espécies e estações do ano, os valores da coluna com letras iguais não diferem-se significativamente em $P \leq 0,01$ (teste de Tukey HSD).

Houve interação significativa entre as estações do ano e as espécies nas amostras provindas das folhas. Percebe-se que a espécie *N. megapotamica* permanece com valor superior nos teores de flavonoides durante o inverno, a primavera e o verão, diminuída no outono e se iguala aos níveis de outras espécies (Figura 1A). Para a casca, a estação do verão que exibiu teor mais elevado (41,3mg), seguido pelo outono, inverno e primavera (Tabela 1).

Entre as espécies e as estações do ano nas amostras de casca houve uma interação significativa, destacando-se a espécie *N. megapotamica* pelos altos teores de flavonoides e estabilidade durante as quatro estações, o que não foi observado para às

demaís. Em geral, a espécie *N. grandiflora* tem valores intermediários, com exceção da estação da primavera que é superada pela *N. lanceolata* (Figura 1B).

Mudanças no fotoperíodo nas diferentes estações podem interferir com a produção de metabolitos secundários de plantas, como uma estratégia de defesa de plantas (Harbone, 1994), principalmente compostos fenólicos que são agentes de proteção contra diversos tipos de stress causados por agentes patogênicos ou condições ambientais adversas (Coutinho et al, 2010; Treutter, 2001).

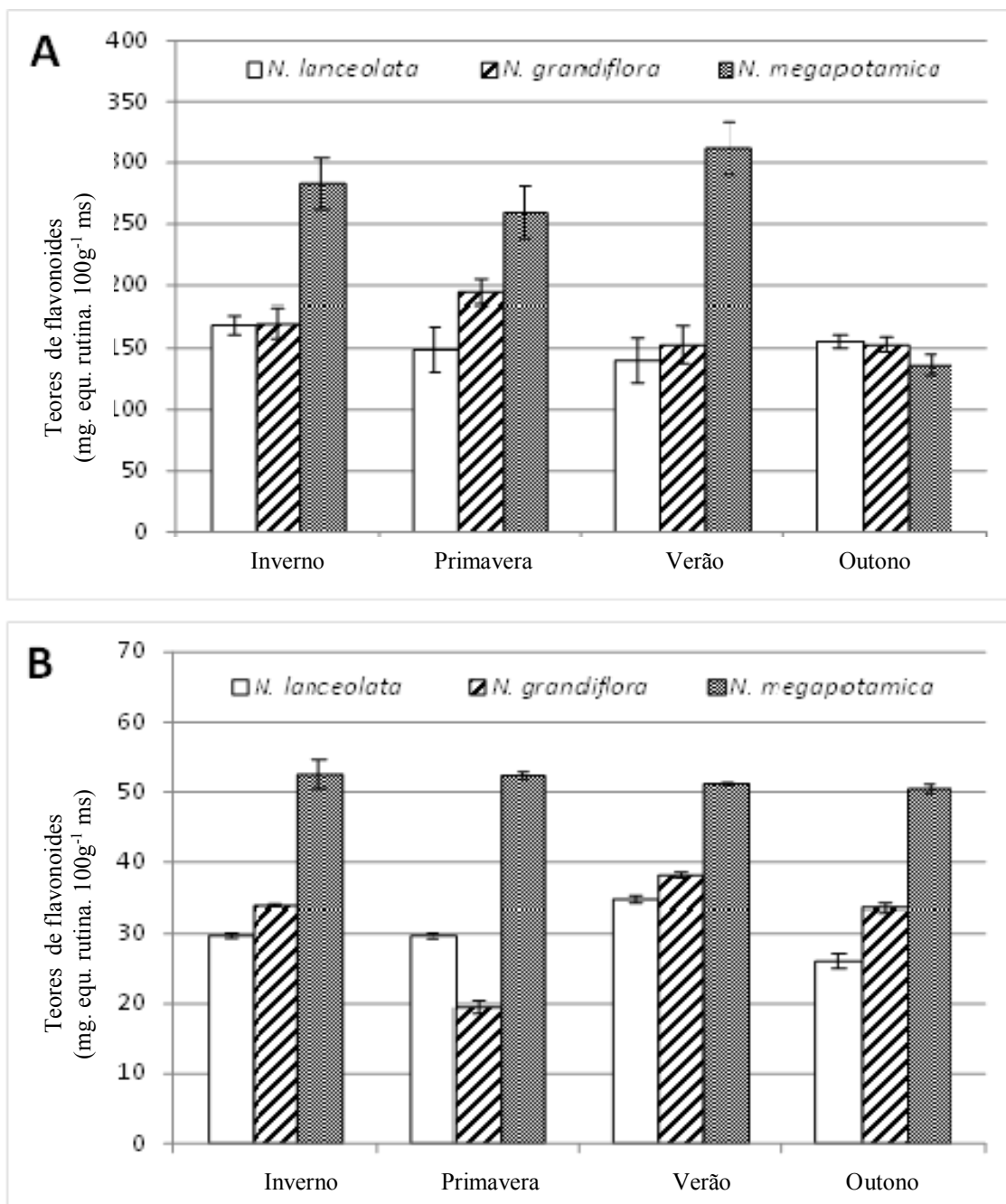


Figura 1 Diferentes efeitos da sazonalidade em teores de flavonoides em folhas (A) e casca (B) de espécies de *Nectandra*.

3.2 Atividade antioxidante e fenóis totais

As espécies *N. lanceolata* e *N. grandiflora* sobressaíram-se em relação aos teores de fenóis, diferindo significativamente da espécie *N. megapotamica* (Tabela 2). No entanto, quando analisamos o conteúdo de casca este comportamento é revertido nas três espécies, e a *N. megapotamica* apresenta maior valor (Tabela 3). Os teores de fenóis em folhas e casca não diferiram durante as estações do ano.

Tabela 2 Conteúdo de fenóis, atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP e teor de óleo essencial em folhas do gênero *Nectandra*.

Tratamentos	Folin (mg AG g ⁻¹ ms)	DPPH (TEAC mmol g ⁻¹ ms)	Frap (mmol Fe kg ⁻¹ ms)
Espécie			
<i>Nectandra lanceolata</i>	5.78 A	148 b	425 a
<i>Nectandra grandiflora</i>	5.23 A	191 a	284 b
<i>Nectandra megapotamica</i>	3.92 b	77 c	226 c
Significância (ANOVA)	**	**	**
Estações			
Inverno	5.08 a	128 b	373 a
Primavera	4.57 a	138 ab	316 ab
Verão	4.95 a	142 ab	275 b
Outono	5.20 a	146 a	283 b
Significância (ANOVA)	n.s.	*	**
Espécie x Sazonalidade	n.s.	**	**

n.s., *, **, ***: não significativa, significativa a $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$.

Dentro de espécies e estações do ano, os valores da coluna com letras iguais não diferem significativamente em $P \leq 0,01$ (teste de Tukey HSD).

A variação de compostos fenólicos entre espécies do mesmo gênero foi relatado por PROSAD et al. (2009). Os autores avaliaram os níveis de flavonóides e atividade antioxidante de extrato de folhas de cinco espécies de canela na China. Os resultados foram que a espécie *C. zeylanica* continha o teor fenólico total alto (2708,7 mg /g) enquanto *C. tamala* apresentava o valor mais baixo (20,62 mg /g).

As espécies selecionadas neste trabalho possuem estudos incipientes sobre a composição química e atividade biológica. Um desses estudos foi realizado em Mato Grosso do Sul com o extrato da casca e folhas de *N. megapotamica* para a identificação de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante. Os autores isolaram e identificaram quatro fenilpropanóides, elemicina, isoelemicina, (±)-eritro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol e (±)-treo-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol, um derivado do ácido gálico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico, uma flavana, (-)-epicatequina e um sesquiterpeno, trans-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno. Dentre os compostos aromáticos

obtidos, a (-)-epicatequina apresentou atividade antioxidante frente ao DPPH e ao β -caroteno/ácido linoléico, enquanto que o ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico inibiu a oxidação do β -caroteno/ácido linoléico. Os fenilpropanóides, por sua vez, apresentaram atividade pró-oxidante neste ensaio (Garcez et al., 2009).

Especificações técnicas de produtividade de cascas e folhas em quilogramas por planta são inexistentes para as espécies estudadas, uma vez que são espécies novas na pesquisa científica. Entretanto, os dados encontrados demonstram que as partes da planta não utilizadas na indústria de construção, podem ser utilizadas na indústria química como uma fonte de metabolitos secundários, uma vez que a síntese de flavonóides e fenóis é muito elevada nas cascas e nas folhas.

Tabela 3 Conteúdo de fenóis e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e da FRAP em casca de três espécies *Nectandra*.

Tratamentos	Folin (AG g ⁻¹ ms)	DPPH (TEAC mmol g ⁻¹ ms)	Frap (mmol Fe kg ⁻¹ ms)
Espécies			
<i>Nectandra lanceolata</i>	5.81 b	113 b	502 a
<i>Nectandra grandiflora</i>	6.05 b	91 b	336 b
<i>Nectandra megapotamica</i>	9.84 a	179 a	276 b
Significância (ANOVA)	**	**	**
Estações			
Inverno	7.00 a	162 a	496 a
Primavera	6.61 a	127 b	385 b
Verão	7.79 a	128 ab	348 b
Outono	7.52 a	94 b	257 c
Significância (ANOVA)	n.s.	**	**
Espécie x Sazonalidade	n.s.	**	*

n.s., *, **, ***: não significativo, significativo a $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$.

Dentro de espécies e estações do ano, os valores da coluna com letras iguais não diferem significativamente em $P \leq 0,01$ (teste de Tukey HSD).

3.3 Método DPPH

Observou-se o poder antioxidante nas folhas das três espécies pelo método de DPPH, notou-se que a espécie *N. grandiflora* infere melhor atividade em relação às outras. No entanto, quando analisamos a casca observa-se que o *N. megapotamica* é a espécie que se destaca (Tabela 2). A interação entre espécies e as estações para amostras oriundas das folhas é significativa e pode-se observar que a espécie *N. grandiflora* possui maior poder antioxidante no inverno, primavera e outono. Na estação do verão a espécie *N. lanceolata* supera a *N. grandiflora* destacando-se. A espécie *N.*

megapotamica permanece com valores mais baixos, comparando-se às outras duas espécies, em todas as estações do ano (Figura 2A).

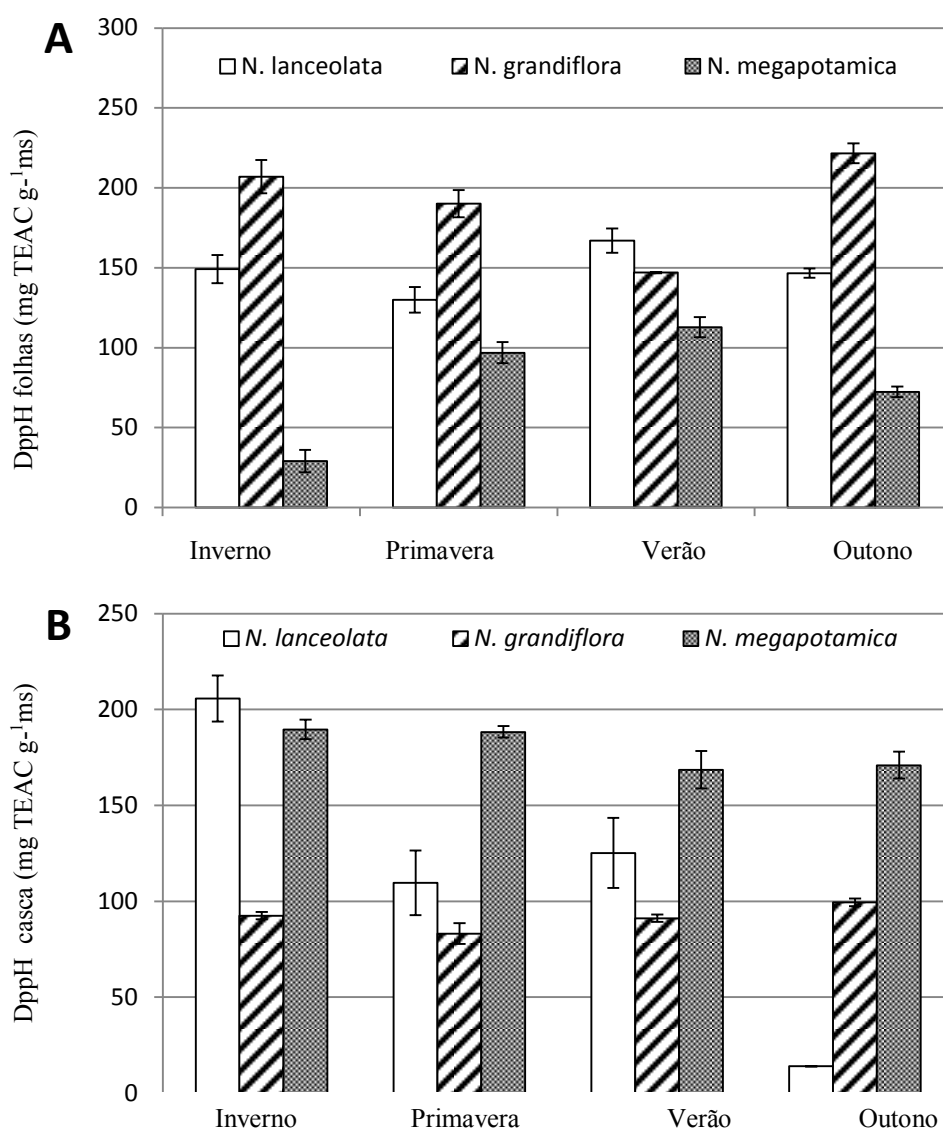


Figura 2 Efeito das diferentes estações do ano na atividade antioxidante pelo método DPPH em folhas (A) e casca (B) de três espécies de *Nectandra*.

Analisando-se a casca, a estação de inverno foi a que se destacou em relação a outras estações, porém, não diferiram estatisticamente do verão (Tabela 2). O outono é a estação que exibiu a menor atividade. Avaliação da interação entre os dois fatores, pode-se observar que as espécies *N. megapotamica* possui maior atividade ao longo do ano, com a exceção do inverno quando foi superada por *N. lanceolata* (Figura 2B).

3.4 Frap

A maior atividade antioxidante utilizando o método Frap foi observada para a espécie *N. lanceolata*. Quanto às estações, o inverno e a primavera destacaram-se das demais (Tabela 2).

Verificou-se que as interações de amostras providas das folhas e cascas possuem comportamento similar, sendo que a *N. lanceolata* se prevalece em todas as estações do ano (Figura 3A e 3B). As espécies *N. megapotamica* e *N. grandiflora* alternam a atividade ao longo do ano, mas elas são sempre inferiores aos valores de *N. lanceolata*.

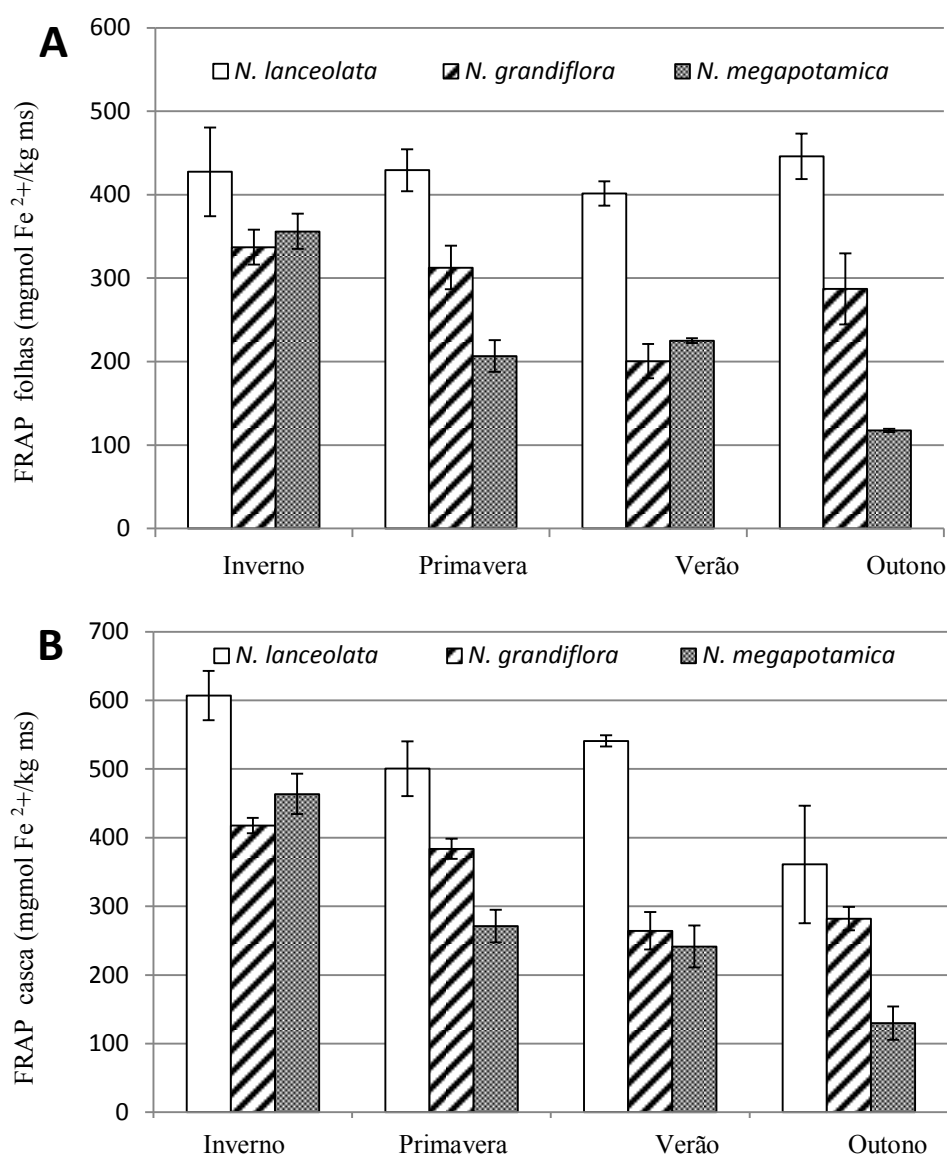


Figura 3 Efeito das diferentes estações do ano na atividade antioxidante pelo método FRAP em folhas (A) e casca (B) de três espécies de *Nectandra*.

4. CONCLUSÃO

As espécies sofrem variações nos níveis de compostos bioativos de partes das plantas e entre os métodos utilizados para medir a atividade antioxidante durante as estações do ano. Pode notar-se que a espécie *N. megapotamica* é proeminente entre as outras nos teores de flavonóides e fenóis na casca, embora estes compostos possam ter variado durante o ano. Quanto à atividade antioxidante é anotado que os métodos utilizados não possuem resultado semelhante, observando que todas as espécies apresentaram valores altamente significativos.

5. REFERÊNCIAS

- Apel, M.A., Lima, M.E.L., Souza, A., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E.G., Suffredini, I.B., Moreno, P.R.H., 2006. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic rain forest (São Paulo - Brazil). *Pharmacol. online* 3, 376-383.
- Awad, M.A., Jager, A., Van Westing, L. M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. *Scientia Horticulturae*, v. 83, p. 249-263, 2000.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie* 28, 25-30.
- Brito, A.F.R. Análise da variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. 2009. 261 f.. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- Chanderbali, A.S.; Van Der Werff, H., Renner, S.S. 2001. Phylogeny and historical biogeography of *Lauraceae*: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88, 104-134.
- Ciccio, J.F.; Chaverri, C.E Díaz, C. 2009. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. *Química Nova* 32, 417-420.
- Coutinho, I.D.; Kataoka, V.M. F.; Honda, N.K.; Coelho, R.G.; Vieira, M.C.; Cardoso, C.A.L. 2010. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20, 322-327.
- Cronquist, A. 1988. The Evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden: New York, 517p.

Garcez, F.R.; Garcez, W.S.; Hamerski, L.; Miguita, C.H. 2009. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. Química Nova 32, 407-411.

State Government of Londrina. *Cinnamomum zeylanicum* Blume – Londrina<www.londrina.pr.gov.br/dados/images/stories/Storage/sec.../canela2.pdf>. Accessed in January 2, 2014.

Guenther, A. 1997. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. Ecological Applications, 7, 34-45.

Harbone, J.B. 1994. The flavonoids-advances in research since 1986. London: Chapman & Hall.

IBGE. 1992. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. São Paulo. IBGE. Manuais Técnicos em Geociências 92p.

Marques, C.A. 2001. Importância econômica da família Lauraceae lindl. Floresta e Ambiente 8, 195 – 206.

Melo O.J; Truiti M. C. T.; Muscará M.N.; Bolonha S.M., Dantas, J.A.; Caparroz-Assef, S.M., Cuman, R.K.; Bersani-Amado, C.A. 2006. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29, 2241-2245.

Prosad, K.N.; Xinhong B.D.Y.; Haiyan Z.G.J.; Yueming, J.H.X. 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10, 627–632.

Quinet, A.; Andreato, R. H. P. 2002. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil Rodriguésia 53, 59-121.

Rohwer, J.G. 1993. Lauraceae. In: Kubitzki, K.; Rohwer, J. G. & Bittrich, V. (eds.). The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag, Berlin. 2, 366-391.

Singleton, V.L.; Rossi Jr, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16, 144-158.

Tondolo, J. S. M. Atividade anestésica em robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 75p.

Treutter, D. 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. Plant Growth Regul 34, 71-89.

Werka, J. S.; Boehme, A. K.; Setzer, W. N. 2007. Biological activities of essential oils of Monteverde, Costa Rica. Natural Product Communications 2, 1215-1219.

Capítulo 2: Sazonalidade: Influência sobre o rendimento, composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de lauráceas

Elza de Oliveira Ferraz.¹; Ary Fernandes Junior¹; Márcia Ortiz Mayo Marques²; Maria Aparecida Ribeiro Vieira²; Giuseppina Pace Pereira Lima¹

1 Departamento de Agronomia/ Horticultura, Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Parque Residencial Primavera – CEP 18610307 - Botucatu, SP

2 Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Fitoquímica, Centro, - CEP 13012970 - Campinas, SP

Resumo

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta. O objetivo do estudo foi analisar o rendimento, a composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de três espécies de lauráceas brasileiras. Coletou-se durante um ano, no meio de cada estação, folhas das espécies *Nectandra lanceolata*, *Nectandra grandiflora* e *Nectandra megapotamica*. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e a análise de composição química efetuada por CG/EM e CG/DIC. Utilizou-se a metodologia de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para verificar a ação antimicrobiana a frente de cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Verificou-se que as espécies *N. lanceolata* e *N. grandiflora* apresentaram o rendimento de óleo essencial similar, bem como, a composição química. As principais classes de substâncias encontradas nestas espécies foram hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados. Os constituintes majoritários do óleo essencial, espatulenol e isobiociclogermacreno, variaram somente para a espécie *N. lanceolata*. A *N. megapotâmica* não apresentou alteração durante a sazonalidade e os constituintes majoritários foram α -pineno e β -pineno e classes químicas que sobressaíram-se foram os hidrocarbonetos monoterpênicos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Em relação à atividade antimicrobiana a espécie *N. megapotâmica* apresentou melhor atividade para a bactéria gram negativa e a *N. lanceolata* para a bactéria gram positiva.

Palavras-chave: Compostos voláteis, atividade biológica, Lauraceae.

Abstract

Brazil is the country with the highest biodiversity of the world's plant, with an estimated over 20% of all species on the planet. The aim of the study was to analyze the yield,

chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of three species of Brazilian Lauraceae. Was collected during one year, in the middle of each season, leaves the species *Nectandra lanceolata*, *Nectandra grandiflora* and *Nectandra megapotamica*. The essential oil was extracted by hydrodistillation and analysis of chemical composition performed by GC / MS and GC / FID. We used the method of minimum inhibitory concentration (MIC) to determine the antimicrobial action of the front strains of *S. aureus* and *E. coli*. It was found that the species *N. lanceolata* and *N. grandiflora* showed similar oil yield, as well as the chemical composition. During the seasonality the major constituents of essential oils, spathulenol and isobiociclogermacreno, only varied for the species *N. lanceolata*. The main classes of compounds found in these species are sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes. The specie *N. megapotamica* did not change during the seasonality and the major constituents were α -pinene and β -pinene and chemical classes that stood out were the monoterpenic hydrocarbons and sesquiterpene hydrocarbons. For antimicrobial activity the species *N. megapotamica* showed better activity for gram-negative bacteria and *N. lanceolata* for gram-positive bacteria.

Keywords: Volatile compounds, biological activity, Lauraceae.

1. Introdução

A família Lauraceae compreende cerca de 3000 espécies distribuídas nas regiões subtropicais e tropicais do leste da Ásia, América do Sul e América do Norte. A maioria das espécies possuem raízes, caules e frutos aromáticos (Simié et al., 2004). Algumas espécies da família são amplamente empregadas pela medicina popular, na culinária ou pela indústria cosmética como o louro, canela, cânfora, abacate, canela sassafrás e paurosa. Pesquisas associando o óleo essencial de várias espécies de lauráceas com a potencial atividade antioxidante, antimicrobiana, ação citotóxica e atividade inibidora da principal enzima envolvida nos estágios de desenvolvimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi*, tem sido relatadas por vários autores (Schmidt et al., 2006; Moriarity et al., 2007; Setzer et al., 2007; Wright et al., 2007; Josh et al., 2010).

Inúmeros fatores acarretam variações na quantidade e constância da composição de metabólitos secundários, como fatores ambientais e climáticos, poluição atmosférica, irradiação solar, solo, quantidade de água, bem como fatores inerentes à própria planta, como idade e ciclo de desenvolvimento. A influência das condições climáticas na biossíntese de metabólitos secundários em espécie da família Lauraceae foram observados por Taveira et al. (2003). Logo, pode-se dizer que a época de coleta ou

colheita de uma planta odorífera é um dos fatores de maior importância quando objetiva-se alcançar uma matéria-prima de qualidade e com concentrações desejáveis de compostos ativos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

A caracterização química de *Nectandras* é ainda pouco estudada, considerando a sua diversidade de plantas nos mais diversos biomas. Citações relatam como componentes majoritários em *N. salicina*, o α -pineno, viridifloreno β -cariofileno e o sesquiterpeno oxigenado atractilona foram os constituintes majoritários encontrados nas folhas e nos galhos atractilona e germacreno D. (Chaverri & Cicció, 2009), em *N. augustifolia*, p-menta-1(7), 8-dieno e α -terpinoleno, (Torres et al., 2005), em *N. umbrosa* (Kunth) Mez foi encontrado cadinol, germacreno B e espatulenol no óleo essencial dos frutos (Valley & Scora, 1999) e em *N. rigida* (Kunth) Nees, os constituintes majoritários foram α -felandreno e β -felandreno (Moraes et al., 1971).

Notando-se a escassez de pesquisas que caracterizem os óleos essenciais e sua potencialidade biológica em espécies do gênero *Nectandra*, o presente estudo objetivou analisar o rendimento, a composição química e a atividade microbiológica dos óleos essenciais de *Nectandra megapotânica* (Spreng.) Mez, *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees, *Nectandra lanceolata* Nees & Mart. nas quatro estações do ano.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização do local e do material vegetal

Folhas de *N. megapotânica* e *N. grandiflora* foram coletadas na Fazenda Experimental Edgardia (latitude: 22° 49'S, longitude: 48° 23'W e a altitude variando entre 500 e 800 m) e a *N. lanceolata* na Fazenda Lageado (latitude 22° 53' altitude 48° 29' e altitude 966m), ambas pertencente à Universidade Estadual Paulista UNESP/Campus de Botucatu no Estado de São Paulo. As matas da Fazenda Edgardia enquadram-se na unidade fitogeográfica denominada Floresta Estacional Semidecidual (IBGE, 1991) ou no tipo Floresta Mesófila Semidecídua (RIZZINI, 1979).

As espécies caracterizaram-se como árvores perenifólias, de aproximadamente 15 m de altura, com tronco ereto, mais ou menos cilíndrico, com cerca de 50 a 70 cm de diâmetro à altura do peito (DAP).

As coletas das folhas de cada espécie foram realizadas no meio de cada estação do ano, nos meses de agosto e novembro do ano de 2012 e fevereiro e maio de 2013, correspondendo à época de inverno, primavera, verão e outono. Para a retirada das amostras, consideraram-se cinco indivíduos para as espécies *N. megapotânica* e *N. lanceolata* e quatro indivíduos para a espécie *N. grandiflora*, que foram as mesmas

árvores utilizadas durante todo o experimento. As folhas retiradas, cerca de 1.5 kg, de modo aleatório em toda a planta, procurando selecionar as folhas quando já estavam bem desenvolvidas, expandidas e verdes. Após a coleta, o material foi homogeneizado, seco em estufa de circulação forçada de ar com temperatura de 40°C e triturado manualmente.

Foram preparadas exsiccatas de *N. megapotamica*, *N. grandiflora* e *N. lanceolata*, que foram identificadas por Mariana Esteves Mansanares e depositadas no Herbário “Irina Delanova Gemtchüjnicov” – BOTU, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, sob os respectivos números de registro 30066, 30011, 30067.

2.2 Extração e análise do óleo essencial

2.2.1 Extração do óleo essencial

A extração dos óleos essenciais das folhas foi realizada por hidrodestilação em aparelho Clevenger, utilizando-se 100 g de matéria seca em 1000 mL de água destilada por um período de 120 min. Para o cálculo do rendimento de óleo essencial, foram feitas extrações em triplicata de cada repetição. O óleo extraído foi armazenado em frascos eppendorf, protegido da luz e refrigerado a 0°C para posteriores análises.

2.2.2. Análise dos óleos essenciais

As análises quantitativas (método de normalização de área) dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC/DIC, Shimadzu, modelo GC-2010), equipado com coluna capilar de sílica DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Utilizou-se o hélio como gás de arraste, vazão de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 230 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C com uma rampa de temperatura de 3° C/min até 240 °C. O óleo essencial (1 µL) foi diluído em acetato de etila (1mL), grau cromatográfico e injetado 1,0 µL de solução, no modo split (1:20).

As análises qualitativas dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS, Shimadzu, modelo QP-5000) operando por impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com um intervalo de aquisição de massas de 40-500 m/z. As condições cromatográficas foram as mesmas empregadas nas análises quantitativas.

As substâncias foram identificadas por comparação dos seus espectros de massas com dados de literatura (Adams, 2007) e a biblioteca do sistema GC/EM (Wiley 139.Lib) e os índices de retenção (IR) determinados por meio da injeção de uma série de

n-alcanos, C₉-C₂₄ (Sigma Aldrich 99%) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (Van Den Dool & Kratz, 1963).

2.3 Atividade antimicrobiana pelo método de concentração inibitória mínima (CIM)

As linhagens padrões de *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (37°C por 24 horas). Após, realizou-se a padronização na escala 0,5 de MacFarland, obtendo, assim, concentrações ao redor de 105 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Placas de microdiluição (96 poços) contendo 200 µL de meio Muller Hinton (MH) (acrescido de Tween 80 a 0,5%) foram utilizadas na técnica. Volumes do óleo essencial de cada espécie de lauráceas coletadas referentes às diferentes concentrações a serem testadas foram adicionados ao meio MH. As placas foram incubadas a 37°C pelo período de 24 horas. Para verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais utilizou-se quatro repetições nas quatro épocas de coleta.

As concentrações testadas foram: 0,5%; 1%; 2%, 3%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10% e 10,5%, para *Escherichia coli*, e: 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%, 1,5%, 2% e 3% para *Staphylococcus aureus*. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A verificação do crescimento bacteriano foi realizada com a adição de 50 µL do indicador de óxi-redução resazurina a 0,01%, seguido da anotação dos valores de CIM para cada linhagem bacteriana frente aos óleos essenciais testados. As menores concentrações sem crescimento aparente foram definidas como as concentrações que inibem completamente o crescimento bacteriano.

4. Análise Estatística

Os resultados de rendimento dos óleos essenciais e a análise do CIM das espécies foram analisados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) de probabilidade (Assistat Beta 7.7). Para a análise de composição química utilizou-se o programa GENES. A análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$) com auxílio do programa GENES.

5. Resultados e Discussão

O período do experimento foi caracterizado por temperaturas médias elevadas (20 -24°C), e precipitação acentuada durante a primavera e o verão (± 132 mm).

5.1 Rendimento e composição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais caracterizaram-se pela coloração levemente amarelada. As espécies estudadas apresentaram baixos rendimentos de óleo essencial, variando entre 0.03% a 0.2%.

Analisando-se a interação entre as espécies e a época de coleta, observa-se que esta foi significativa e que os óleos essenciais das espécies variaram o rendimento no decorrer do ano. As espécies *N. lanceolata* e *N. grandiflora* mostraram diferença significativa entre as épocas de coleta, além de apresentarem variações similares entre os seus rendimentos. Já o rendimento da espécie *N. megapotâmica* foram baixos e mostraram valores semelhantes entre as estações do ano ($\pm 0.036\%$). Comparando-se as épocas de coleta, as estações da primavera e do outono destacaram-se entre as espécies, em especial a *N. grandiflora* e *N. lanceolata*, enquanto no inverno observaram-se os menores rendimentos (Figura 1).

Em relação à espécie *N. grandiflora*, os valores observados foram inferiores aos verificados por Silva (2013). O autor verificou que o rendimento de óleo essencial (OE) médio da espécie foi cerca de 0.51% e o observado neste experimento foi 0.33%. Porém, os dados corroboram quando se considera a sazonalidade, na primavera houve maior rendimento de OE, sendo também o período que coincide com a floração da planta. O inverso é verificado para o inverno, sendo a época de menor rendimento, e que a planta se encontrava em estágio vegetativo.

Este é o primeiro estudo avaliando o rendimento na espécie *N. lanceolata*, e notou-se que esta espécie também é influenciada pela sazonalidade, sendo que nas estações da primavera e outono apresentam maiores rendimentos (0.17%), as plantas estavam em época de florescimento, e na época do outono, quando as plantas se encontravam em estágio vegetativo.

Teores de OE sem variação significativa durante o ano em *N. megapotâmica* também foram obtidos por Brito (2009).

Estudos verificaram que os compostos voláteis alteram os rendimentos com a sazonalidade em espécies da família Lauraceae (Silva, 2013; Castelani et al., 2006; Brito, 2009; Taveira et al., 2003;). Estudo realizado por Cunha (2011) com *Aniba rosaeodora* Duckey, observou que a estação seca, na região da Amazônia, pode ser considerada a mais produtiva no teor de óleos essenciais (cerca 1,84%) e no teor do componente majoritário do óleo essencial, o linalol (76,69%). O autor inferiu que

quanto maior for o teor de umidade, maior a quantidade de substância liberada no ambiente.

Assim pode-se dizer, que por mais que as espécies sejam próximas sob o ponto de vista taxonômico, a quantidade e o rendimento de OE muitas vezes são dependentes de características inerentes à espécie, suas fases fenológicas e mudanças climáticas.

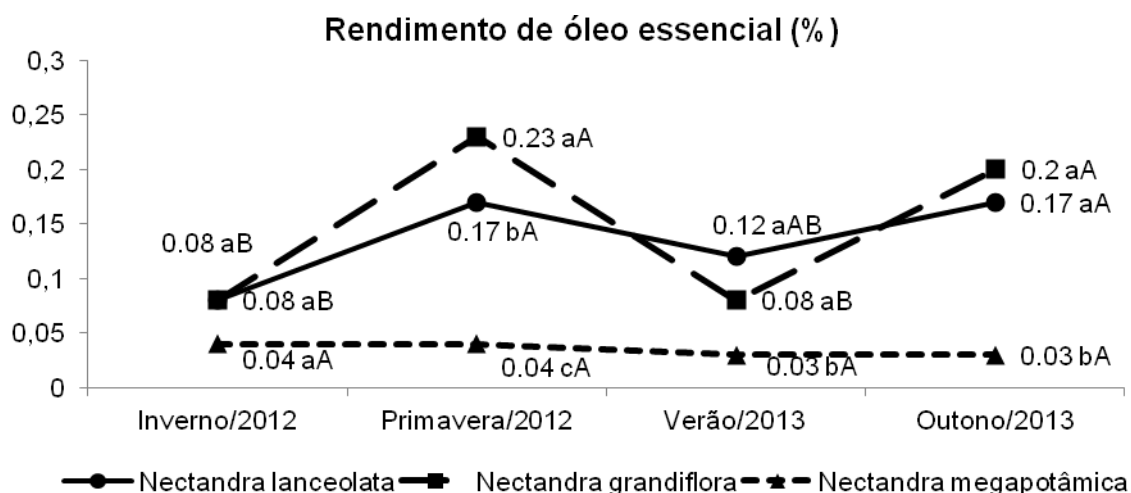


Figura 1- Rendimento de óleo essencial (%) de espécies de lauráceas do gênero *Nectandra* em função com a sazonalidade

*Médias seguidas por mesma letra não diferenciam-se pelo Teste de Tukey ($p < 0,1$), sendo que as letras maiúsculas se referem à influência da sazonalidade e as minúsculas comparam-se as espécies.

5.2 Composição química dos óleos essenciais

Quanto à análise de composição química dos óleos foram identificados substâncias das seguintes classes: hidrocarboneto monoterpênico, monoterpêno oxigenado, hidrocarboneto sesquiterpênico e sesquiterpêno oxigenado. Nota-se que a composição química do óleo essencial das espécies *N. grandiflora* e *N. lanceolata* (Figura 2) é semelhante. Ambas possuem maior proporção relativa de substâncias pertencentes à classe dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos oxigenados (57.7 a 62.2% para *L. grandiflora*; 44.9 a 58.2% para *L. lanceolata*), apresentando como substâncias majoritárias o espatulenol (11.1 a 20.5% e 7.6 a 20.2%, para *L. grandiflora* e *L. lanceolata*, respectivamente) e isobiciclogermacrenal (*L. grandiflora*: 27.8 a 39.60%; *L. lanceolata*: 30.0 a 41.8%).

Comparando-se o perfil dos óleos essenciais da espécie *N. megapotamica* com as outras duas espécies observou-se divergência (Figura 2), uma vez que, estes

apresentam como classes mais abundantes os hidrocarbonetos monoterpênicos (40.3 a 62.0%) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (27.0 a 44.2%). Dentre as substâncias majoritárias encontram-se o α -pineno (10.5 a 25.1%) e β -pineno (9.6 a 22.3%) (Tabela 1).

Os constituintes majoritários encontrados em *N. megapotamica* corroboram com o estudo da composição química na espécie realizado por Amaral et al. (2012), onde identificaram as substâncias biciclogermacreno, α -pineno e β -pineno nas concentrações de 31,80%; 21,06% e 15,37% respectivamente e diferem dos detectados por Brito (2009). Isto comprova a grande diversidade de substâncias químicas voláteis sintetizadas pela espécie.

Com relação à sazonalidade, observou-se homogeneidade das substâncias químicas com as épocas de coleta das três espécies. Os componentes majoritários das espécies exibem uma pequena variação em relação à proporção relativa, porém, a maioria destes, não apresentou diferença significativa (Tabela 1). De uma maneira geral, observou-se que somente a espécie *N. lanceolata* exibiu variações entre os compostos majoritários, sendo que o espatulenol expressou maior teor no inverno e o isobiociclogermacreno apresentaram maiores teores nas épocas de primavera e outono.

Comportamento semelhante foi observado em óleo essencial das folhas *Laurus novocanariensis* na estação da primavera e outono, não exibindo grandes diferenças entre os constituintes, com exceção da presença dos compostos α -felandreno, δ -cadineno e espatulenol em pequenas concentrações na estação da primavera (Rodilla et al., 2008).

Resultados obtidos no experimento estão de acordo com Silva (2013), o qual não verificou influência da sazonalidade sobre a composição química do OE das folhas de *N. grandiflora*. Os autores sugerem que a pequena variação observada entre as amostras pode ser devida em grande parte aos fatores genéticos dos indivíduos analisados.

Entretanto, o principal composto constatado pelo autor foi o deidrofuquinona, já no presente estudo, este composto não foi detectado e o isobiciclogermacrenal evidenciou-se em todas as coletas. Por sua vez, resultados obtidos por Brito (2009) não exibiram alterações na composição química e no rendimento do OE durante a sazonalidade em *N. megapotamica*, entretanto, o autor evidenciou a variabilidade química entre indivíduos da mesma espécie.

Outros exemplos com espécies medicinais não pertencentes à família Lauraceae, também são relatados pela variação sazonal na síntese dos seus metabólitos secundários,

como é o caso da *Siparuna guianensis* Aubl. A espécie diminuiu a produção de óleo essencial no período vegetativo, e aumentou nos meses reprodutivos (Valentini et al., 2010). O constituinte majoritário da espécie *Artemisia annua* L., a artemisinina, também está presente em maiores concentrações no período vegetativo, e em maior quantidade nas folhas do que nos galhos (Gupta et al., 2002).

Tabela 1 – Composição química média (%) dos óleos essenciais das espécies de *Nectandra* em função da sazonalidade (1. Inverno/2012; 2. Primavera/2012; 3. Verão/2013 e 4. Outono/2013).

Substâncias	<i>Nectandra grandiflora</i>				<i>Nectandra lanceolata</i>				<i>Nectandra megapotâmica</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
α -pineno	0,6a	0,3ab	0,1b	0,5ab	1,4a	1,0a	0,5a	0,6 ^a	20,5a	18,2a	10,5a	25,1a
Canfeno	—	—	—	—	0,2a	0,1a	0,1a	0,1 ^a	0,8a	0,6a	0,3a	0,9a
Sabineno	—	—	—	—	0,1a	0,1a	0,1a	0,1 ^a	—	—	—	—
β -pineno	0,4a	0,2ab	0,0b	0,3a	1,3a	0,9a	0,5a	0,5 ^a	18,5a	16,2a	9,6a	22,3a
Mirceno	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1a	1,6a	1,3a	1,4a
α -felandreno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4a	10,0a	11,0a	0,3a
Limoneno	0,4a	0,3a	0,1a	0,3a	0,4a	0,3a	0,2a	0,2 ^a	5,8a	7,3a	5,5a	7,7a
1,8 cineol	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1a	1,9a	1,3a	1,3a
Z- β -ocimeno	—	—	—	—	0,1a	0,3a	0,2a	0,2 ^a	—	—	—	—
(E)- β -ocimeno	0,1b	0,2ab	0,1b	0,7a	0,7b	1,8a	1,3ab	1,7ab	0,8a	1,2a	0,7a	2,5a
Terpinoleno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2a	0,3a	0,1a	0,5a
Linalol	0,4a	0,4a	0,4a	0,5a	3,3a	0,7a	1,9a	1,0a	—	—	—	—
terpinen-4-ol	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1a	0,3a	0,2a	0,3a
cis-3-hexenil butanoato	0,2a	0,2a	0,2a	0,3a	0,2a	0,1a	0,3a	0,2 ^a	0,1a	0,0a	0,0a	0,3a
(3Z)-hexenil-2-metilbutanoato	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1a	0,3a	0,1a	0,5a
acetato de isobornila	—	—	—	—	0,2a	0,0a	0,1a	0,1 ^a	—	—	—	—
δ -elemeno	0,4b	0,9ab	0,6b	1,5a	—	—	—	—	0,4a	0,3a	0,5a	0,3a
α -cubebeno	—	—	—	—	—	—	—	—	4,2a	3,5a	5,8a	3,6a
α -copaeno	—	—	—	—	—	—	—	—	3,6a	2,0ab	2,7ab	1,8b
β -bourboneno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1a	0,1a	0,2a	0,2a
β -cubebeno	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8a	1,3a	1,9a	0,9a
β -elemeno	0,2ab	0,3ab	0,1b	0,4a	0,2a	0,0a	0,0a	0,0a	0,1a	0,0a	0,0a	0,0a
trans-cariofileno	0,7a	0,9a	0,5a	0,9a	—	—	—	—	5,6a	4,1a	4,6a	3,0a
α -humuleno	0,2a	0,1a	0,1b	0,1a	—	—	—	—	2,1a	1,6a	2,2a	1,3a
allo-aromadendreno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,7ab	0,7ab	1,1a	0,5b
γ -muuroleno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,6a	0,5a	0,7a	0,5a

Substâncias	<i>Nectandra grandiflora</i>				<i>Nectandra lanceolata</i>				<i>Nectandra megapotaâmica</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
β-selineno	2,8a	2,6a	3,0a	2,3a	3,9a	5,6a	3,5a	3,1 ^a	—	—	—	—
biciclogermacreno	1,1bc	2,9ab	0,8c	4,2a	5,2a	12,6a	4,8a	5,5 ^a	10,6a	8,7a	14,8a	9,1a
α-muuroleno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2a	0,1a	0,2a	0,0a
germacreno A	0,0a	0,0a	0,0a	0,1a	—	—	—	—	—	—	—	—
δ-amorfenol	—	—	—	—	—	—	—	—	0,7a	0,7a	1,0a	0,9a
7-epi-α-selineno	0,1a	0,1a	0,0a	0,1a	—	—	—	—	—	—	—	—
δ-cadineno	—	—	—	—	—	—	—	—	2,7a	1,7a	1,9a	1,3a
elemol	0,3a	0,3a	0,3 ^a	0,3a	0,2a	0,2a	0,1a	0,1 ^a	—	—	—	—
germacreno B	—	—	—	—	0,1a	0,3a	0,3a	0,4 ^a	—	—	—	—
espatulenol	20,5a	13,3bc	18,5ab	11,1c	20,2a	7,6a	15,9a	11,9 ^a	3,2a	4,1a	5,5a	4,1a
óxido de cariofileno	3,3ab	1,9bc	4,4 ^a	1,5c	1,8a	1,0a	1,5a	1,7 ^a	1,2a	1,4a	1,7a	1,3a
1-epi-cubenol	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1a	0,1a	0,1a	0,2a
muurolo 4,10 (14) dien 1-β-ol	2,8a	3,3a	1,9 ^a	3,2a	—	—	—	—	—	—	—	—
cubenol	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2a	0,2a	0,4a	0,3a
α-murolo	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1a	0,1a	0,2a	0,2a
β-eudesmol	1,0a	0,8a	1,4 ^a	0,9a	—	—	—	—	0,2a	0,1a	0,3a	0,3a
α-eudesmol	0,2a	0,5a	0,3 ^a	0,5a	—	—	—	—	—	—	—	—
epi-zizanona	3,0a	3,1a	3,2 ^a	3,0a	1,8a	2,1a	2,4a	2,6 ^a	—	—	—	—
isobiciclogermacrenal	29,6ab	39,1a	27,8b	39,6a	30,0a	34,1a	34,3a	41,8 ^a	—	—	—	—
rosadieno	15,1a	11,6a	16,6a	11,2a	6,1a	3,9a	4,5a	3,6 ^a	—	—	—	—
kaureno	5,0a	3,9a	4,3 ^a	2,2a	3,1a	2,7a	2,5a	1,1 ^a	—	—	—	—
Hidrocarboneto monoterpênico	1,4	1,1	0,3	1,8	4,2	4,5	2,8	3,3	49,2	57,3	40,3	62
Monoterpeno oxigenado	0,5	0,6	0,5	0,8	3,7	0,9	2,2	1,2	0,4	0,6	0,3	1,1
Hidrocarboneto sesquiterpênico	6,2	7,9	5,4	9,7	10	19,4	9,1	9,5	40,6	30,4	44,2	27
Sesquiterpeno oxigenado	60,7	62,2	57,7	60,1	53,8	44,9	54,2	58,2	5	6	8,2	6,4
Outras classes	20,1	15,5	20,9	13,4	9,1	6,7	7	4,7	0	0	0	0
Total identificado	89	87,3	84,8	85,9	80,8	76,3	75,4	76,9	95,1	94,3	93	96,5

*Médias seguidas por letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste comparativo de médias pelo Teste de Tukey (p<0,5)

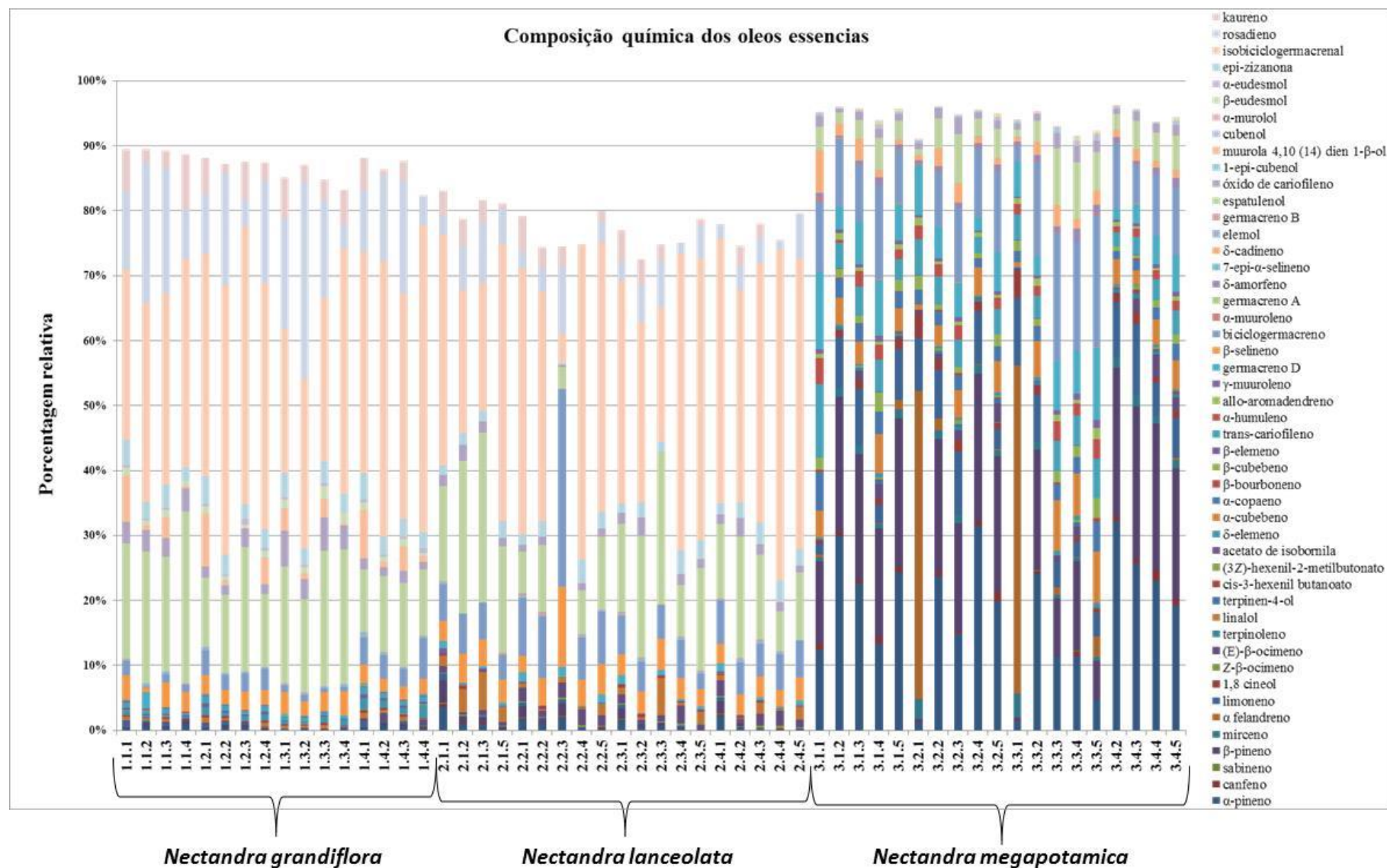


Figura 2. Composição química dos óleos essenciais de todos os indivíduos de três espécies de *Nectandra* coletados em função da sazonalidade.

5.3 Atividade antimicrobiana pelo método de concentração inibitória mínima (CIM)

Nos resultados de concentração mínima inibitória (CIM), nota-se que houve resposta positiva à aplicação dos óleos essenciais frente às duas bactérias. A interação foi significativa entre OE das lauráceas com as épocas de coleta, somente para a *E. coli*. As concentrações dos óleos essenciais necessários para a inibição do crescimento bacteriano foram maiores para a *E. coli* (Gram negativa) do que para a *S. aureus* (Gram positiva).

Observa-se que quanto menor a concentração de OE, maior a sensibilidade da bactéria frente aos componentes do óleo essencial, e consequentemente, maior o seu poder antibacteriano. De uma maneira geral as duas bactérias foram sensíveis à época do inverno e da primavera, sendo necessária menor concentração do óleo essencial das lauráceas para inibir o crescimento das bactérias. A espécie que se destacou no ensaio biológico contra a bactéria *E. coli* foi a *Nectandra megapotâmica*. Já a espécie *Nectandra lanceolata* apresentou melhor atividade para a bactéria *S. aureus*. Em relação à época de coleta, os resultados apresentados mostraram que para a *E. coli* a época do inverno e primavera exigiu menores concentrações de OE para controlar a cepa bacteriana (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes óleos essenciais de Lauráceas em função com a sazonalidade frente à cepa padrões ATCC de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Tratamentos	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Espécies	Concentração OE (% v/v)	
<i>Nectandra lanceolata</i>	8.12 a	0.60 b
<i>Nectandra grandiflora</i>	7.81 a	2.27 a
<i>Nectandra megapotamica</i>	4.37 b	1.68 a
Significância (ANOVA)	**	**
Estações		
Inverno/2012	5.41 b	1.18 a
Primavera/2012	4.58 b	1.46 a
Verão/ 2013	9.00 a	1.45 a
Outono/2013	8.08 a	1.98 a
Significância (ANOVA)	**	ns
Espécie x Estação	**	ns

* Médias seguidas por letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste comparativo de médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,1$).

Os dados obtidos em *N. megapotâmica* corroboram com Brito (2009). O autor verificou inibições acima de 96% para a bactéria *S. aureus*, mostrando-se praticamente constante em todos os meses analisados. Outro estudo inferindo potencial ação antimicrobiana frente à *S. aureus* em OE de *N. grandiflora* foi realizado por Cunico et al. (2010). Sartoratto et al. (2004) sugerem que a presença de monoterpenos como linalol, eugenol e timol, poderiam causar perturbações nas membranas das bactérias. Observou-se para a espécie *N. megapotâmica* a grande presença hidrocarbonetos monoterpenicos, o que pode ter influenciado sua resposta positiva frente à bactéria *S. aureus*.

Este é o primeiro ensaio envolvendo a espécie *N. lanceolata*, a espécie exibiu grande potencial antibacteriano frente à bactéria gram-positiva e maior concentração de sesquiterpeno oxigenado em sua composição química. Todavia, inferir maior ou menor concentração de componetes químicos à atividade antibacteriana é arriscado, já que o OE é uma mistura diversificada em substâncias voláteis que ligadas umas às outras podem induzir ou não a atividade antimicrobiana. Assim, pode-se dizer, que as três espécies estudadas sugerem que as substâncias ativas presentes no OE possuem grande potencial antimicrobiano, necessitando de estudos complementares e mais aprofundados.

Dados da literatura evidenciam que outras espécies da família possuem atividade antimicrobiana comprovada. Simié et al. (2004) estudaram a atividade antifúngica de óleos essenciais de quatro espécies de Lauraceae, pelo mesmo método utilizado no presente estudo. Diante dos resultados, definiu-se que as espécies *Cinnamomum zeylanicum* apresentou melhor atividade antifúngica, obtendo concentrações de 0.1µml/ml para várias cepas, logo, em seguida vieram as espécies *Aniba roseodoara* e *Sassafras albidum*. Hamer et al. (1999) já havia citado o efeito antifúngico de *Aniba roseodora* apresentando as porcentagens de 0.12% e 0.25%, para inibir o crescimento de *E.coli* e *S.aureus*, respectivamente.

Óleos essenciais de outras espécies nativas do Himalaia exibiram efeito antimicrobiano contra *S. aureus* e *P. multocida*, como a *Lindera pulcherrima*, *Dodecadenia grandiflora* e *Persea gamblei*. Enquanto que para a *E.coli*, somente a *Persea gamblei* mostrou-se eficiente no controle da bactéria. (Josh et al., 2010). Outra espécie largamente estudada acerca do OE, *Rosmarinus officinalis*, confirmou a influência dos fatores extrínsecos e intrínsecos como determinantes na ação antimicrobiana dos óleos essenciais, que relacionou o aumento da atividade

antimicrobiana do óleo essencial em amostras coletadas na primavera (Celiktaş et al., 2007).

6. Conclusões

Concluiu-se que os rendimentos de óleo essencial nas quatro estações do ano variaram somente para as espécies *N. lanceolata* e *N. grandiflora*. Estas duas espécies também caracterizaram-se pela semelhança na composição química do OE, enquanto a espécie *N. megapotâmica* apresentou diferença em seu perfil químico. A sazonalidade interferiu na síntese do OE somente para a *N. megapotâmica*.

As espécies se mostraram promissoras no controle das duas cepas de bactérias, sendo que a *N. megapotâmica* e a *N. lanceolata* apresentaram eficiência no controle no crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. A época influenciou a atividade antibacteriana somente para a bactéria *E. coli*., sendo que o inverno e a primavera sobressaíram-se das demais.

7. Referências bibliográficas

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Illinois: Allured Publishing Corporation,

AMARAL, L.P.; BIANCHINI, N.; SCHINDLER, B.; FERREIRA, R. A.; LONGHI, S. J.; HEINZMANN, B.M. A importância da fenologia de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez na produção de óleos essenciais. In: **VI Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais, 2012**, Ponta Grossa. VI Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais, 2012.

BHAVANANI, S. M.; BALLOU, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, Salt Lake City, v. 3, n. 5, p. 528-553, 1992.

BRITO, A. F. R. Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2009.

CASTELANI, D.C.; CASALI, V. W.D.; SOUZA, A. L.; CECON, P. R.; CARDOSO, C. A. MARQUES, V. B. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorífera* Vell.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. **Revista Planta Medica**, v. 8, n. 4, p. 104-107, 2006.

CELIKTAŞ, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDİR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.

CHAVERRI, C., CICCIO, J.F. Essential oils of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. **Revista de Biología Tropical**, v. 53 p. 431-436. 2005

CUNICO, M. M. VIEIRA, G.; LIMA, C. P.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; AUER, C. G.; SANQUETTA, C. R. Estudo preliminar antimicrobiano e fitoquímico do óleo essencial foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EDUCATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 2010, Curitiba. Anais... Curitiba, Brasil: UFPR, 2010.

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

GUPTA, S. K. et al. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua*. **Industrial Crops and Products**, v. 16, p. 217-224, 2002.

JOSHI, S. C.; VERMA, A. R.; MATHELA, C. S. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 37-40, 2010.

Hammer, K. A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, 1999.

MORAIS, A. A.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MOURA, L. L.; SILVA, M. L.; MARX, M. C.; MENDES, P. H.; MAGALHÃES, M. T. Óleos terpênicos do Estado do Rio de Janeiro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 44, supl., p. 320-322, 1972.

MORIARTY, D. M.; BANSAL, A.; COLE, R. A.; TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Selective cytotoxic activities of leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Products Communications**, Westerville, v. 2, p. 1263-1268, 2007.

RIZZINI, C. T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil**: aspectos sociológicos e florísticos. São Paulo: HUCITEC/EDUSP, 1979. 374 p.

RODILLAA, J. M.; TINOCOB, M. T.; MORAIS, J. C.; GIMENEZ, C.; CABRERA, R.; MARTÍN-BENITO, D.; CASTILLO, L.; GONZALEZ-COLOMA, A. *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, 2008.

SCHMIDT, E.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ELLER, G. A.; STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; GEISLER, M. Composition and antioxidant activities of the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) leaves from Sri Lanka. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, Berlim, v. 9, p. 170-182, 2006.

SCHUH, G.; HEIDEN, A. C.; HOFFMAN, T.; KAHL, J.; ROCKEL, P.; RUDOLPH, J.; WILDT, J. Emissions of volatile organic compounds from sunflower and beech: dependence on temperature and light intensity. **Journal of Atmospheric Chemistry**, New York, v. 27, n. 3, p. 291-318, 1997.

SETZER, W. N.; STOKES, S. L.; PENTON, A. F.; TAKAKU, S.; HABER, W. A.; HANSELL, E.; CAFFREY, C. R.; MCKERROW, J. H. Cruzain inhibitory activity of the leaf essential oil of Neotropical Lauraceae and essential oil components. **Natural Production Communication**, Westerville, v. 2, p. 1203-121, 2007.

SHAO, M.; CZAPIEWSKI, K. V.; HEIDEN, A. C.; KOBEL, K.; KOMENDA, M.; KOPPMANN, R.; WILDT, J. Volatile organic compound emissions from Scots pine: mechanisms and description by algorithms. **Journal Geophysical Reserch**, Hoboken, v. 106, n. 17, p. 483- 491. 2001.

SILVA, D. T. Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2013.

SIMIĆ, A.; SOKOVIĆ, M. D.; RISTIĆ M.; GRUJIĆ-JOVANOVIĆ, S.; VUKOJEVIĆ, J.; MARIN, P. D. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, p. 713-717, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 1999. 819 p.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n.1, p. 275-280, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAVEIRA, F. S. N.; LIMA, W. N.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 31, n. 69, p. 69-75, 2003.

TORRES, A. M.; RICCIARDI, G. A. L.; AGRELO, D. E.; NASSIF, A. E.; RICCIARDI, A. I. A.; DELLACASSA, E. **Examen del aceite esencial de Nectandra angustifolia (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees**. Argentina: Universidad Nacional de Nordeste, 2005. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, E-013).

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. D. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 158, p. 811-832, 2001.

VALENTINI, C. M. A. et al. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da Siparuna guianensis Aublet. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1506-1509, 2010.

VALLEY, P. S. M.; SCORA, C. A. R. W. Phytochemistry of Nectandra umbrosa Berries, Cloudforest Food of the Resplendent Quetzal. **California Avocado Society, Yearbook**, San Juan Capistrano, v. 83, p. 163-171, 1999.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the relation index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**. Amsterdam, v. 11, p. 463-467, 1963.

WRIGHT, B. S.; BANSAL, A.; MORIARITY, D. M.; TAKAKU, S.; SETZER, W. N.; Cytotoxic leaf essential oils from Neotropical Lauraceae. **Natural Product Communication**, Westerville, v. 2, p. 1241-1244, 2007.

Capítulo 3: Efeito das doses de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento e na qualidade de estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) cultivados em vasos

Ferraz, E.O.¹; Zanini, P. ²; Nicoletto, C. ²; Sambo, P. ² ; Lima, G. P. P. ¹

1 Departamento de Agronomia/ Horticultura, Botucatu, Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho”, Parque Residencial Primavera – CEP 18610307 - Botucatu, SP

2 Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE), Agripolis – Università degli Studi di Padova, Viale dell’Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy

RESUMO

Os estudos que avaliam os aspectos agronômicos na produtividade, qualidade e economia em *Stevia rebaudiana* Bertoni são escassos na Europa. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes doses de três macronutrientes (NPK) na produtividade, absorções de nutrientes, teor de esteviosídeo e rebaudiosídeo, em folhas e caules de estévia. Para estes fins, os tratamentos avaliados foram três doses de nitrogênio (0.10, 0.25 e 0.40 g/L de N, com fertirrigação semanal), três doses de fósforo (0.5, 1.0 e 1.5 g/planta P₂O₅ e três doses de potássio (1.5, 3.0 e 4.5 g/planta de K₂O) ambos distribuídos no momento do transplante. As plantas foram cultivadas em vasos, em casa de vegetação em filme plástico durante o período de primavera-verão de 2014. Observou-se que as doses de macronutrientes apresentam influência positiva no acúmulo de matéria seca de caule e folhas em *S. rebaudiana*. A dose mais apropriada foi de 0.25 g/L N, 0.5 g/planta P e 1.5 g/planta K. O conteúdo de glicosídeos de esteviol apresentaram pouca variações entre os tratamentos, no entanto, é significativamente diferente quando associada com a produtividade de massa seca.

PALAVRAS-CHAVE: Macronutrientes; matéria seca; absorção de nutrientes, produtividade, esteviosídeo.

ABSTRACT

Studies that evaluate the agronomic aspects on yield, quality and economic in *Stevia rebaudiana* Bertoni are scarce in Europe. The purpose of the present study was to evaluate the influence of different doses of the three macronutrients on productivity, nutrient uptakes, steviol and rebaudioside glycoside, in leaves and stem of stevia. For these purposes, the evaluated treatments were three doses of nitrogen (0.10, 0.25 and 0.40 g/L of N, throughout weekly fertigation), three doses of phosphorus (0.5, 1.0 and 1.5 g/plant P₂O₅ distributed at transplant) and three doses of potassium (1.5, 3.0 and 4.5 g/plant of K₂O distributed at transplant). Plants were grown in pots, in a plastic-film

greenhouse during the period of spring-summer 2014. We observed that the doses of macronutrients had positive influence in the accumulation of dry matter of stem and leaves in *S. rebaudiana*.

The most appropriate dose was N 0.25 g/L, P 0.5 g/plant e K 1.5 g/plant. The stevioside content had little variation among treatments, however, is significantly different when associated with productivity.

KEYWORDS: Macronutrients; dry matter; nutrient uptake, productivity, stevioside.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma erva perene que pertence à família Asteraceae. A estévia foi originalmente cultivada na América do Sul, particularmente na fronteira entre Brasil e Paraguai, onde é conhecida como folha mel ou Kaa-he-e. Os povos nativos utilizaram o extrato de estévia como adoçante na medicina tradicional por centenas de anos (Soejarto, 2002). Atualmente o cultivo da espécie espalhou-se para outras regiões do mundo, incluindo o Canadá e algumas partes da Ásia e da Europa (Amzad-Hossain et al., 2010). Entretanto, em seu habitat natural a estévia é uma planta rara (Brandle & Telmer, 2007). A produção comercial da espécie e pesquisas que otimizem as técnicas de cultivo é incipiente para as condições edafoclimáticas da Europa, em especial no Norte da Itália.

A espécie é conhecida por seu alto teor de diterpenos nas folhas com teores variando entre 4% a 20% e estes compostos são responsáveis pelo sabor adocicado da planta. Dentre as 230 espécies pertencentes ao gênero *Stevia*, somente a espécie *S. rebaudiana* e *S. phlebophylla* produzem glicosídeos de esteviol (Lemus-Mondaca et al., 2012; Prakash et al., 2008; Brandle & Telmer, 2007).

O esteviosídeo é 300 vezes mais doce do que a sacarose e está presente de 60% a 70% do total dos glicosídeos produzidos pela espécie. O sabor adocicado do rebaudiosídeo A é similar ao sabor adocicado que a sacarose provoca, todavia, este apresenta-se com o poder adoçante de 450 vezes a mais que a sacarose (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009).

O extrato de estévia possui ampla aplicação industrial, pode ser largamente usado na indústria de alimentos e também na indústria farmacêutica (Rank & Midmore, 2006).

Devido à presença de esteviosídeo, o extrato de estévia pode auxiliar no tratamento de diabetes mellitus, obesidade, hipertensão e prevenção da cáries (Pol et al.,

2007). De acordo com a literatura, outros glicosídeos que são encontrados na planta, tais como rebaudiosídeo A, esteviol e isoesteviol, podem oferecer benefícios terapêuticos complementares e ter ação anticancerígena, antiinflamatória e imunomoduladora (Mondaca-Lemus et al., 2012).

O uso de glicosídeos de esteviol não possuía restrições em alguns países Asiáticos, da América do Sul, Israel e Rússia. Porém, abordou-se o assunto no ano de 1990 pelas Nações Unidas através do Comitê Científico Internacional de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA). A Comissão preconizou a necessidade de estudos mais aprofundados acerca da espécie em diversos países, incluindo os países europeus. Os resultados foram apresentados às autoridades japonesas e asseguraram o consumo de glicosídeos de esteviol como aditivo alimentar com a recomendação de uma taxa de ingestão diária de 2 mg/kg de peso corporal/dia expresso em esteviol (Rank & Midmore, 2006). O Comitê da Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) aceitou o uso de glicosídeos de esteviol como aditivo alimentar, apenas em 2011.

Devido ao alto teor de glicosídeos a espécie pode representar uma opção de cultivo para as pequenas áreas de plantio, já que, um hectare de *S. rebaudiana* corresponde a cerca de 6-7 hectares de cana ou 11-12 hectares de beterraba sacarina. Assim, o cultivo de estêvia pode contribuir para uma utilização econômica das terras aráveis (Yang et al., 2013).

Devido ao recente interesse no cultivo de estêvia na Europa, suas exigências agronômicas não foram extensivamente estudadas, entretanto, sabe-se que o crescimento e produtividade são intensamente influenciadas pelos nutrientes aplicados. Um dos primeiros estudos aplicando-se a adubação nitrogenada foi realizado por Kawatani et al. (1977), os autores inferiram que o efeito do N promoveu o crescimento da planta, o aumento na espessura do caule e no número de ramos. Por outro lado, a deficiência de N, K e Mg reduziram o crescimento vegetativo em termos de produção de folhas, diminuindo assim, o valor de mercado da planta. A adubação potássica também auxiliou o crescimento da espécie (Kawatani et al., 1980).

A concentração de metabólitos secundários na planta, em especial os glicosídeos de esteviol, é o principal interesse para os produtores de estêvia e a adição de nutrientes durante o cultivo da espécie é associada ao aumento de sua síntese. De acordo com Allam et al. (2001), a adubação nitrogenada aumenta significativamente o teor de esteviosídeos nas folhas de estêvia, em contrapartida, deficiências de K e Ca reduziram a concentração de esteviosídeo (Utumi et al., 1999).

Observando a recente e promissora demanda por matéria prima de qualidade pelo mercado europeu e a necessidade de estudos para estabelecer as técnicas agronômicas que correspondam à produção de biomassa com a síntese de glicosídeos de esteviol, este trabalho veio para preencher parte dessa falta de conhecimento, favorecendo o cultivo extensivo. Em soma, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos sobre a produtividade e aspectos de qualidade em *S. rebaudiana* cultivados em vasos em casa de vegetação, utilizando-se diferentes doses de macronutrientes (N, P, K).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Os tratamentos experimentais

O experimento foi conduzido em estufa plástica na fazenda experimental da Universidade de Pádua (Itália), durante a primavera-verão de 2014.

Quanto ao material vegetal, uma muda foi colocada em 16 de Junho, em vasos de volume de 3L, preenchido com substrato Hawita-Flor Orf Kultur contendo 1 g/L de fertilizante PG Mix 14-16-18. O ensaio consistiu-se de vinte e sete tratamentos, decorrentes da combinação fatorial de três doses de NPK e três repetições. As doses dos macronutrientes utilizados foram: 0.10, 0.25 e 0.40 g/L de N (N1, N2 e N3, respectivamente), com solução de uréia (46% de N), aplicando 0.5 L/planta semanalmente; 0.5, 1.0 e 1.5 g/planta P (P1, P2 e P3, respectivamente) com superfosfato triplo (20,1% de P) aplicados no momento do transplante e as doses de 1.5, 3.0 e 4.5 g/planta (K1, K2 e K3, respectivamente) de K, aplicando-se sulfato de potássio (41,7% de K) no momento do transplante.

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas, em blocos casualizados com três repetições de nove plantas por tratamento (combinação de N, P e K). As doses de N foram relacionadas ao fator principal, as de P e K às subparcelas. A irrigação foi realizada uma vez por dia, mas em dias muito quentes, foi composto por duas vezes.

Realizou-se duas colheitas, a primeira aos 60 dias após o transplante e a segunda após 40 dias da primeira colheita. Pouco antes do início da floração, as plantas foram cortadas a 5 cm do nível do substrato e as folhas foram separadas das hastes. Em seguida, os órgãos das plantas foram pesados antes e depois de secagem em estufa a 65 °C durante 72 horas.

O material vegetal foi moído a 0,2 mm para as análises bioquímicas de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, assim como para a determinação de teores foliares dos macronutrientes. Os teores de glicosídeos de esteviol foram determinados em folhas e

caules separadamente, enquanto que os teores de NPK foram determinados de todos os órgãos da planta.

2.2 A identificação e quantificação dos glicosídeos de esteviol

A determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo-A foi realizada utilizando os métodos Woelwer-Rieck U. et al. (2010) com as modificações apropriadas. Foram extraídos 0,2 g de amostra seca com 50 mL de água desmineralizada deixando em ebulição durante 10 minutos. Subsequentemente, em seguida completou-se o volume para 50 mL e filtrou-se o extrato em papel de filtro. O extrato foi diluído com acetonitrila e filtrado novamente depois injectado no HPLC. A análise foi realizada com cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) que consiste em um sistema de gradiente de cromatografia (Jasco PU-2080 Plus) e um detector DAD (Jasco MD 2015 Plus). Para a separação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A utilizou-se a coluna HILIC Kinetex (150 x 4,6 mm, 2,6 mM, Phenomenex) controlada por termostato a 36 °C. A fase móvel utilizada como agente de eluição consiste em acetonitrilo e água na proporção de 85:15 (v / v) . Para a identificação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A é utilizado o comprimento de onda de absorção máxima dos compostos, a 205 nm. Os dados fornecidos por este sistema foram coletadas e processadas utilizando o software ChromNAV para a LC. A quantificação foi conseguida através da curva de calibração. Os padrões para a curva de calibração foram dissolvidos em acetonitrilo: água 85:15 (v / v) e a curva de calibração foi construída utilizando diluições em série da solução de partida (intervalo 25-100 mg * L⁻¹).

2.3 Determinação dos macronutrientes

A determinação das concentrações de nitrogênio foi realizada com a adoção do método de Kjeldahl. Aproximadamente 0,7 g de amostra foram condicionados em tubos de ensaio com um comprimido KjelTabs (catalisador à base de CuSO₄ e K₂SO₄) e 20 ml de ácido sulfúrico concentrado (96%). Em seguida, os tubos de ensaio foram transferidos para o digestor a temperatura de 450 °C e fervidos por 2 horas. Após, a amostra foi transferida para frascos de 250 ml e preenchido o volume com água deionizada. A leitura do nitrogênio foi realizada através do instrumento do 5000 FIA ESTRELA Foss italiano spa.

A determinação das concentrações de fósforo e potássio na planta foram obtidas pelo método Zancan et al. (2006). A aliquota de 1g de amostra foi colocada na mufla à temperatura de 550 °C durante 6 horas. Subsequentemente, as cinzas foram solubilizados em 5 ml de ácido clorídrico puro e diluídos com água desmineralizada

para obter um volume final de 45 ml. Finalmente, as amostras foram analisadas com um espectrofotômetro de emissão (ICP-AES) Ciros Spectro.

Para a concenctração total de N, P e K multiplicou-se o peso total da parte aérea da planta.

3. A ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados por meio da Análise de Variância. No caso de valores de F significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD ao nível de significância de $P \leq 0.05$. Quando necessário, os valores expressos em porcentagem foram transformados antes da análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento das plantas

Compararam-se os resultados de duas colheitas em relação à produtividade das plantas. Os resultados da primeira e da segunda colheita mostraram que os valores de peso seco de folhas, caule e o peso seco total da parte aérea aumentam quando se aumentam as doses de macronutrientes (Tabelas 1 e 2). Houve diferenças entre o acúmulo de biomassa total nas duas colheitas: 36.8g/planta na primeira e 22.7g/planta na segunda colheita (Tabelas 1 e 2).

O baixo acúmulo de biomassa também pode ser observado para as partes avaliadas, o caule na primeira colheita apresentou massa seca de 26% a mais que na segunda colheita. As folhas exibiram valores ainda mais divergentes, comparando-se as duas colheitas, a primeira sobressaiu-se com 58% a mais de massa seca do que a segunda colheita.

Maior rendimento de biomassa na primeira colheita em estévia também foram relatados por Serfaty et al. (2013), os quais inferem que a menor produção encontrada na segunda colheita se deve a taxa de recuperação relativamente lenta. Esse resultado pode ser atribuído às altas temperaturas durante o ciclo da cultura em Israel, portanto, os autores sugerem uma colheita única no final do verão. De acordo com Pall et al. (2015), a produtividade da espécie, tanto no acúmulo de biomassa seca quanto síntese de metabólitos secundários, são fortemente influenciados pelas condições ambientais prevaletentes e a fertilidade do solo. Entretanto, observou-se que a estévia é muito exigente no que diz respeito aos macronutrientes, especialmente o nitrogênio.

Em nosso estudo observamos que o tempo de floração foi adiado, este fato pode ser associado ao fotoperíodo longo do verão na Itália. Estas observações estão de acordo com Yavad et al. (2010), os autores afirmam que os dias longos podem interferir na

duração da fase vegetativa em estévia. Assim, este fator pode ser considerado extremamente importante no tipo de cultivo para garantir a produtividade da planta desejável. Outro fator que pode ter influenciado a produtividade da espécie foi o curto intervalo de tempo entre as duas colheitas. Geralmente, a planta requer um tempo de crescimento e desenvolvimento para alcançar a produção máxima. Portanto, este tempo de 40 dias entre uma colheita e outra, pode não ter sido suficiente para o pleno desenvolvimento da planta e obtenção da produção.

Neste experimento, o N alterou significativamente o rendimento de biomassa nas folhas, nos caules e na biomassa total à medida que se aumentaram as doses, comprovando a sua relevância para o cultivo de estévia. A dose N2 (0.25 g/L) foi a que melhor se adequou à exigência da espécie, tanto pela produtividade da massa seca, quanto pela economia financeira, já que, foi estatisticamente igual a dose N3. Na segunda colheita houve a acumulação de biomassa nos caules, proporcionalmente com o aumento das doses de N, o que não é interessante para a produção de estévia.

De acordo com Pal et al. (2013), a maior disponibilidade de N no solo pode provocar a indução de hormônios como a citocinina e auxina que irão ativar a divisão e diferenciação celular e conseqüentemente, promover maior crescimento e desenvolvimento de estévia.

Tanto o K, como o P influenciaram diretamente o peso seco dos caules e total. No entanto, plantas tratadas sob o efeito da dose P2 (3.0 g/planta) não apresentaram diferenças significativas em relação a dose mais elevada (4.5 g/planta) em biomassa total. Os resultados do presente estudo não estão de acordo com Pal et al. (2015), pois os autores afirmam que dobrando-se a dose de 20 kg/ha para 40 kg/ha de P_2O_5 a espécie produziu maior quantidade de matéria seca de folhas.

O K apesar de ser o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas, quando analisamos seu efeito no acúmulo de biomassa neste estudo, nota-se que a dose intermediária (3.0 g/planta) induziu os melhores resultados no rendimento de biomassa total, mesmo não sendo significativamente menor do que a obtida com K1. Então, podemos dizer que o nutriente é absorvido até atingir um ponto máximo, logo a adição contínua deste nutriente não é mais associada ao aumento do crescimento ou produtividade da planta, e sim ao teor de nutrientes nos tecidos.

Considerando a necessidade de fornecer uma recomendação da adubação de NPK mais adequada nas condições experimentais juntamente com o teor de glicosídeos de esteviol obtidos da biomassa foliar, observou-se que as doses N2 , P1e K1 são as

ideais. Se extrapolarmos a produção de estêvia para um hectare com 9 plantas/m², podemos estimar, que os valores médios do peso seco das folhas 3,35 t/ha de biomassa total e 1,84 t/ha de folhas do primeiro corte e 2,5 t/ha da biomassa total e 0,97 t/ha no segundo corte.

4.2 Teor e absorção de nutrientes

Para a concentração de nutrientes na parte aérea da planta, os valores dos elementos aumentaram em função das doses desse nutriente. O potássio é o principal nutriente requerido pela espécie, e mostrou o valor médio de 2.65% ms, seguido pelo nitrogênio (1.83% ms). O fósforo foi o nutriente que apresentou a menor concentração, com uma média de 0.27% ms (Tabelas 1 e 2). Os resultados do teor de nutrientes nas plantas, encontrados neste experimento, seguem a mesma tendência dos resultados encontrados por Katayana et al. (1976). Os autores relatam níveis médios de 1.4% N, 0.3% de P e 2.4% de K, quando considerando as doses N2P1K1, obtêm-se 1.81% N, 0.25% P e 2.54% K, o primeiro corte, e 1.79% de N, 0.18% P e 2.07% K, o segundo corte.

A determinação da composição mineral das folhas é bastante útil no intuito de adequar as doses de fertilizantes suprimindo as reais necessidades das plantas naquele ambiente de cultivo. Plantas da espécie *Dendranthema grandiflorum* cv. Jospithoven, pertencente à mesma família da stevia, mostraram a mesma aptidão na absorção de nutrientes nas plantas, seguindo a tendência K>N>P (Fernandes et al., 2012). Os autores ainda relatam que a mesma relação observada no acúmulo de biomassa quando compara-se as duas colheitas, notou-se para o acúmulo dos nutrientes, os dados da primeira colheita exibiram maiores teores de NPK do que a segunda colheita. Os valores médios dos nutrientes foram 0.68; 0.1; 0.97g/plant de NPK na primeira colheita e 0.4; 0.03; 0.50g/plant de NPK na segunda colheita, respectivamente.

A redução da concentração de nutrientes na segunda colheita pode ter sido influenciada pelo crescimento e desenvolvimento das plantas estimulado após o corte, promovendo o efeito de diluição.

Notou-se que o nitrogênio foi o nutriente com maior mobilidade de translocação, em função do aumento das doses em relação aos demais (K e P). Se avaliarmos a dose indicada de N2P2K2 para o cultivo de Stevia com a densidade populacional de 90.000plantas/ha, a extração de nutrientes no solo será de 90 kg/ha de ureia; 90 kg/ha de P2O5 e 270kg/ha de K2O. Estes valores são muito elevados e discrepantes daqueles indicados em literatura, pois de acordo com alguns estudos, é indicado doses de 90, 40 e

60 kg/ha de NPK (PAL et al., 2015), enquanto que Rank & Midmore (2006) recomendaram as doses de 50, 25 e 25 kg/ha de NPK e Brandle et al. (1998) sugeriram que a fertilização seja de 105, 23 e 180 kg/ha de NPK, respectivamente.

A partir dos dados obtidos, sugerimos mais estudos para entender a relação entre nutrientes nas plantas considerando a variabilidade edafoclimática nas diversas áreas de cultivo.

4.3 Conteúdo de glicosídeos

Houve variações nos teores de glicosídeos de steviol em todos os tratamentos. Na primeira colheita os teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A não apresentaram diferenças significativas com o aumento das doses de nutrientes. Porém, analisando os teores de esteviosídeo na segunda colheita pode-se deduzir que a dose N 0,1g/L promoveu maior síntese deste composto em folhas e a dose P 0.5g/plant inferiu maiores teores em caules. Por outro lado, alguns estudos não evidenciam essa correlação com baixas doses de N (Inugraha et al., 2014).

Na segunda colheita, houve a interação conjunta do P nos teores de rebaudiosídeo (Tabelas 3 e 4). Considerando a percentagem média dos glicosídeos de steviol, percebe-se que as folhas apresentaram uma maior concentração, cerca de 11% e 8,5%, do que as hastes, cerca de 4% e 3,4% na primeira e segunda colheita, respectivamente. Pal et al. (2015), ressaltaram a importância da adubação nitrogenada ao efeito sinérgico de N com outros nutrientes essenciais que estimulam as atividades bioquímicas nas plantas e, conseqüentemente, os níveis de glicosídeos. Os autores ainda afirmam que altos teores de esteviosídeo nas folhas adubadas com N podem ser resultado dos altos teores de pigmentos fotossintéticos. De acordo com Ladygin et al. (2008), a acumulação dos glicosídeos steviol em células de stevia in vivo e in vitro, pode ser relacionada com o desenvolvimento do sistema de membrana de cloroplastos e o conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Em relação ao rebaudiosídeo, Brandle (1999) deduz que a presença de Reb-A é controlada por um único gene dominante, mas que as proporções reais podem ser influenciadas por locus multialelico.

Tendo em consideração os dados obtidos e a necessidade de oferecer uma indicação sobre qual adubação nitrogenada seguir, se considerarmos o conteúdo de esteviosídeo e rebaudiosídeo A nas folhas secas, que é o órgão da planta utilizado industrialmente, pode-se considerar a dose máxima apenas para o nitrogênio, enquanto que para os outros dois elementos, não houve efeito significativo nas folhas, sendo assim, podemos considerar suficiente a dose mínima. Por outro lado, se cultivarmos

stevia com a finalidade de extrair os glicosídeos de esteviol na planta inteira, deve-se considerar as doses indicadas N2P3K1. Quando multiplica-se o seu conteúdo de glicosídeos para um hectare, temos a quantidade de 270kg de esteviosídeo e 209kg de rebaudiosídeo A, no primeiro corte, e 120kg de esteviosídeo e 108kg de rebaudiosídeo, no segundo corte.

Comparando com a literatura os valores das duas principais glicósidos na experiência pode-se considerar que estes atingiram níveis muito significativas. De acordo com Yadav et al. (2010), o conteúdo destas substâncias sintetizadas por plantas são normalmente 5% a 10% esteviosídeo e 2% a 4% de um rebaudiosídeo. De acordo com Kumar et al. (2014) altas concentrações de rebaudiosídeo A não são desejáveis, devido ao seu alto poder adoçante.

Devido à característica da espécie ser altamente sensível ao fotoperíodo, o seu cultivo em zonas temperadas, como é o caso da Itália, pode ter influenciado a produtividade de esteviosídeo (Ramesh et al., 2006). O conteúdo do rebaudiosídeo-A, tem um interesse especial porque tem o perfil de sabor mais desejável (DuBois, 2000). O que não é apreciado em esteviosídeo é a possibilidade de provocar gosto amargo, que não é aceitável para a maioria das pessoas.

5.CONCLUSÕES

Notou-se que as dosagens mais elevadas de NPK não promovem maior acumulação de biomassa na espécie.

O mais adequado considerando a produtividade para produção de folhas foi N 0,25 g/L, P 0,5 g/planta P e K 1,5 g/planta.

A adubação nitrogenada influenciou o acúmulo de biomassa na planta inteira, enquanto que o P e o K influenciaram somente a biomassa do caule.

O K é o nutriente absorvido em maior quantidade nas plantas.

Os resultados de biomassa seca e teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram maiores na primeira colheita.

A adubação nitrogenada influenciou diretamente a síntese de glicosídeos de esteviol nas folhas e nos caules.

Tabela 2. Produtividade folhas e caules, teor de nutrientes nos *Stevia rebaudiana* Bertoni sob diferentes doses de adubação na segunda colheita.

Segunda colheita										
	Doses	Massa seca folhas (g)	Massa seca caules (g)	Massa seca total (g)	N % dm	P % dm	K % dm	N g/planta	P g/planta	K g/planta
Nitrogênio (g/L)	N1	9.19 b	10.4 c	19.6 b	1.29 c	0.20	2.31	0.25 c	0.04	0.45 b
	N2	11.5 a	12.4 b	24 a	1.79 b	0.19	2.24	0.42 b	0.04	0.53 a
	N3	11.4 a	13.1 a	24.6 a	2.27 a	0.19	2.19	0.56 a	0.04	0.53 a
Fósforo (g/plant)	P1	10.4	11.6 b	22.0 b	1.77	0.16 b	2.32	0.39	0.03 b	0.50
	P2	10.7	11.9 ab	22.7 ab	1.83	0.19 b	2.22	0.42	0.04 b	0.50
	P3	11.0	12.4 a	23.4 a	1.76	0.23 a	2.20	0.42	0.05 a	0.51
Potássio (g/plant)	K1	10.7	11.8	22.6 ab	1.82	0.18	1.60 c	0.42	0.04	0.36 c
	K2	10.9	12.5	23.4 a	1.75	0.20	2.30 b	0.41	0.04	0.54 b
	K3	10.4	11.6	22.1 b	1.79	0.20	2.84 a	0.40	0.04	0.63 a
N		*	***	**	***	ns	ns	***	ns	*
p		ns	*	*	ns	**	ns	ns	**	ns
k		ns	ns	*	ns	ns	***	ns	ns	***
nxp		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
nxk		ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	*
kxp		ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
npxk		ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns

Tabela 3. Percentual em teor de matéria seca e esteviosídeo e rebaudiosídeo em *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivadas em vasos sob diferentes doses de fertilizante mineral na primeira colheita.

Primeira colheita							
	Doses	Esteviosídeo folhas	Rebaudiosídeo A	Esteviosídeo	Rebaudiosídeo A	Esteviosídeo total	Rebaudiosídeo A
		% MS	folhas % MS	caule % MS	caule % MS	g/plant	total g/plant
Nitrogênio (g/L)	N1	11.3	7.31	4.10	4.87	2.54 b	1.93 b
	N2	11.8	7.05	3.95	4.82	3.03 a	2.37 a
	N3	11.1	6.96	3.90	4.73	3.19 a	2.41 a
Fósforo (g/plant)	P1	11.4	6.91	4.03	4.81	2.90	2.13
	P2	10.8	7.09	3.94	4.77	2.87	2.24
	P3	11.1	7.32	3.98	4.85	3.00	2.34
Potássio (g/plant)	K1	10.2	7.25	3.92	4.79	2.98	2.28
	K2	11.8	6.96	3.99	4.80	2.91	2.27
	K3	11.2	7.10	4.03	4.83	2.88	2.17
N		ns	ns	ns	ns	**	*
p		ns	ns	ns	ns	ns	ns
k		ns	ns	ns	ns	ns	ns
nxp		ns	ns	ns	ns	ns	ns
nxk		ns	ns	ns	ns	ns	ns
kxp		ns	ns	ns	ns	ns	ns
npxk		ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabela 4. Percentual em teor de matéria seca e esteviosídeo e rebaudiosídeo em *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivadas em vasos sob diferentes doses de fertilizante mineral na segunda colheita.

Segunda colheita							
	Doses	Esteviosídeo folhas	Rebaudiosídeo A folhas	Esteviosídeo caule	Rebaudiosídeo A Caule	Esteviosídeo total	Rebaudiosídeo A total
		% MS	% MS	% MS	% MS	g/plant	g/plant
Nitrogênio (g/L)	N1	9.17 a	5.86	3.55 a	4.46	1.21 b	1.00 b
	N2	8.25 b	6.10	3.55 a	4.50	1.39 a	1.26 a
	N3	8.17 b	5.71	3.47 b	4.47	1.39 a	1.24 a
Fósforo (g/plant)	P1	8.53	5.77 b	3.56	4.46	1.30	1.12 b
	P2	8.60	5.77 b	3.53	4.47	1.34	1.15 ab
	P3	8.46	6.16 a	3.48	4.49	1.35	1.24 a
Potássio (g/plant)	K1	8.67	5.83	3.56a	4.46	1.29	1.16
	K2	8.55	5.88	3.54ab	4.47	1.36	1.20
	K3	8.37	5.95	3.46b	4.50	1.35	1.15
N		*	ns	*	ns	*	*
P		ns	*	ns	ns	ns	*
K		ns	ns	*	ns	ns	ns
NxP		ns	*	ns	ns	ns	*
NxK		ns	ns	ns	*	ns	ns
KxP		ns	ns	ns	ns	ns	ns
NxPxK		ns	ns	ns	**	ns	ns

6.REFERÊNCIAS

- Allam A.I., Nassar, A., Besheti, S.Y. 2001. Nitrogen fertilizer requirements of *Stevia rebaudiana* under Egyptian conditions. *Egyptian Journal of Agriculture Research* 79, 1005-1018.
- Amzad Hossain, M., Siddique, A.B., Mizanur Rahman, S.M., Amzad Hossain, Chemical M., 2010. Composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian J Tradit Med.* 5, 56-61.
- Brandle, J.E., Starratt, A.N., Gijzen, M., 1998. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Can. J. Plant Sci.* 78, 527–536.
- Brandle J. 1999. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.*, 79, 85–91.
- Brandle, J.E., Telmer, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochem.* 68, 1855–1863.
- Chatsudthipong V., Muanprasat C. 2008. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther.* 2009. 121, 41-54. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.007.
- DuBois, G. E. 2000. Sweeteners: non-nutritive. in F. J. Francis, ed. *Encyclopedia of food science and technology*, New York.
- Fernandes, E. P.; Rezende, C. F. A.; Leandro, W. M.; Frazão, J. J.; Barbosa, J. M. 2012. The accumulation of nitrogen, phosphorus and potassium in cut chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) cv. Jospithoven. *Sem. Ci. Agr.*, 33, 2939-2948.
- Kawatani, T., Kaneki, Y., Tanabe, T. 1977. On the cultivation of Kaa-hee (*Stevia rebaudiana* (Bert.)). *Japanese J. Tropical Agri.* 20, 137–142.
- Kawatani, T., Kaneyi, Y., Tanabe, T., Takahashi, T. 1980. On the cultivation of Kaa-He- E (*Stevia rebaudiana* Bert.).VI. Response of to potassium fertilization rates and to the three major elements of fertilizer. *Nettai Nogyo* . 24, 105–112.
- Kennelly E.J. 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. In: Kinghorn A.D., editor. *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*. London and NY: Taylor and Francis. pp. 68–85.
- Ladygin, V.G.; Bondarev, N.I.; Semenova, G.A.; Smolov, A.A.; Reshetnyak, O.V.; Nosov, A.M. 2008. Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* in vivo and in vitro. *Biol Plantarum*, 52, 9-16.

- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, Kong. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* 132, 1121-1132.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* 132, 1121–1132.
- Pal, P. K., Prasad, R., Pathania, V. 2013. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Plant Physiol.* 15, 1526-1535. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.06.017>
- Pal, P. K.; Kumar, R.; Guleria, V.; Mahajan, M.; Prasad, R.; Pathania, V.; Gill, B. S.; Singh, D.; Chand, G.; Singh, B.; Singh, R. D.; Ahuja, P. S. 2015. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biology*, 15,1-16. doi:10.1186/s12870-015-0457-x
- Pól, J., Hohnová, B., Hyötyläinen, T. 2007. Characterization of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 25, 85-92.
- Prakash, I., DuBois, G.E., Clos, J.F., Wilkens, K.L., Fosdick, L.E. 2008. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem. Toxicol.* 46, 575-582.
- Ramesh, K., Singh, V., Megeji, N. W. 2006. Cultivation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy* Volume 89, 137-177. doi:10.1016/s0065-2113(05)89003-0
- Rank A. H., Midmore D. J. 2006. *Stevia*, an intense, natural sweetener. Australian Government: Rural Industries Research and Development Corporation. < available in file:///C:/Users/admin/Downloads/06-020%20(1).pdf>
- Serfaty, M., Ibdah, M., Fischer, R., Chaimovitsh, D., Saranga, Y., Dudai, N. 2013. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime *Industrial Crops and Products*, 50, 731-736. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.063
- Soejarto, D. 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia*. London, New York: Taylor and Francis. 18–39.

- Utumi, M. M, Monnerat, P. H., Pereira P. R.G., Fontes P. C. R., Godinho, V.P.C. 1999. Deficiência de macronutrientes em estévia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo. *Pesq. Agropec. Bras.* 34, 1039-1043.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P. S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 91, 1-27 doi:10.4141/CJPS10086
- Yang, J., Liu, X., Shi, Y. 2013. Effect of Different Mixed Fertilizer on Yield, Quality and Economic Benefits in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J Food Sci Technol.* 5, 588-591.
- Zancan, S., Trevisan, R., Paoletti, M.G. 2006. Soil algae composition under different agro-ecosystems in North-Eastern Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 112, 1–12.