



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO, PERFIL E ATIVIDADE DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. NAS
FASES VEGETATIVA E REPRODUTIVA NO CERRADO
PAULISTA

LETÍCIA GALHARDO JORGE

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas (Botânica),
Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU - SP

2020

Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu
Seção Técnica de Pós-Graduação
Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, Botucatu, SP – CEP 18618-689
Telefone (14) 3880-0780 posgraduacao.ibb@unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO, PERFIL E ATIVIDADE DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. NAS
FASES VEGETATIVA E REPRODUTIVA NO CERRADO
PAULISTA**

LETÍCIA GALHARDO JORGE

PROF^a DR^a CARMEN SÍLVIA FERNANDES BOARO

ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia Vegetal .

BOTUCATU - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Jorge, Letícia Galhardo.

Desempenho fotossintético, perfil e atividade do óleo essencial de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. nas fases vegetativa e reprodutiva no cerrado paulista / Letícia Galhardo Jorge. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carmen Silvia Fernandes Boaro
Capes: 20303009

1. Essências e óleos essenciais. 2. Plantas - Metabolismo. 3. Plantas - Reprodução. 4. Fenologia vegetal. 5. Plantas dos cerrados.

Palavras-chave: Fases fenológicas; Metabolismo especializado; Metabolismo primário.

Dedico

Aos meus pais Roselaine Ap. Galhardo Jorge e João Henrique Jorge e ao meu irmão Rodrigo Galhardo Jorge, que desde o início foram a minha base, meu maior exemplo de caráter, honestidade, dignidade e respeito e me deram todo o apoio, incentivo e amor incondicional. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e ao auxílio financeiro.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A Deus por estar sempre presente em minha vida, pelas oportunidades postas em meu caminho, por sempre me guiar e proteger, e por nunca me deixar desistir.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carmen Sílvia Fernandes Boaro por todos os ensinamentos, pela paciência e sabedoria e por depositar sua confiança em mim para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, pela atenção e por permitir o uso de seu laboratório.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão, que me ensinaram a agir sempre com amor ao próximo, respeito, humildade e honestidade.

Aos meus familiares, que sempre estiveram presentes em minha vida e por saber que poderia contar com o apoio de todos vocês.

Ao Bruno Novaes pela ajuda nas coletas, pelo amor, compreensão, paciência, carinho, apoio e por se fazer tão presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus professores da graduação em Ciências Biológicas (Unesp – Botucatu), por todo conhecimento adquirido.

Aos meus amigos de Departamento, em especial ao Felipe Girotto Campos e Maria Aparecida Ribeiro Vieira, pelo apoio e colaboração na execução deste trabalho. Obrigada pela paciência e por tudo o que me ensinaram. Minha eterna gratidão a vocês.

Aos meus amigos de Botucatu e que vou levar comigo para o resto da vida: Mayara Trombini, Jéssica Lima, Rafael Bibiano, Aline Mendes, Marcelo Souza, Lucas Ferenzini, Jackson Mirellys, Guilherme Rago, Veridiana Zocoler, Fábio Luiz Trombini, Juliana Arruda e Gean Monteiro pela amizade, companheirismo e momentos de descontração.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pelos ensinamentos adquiridos.

Aos funcionários do departamento de Botânica, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos que contribuíram e participaram de alguma forma nessa fase tão importante da minha vida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Metabolismo primário e especializado.....	11
2.2. Família Annonaceae.....	13
2.3. Perfil químico e atividade biológica do óleo essencial gênero <i>Xylopia</i>	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
4. CAPÍTULO I: Fotossíntese, perfil químico e atividade do óleo essencial de <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart. nas fases vegetativa e reprodutiva no cerrado paulista.....	22
4.1. Resumo.....	23
4.2. Abstract.....	24
4.3. Introdução.....	25
4.4. Material e métodos.....	27
Material vegetal.....	27
Potencial água das folhas e conteúdo relativo de água.....	29
Fluorescência da clorofila <i>a</i>	29
Trocas gasosas.....	29
Carboidratos, atividade enzimática e peroxidação lipídica.....	30
Secagem das folhas e extração do óleo essencial.....	31
Rendimento e caracterização da composição química do óleo essencial.....	31
Atividade biológica do óleo essencial: atividade antifúngica.....	31
4.5. Resultados.....	33
4.6. Discussão.....	47
4.7. Conclusão.....	52
4.8. Referências bibliográficas.....	53
5. Apêndice.....	60

Resumo

Pesquisas voltadas ao conhecimento de espécies vegetais permitem a elaboração de projetos que visam o entendimento do desenvolvimento, conservação da biodiversidade e exploração sustentável dos recursos naturais. O metabolismo primário, representado pela fotossíntese e o especializado, que sintetiza o óleo essencial, podem ser influenciados pelas condições ambientais e fenológicas, o que pode modificar o perfil químico do óleo essencial e a atividade biológica na defesa vegetal, inclusive contra fungos, bactérias e vírus. Compostos oriundos do metabolismo especializado apresentam atividade biológica e potencial para produção de bactericidas e fungicidas. Sendo assim, torna-se necessário o conhecimento do estágio de desenvolvimento das espécies vegetais em que as substâncias de interesse, com potencial econômico, estão mais concentradas, orientando dessa forma, se for o caso, para o período de coleta, visando a conservação e uso sustentável. Há trabalhos científicos que revelam atividade biológica de óleos essenciais, como observado para o gênero *Xylopi*a, porém nenhum deles relaciona o metabolismo primário e especializado com o estágio de desenvolvimento em que a espécie se encontra. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se as fases fenológicas, vegetativa e reprodutiva de *Xylopi*a *aromatica* (Lam.) Mart. modificam o desempenho fotossintético e o perfil do óleo essencial, o que pode influenciar sua atividade biológica na defesa antioxidante e ação antifúngica.

Palavras-chaves: metabolismo primário, metabolismo especializado, fases fenológicas

Abstract

Research aimed at the knowledge of plant species allows the elaboration of projects that aim at the understanding of development, conservation of biodiversity and sustainable exploitation of natural resources. The primary metabolism, represented by photosynthesis and the specialized one, that synthesizes the essential oil, can be influenced by the environmental and phenological conditions, which can influence the chemical profile of the essential oil and the biological activity in the vegetal defense, including against fungi, bacteria and virus. Compounds from the specialized metabolism present biological activity and potential for the production of bactericides and fungicides. Therefore, it is necessary to know the stage of development of plant species in which the substances of interest, with economic potential, are more concentrated, thus orienting, if appropriate, the collection period, aiming at the conservation and sustainable use. There are scientific studies that reveal biological activity of essential oils, as observed for the genus *Xylopi*a, but none of them relates the primary and specialized metabolism to the stage of development in which the species is found. In this way, the objective of this research was to evaluate if the phenological, vegetative and reproductive phases of *Xylopi*a *aromatica* (Lam.) Mart. modify the photosynthetic performance and the profile of the essential oil, which may influence its biological activity in the antioxidant defense and antifungal action.

Keywords: primary metabolism, specialized metabolism, phenological phases

1. INTRODUÇÃO GERAL

Xylopia aromatica (Lam.) Mart., espécie pertencente à família Annonaceae, apresenta ampla distribuição no Brasil, sendo uma das 38 espécies registradas em 50% ou mais na composição da vegetação lenhosa de cerrado, além de ser encontrada em regiões de floresta (RATTER et al., 1996).

O metabolismo primário, representado pela fotossíntese, e o especializado, que dele depende e origina o óleo essencial, são influenciados pelas condições ambientais em que as espécies se encontram e por sua fenologia (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013; JAMWAL et al., 2018; CASER et al., 2018).

A taxa assimilatória líquida, que reflete a eficiência fotossintética de espécies vegetais, apresenta-se elevada em indivíduos jovens, uma vez que, nessa fase grande parte dos foto-assimilados são direcionados para o crescimento (RADFORD, 1967). Além disso, a síntese de metabólitos especializados também depende de compostos orgânicos originados na fotossíntese. Dessa forma, durante o desenvolvimento ocorre partição de assimilados para o atendimento das diferentes necessidades do vegetal. Em indivíduos na fase reprodutiva, a taxa assimilatória líquida apresenta decréscimo, além do que o maior direcionamento dos recursos fotossintéticos ocorre para os órgãos reprodutivos em detrimento do crescimento da planta (USANO-ALEMANY et al., 2016; TEZARA et al., 2014; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A idade e o estágio de desenvolvimento vegetal podem influenciar a produção de metabólitos secundários, como os óleos essenciais (BEN FARHAT et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015; APARECIDA; MORAIS, 2009). Estudo com *Salvia officinalis* L., mostrou que o rendimento do óleo essencial diferiu nos estádios de desenvolvimento (vegetativo, florescimento e frutificação). Observou-se maior rendimento do óleo essencial na fase de floração quando comparado ao rendimento nas fases vegetativa e de frutificação (BEN FARHAT et al., 2016).

Além disso, a variação de água, luz e temperatura podem influenciar o movimento estomático e a entrada de gás carbônico para a síntese de carboidratos, principal dreno de elétrons provenientes da fase fotoquímica da fotossíntese. As espécies vegetais são continuamente submetidas a estresses ambientais o que aumenta produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), geradas principalmente pelo transporte de elétrons. As ERO podem além de causar danos celulares, sinalizar respostas de defesa, como ativação de enzimas antioxidantes (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013) e sinalização para produção de substâncias do metabolismo especializado, como terpenos, que constituem os óleos essenciais, contribuindo com a aclimação e sobrevivência vegetal no ambiente.

O óleo essencial de folhas de *X. aromatica* é composto por mono e sesquiterpenos (MARTINS et al., 1996). A formação desses terpenos envolve ATP e agente redutor (NAD(P)H⁺), que atua como fonte doadora de elétrons, proveniente da fase fotoquímica. Envolve ainda esqueletos carbônicos, gerados na fase bioquímica. A rota de síntese dos terpenos atua também na dissipação do excesso de energia fotossintética. Dessa forma, a rota dos terpenos constitui importante mecanismo de proteção, atuando na defesa do vegetal contra agentes bióticos e abióticos, e protegendo a espécie em condições de elevada incidência luminosa (ZHAO et al., 2013; SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013).

Compostos do metabolismo especializado, como terpenos e óleos essenciais, estão relacionados com propriedades antimicrobianas e antifúngicas (LIMA et al., 2015), sendo de grande importância para a indústria e para área farmacológica (ALCÂNTARA, 2015).

De acordo com o acima exposto, as fases fenológicas vegetativa e reprodutiva, de *Xylopia aromatica* podem alterar o perfil fotossintético e químico e a atividade biológica do óleo essencial. A atividade biológica deve remeter à exploração sustentável e à preservação do gênero *Xylopia* na biodiversidade vegetal, o que só poderá ser conseguido com base em estudos que contribuam para o conhecimento das espécies vegetais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se as fases fenológicas, vegetativa e reprodutiva de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., modificam o desempenho fotossintético e o perfil do óleo essencial, influenciando sua atividade biológica na defesa antioxidante e ação antifúngica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metabolismo primário e especializado

O crescimento das cidades, associado a expansão da agricultura e pecuária, tem contribuído com a fragmentação e degradação do Cerrado, colaborando com a deterioração da biodiversidade (CARVALHO; DE MARCO; FERREIRA, 2009). Assim, a identificação de compostos e sua dinâmica em relação ao ambiente em que as espécies se encontram e as suas fases fenológicas são de extrema importância para manutenção e conservação da biodiversidade.

As fragmentações do habitat, associadas aos fatores bióticos e abióticos, como luz, água, temperatura, nutrientes, tipos de solos, ataque de patógenos, pragas ou herbivoria e fenologia são causas de estresses, que podem influenciar o metabolismo primário e consequentemente o especializado, permitindo o desenvolvimento de mecanismos que possibilitem a adaptação e sobrevivência das plantas (ALVAREZ-CASTELLANOS; BISHOP; PASCUAL-VILLALOBOS, 2001; PICHERSKY; GERSHENZON, 2002; CHAGAS et al., 2005;

ARIMURA; MATSUI; TAKABAYASHI, 2009). Todas essas condições podem influenciar a produção e composição dos óleos essenciais (BETTAIEB et al., 2009; LARIBI et al., 2009; MCKIERNAN et al., 2014)

Outro aspecto pouco estudado, mas de extrema importância, são as alterações em nível enzimático que influenciam a sobrevivência do vegetal, regulando os metabolismos primário e especializado. As plantas como organismos sésseis estão sujeitas a estresses ocasionados pelos fatores acima registrados, ocorrendo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são moléculas formadas durante funções metabólicas normais nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (CAO et al., 2015). O próprio sistema de transporte de elétrons durante a fotossíntese pode causar danos celulares por meio da formação das ERO, que também podem atuar como moléculas sinalizadoras que ativam múltiplas respostas de defesa (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013).

Sistemas complexos de proteção podem reverter o estresse oxidativo, como a ação de diversas enzimas antioxidantes, entre elas superóxido dismutase, peroxidases e catalase, que podem ser utilizadas como sinalizadores moleculares (VRANOVA; INZE; BREUSEGEM, 2002). Plantas com elevados níveis de antioxidantes têm mostrado maior resistência ao estresse oxidativo (SPYCHALLA; DESBOROUGH, 2008). Além disso, a peroxidação lipídica é a variável que confirma o nível de estresse e a eficiência do sistema antioxidante na sua contenção, uma vez que, permite monitorar o dano causado por ERO com o acúmulo de malondialdeído (APEL; HIRT, 2004).

Os vegetais também possuem sistema antioxidante não enzimático exercido por substâncias do metabolismo especializado como os terpenos, mono e sesquiterpenos, originados pela união de dois ou três isoprenos, respectivamente. Para formação do isopreno, unidade base dos terpenos com cinco carbonos, que são grupos presentes no óleo essencial, na sua síntese há necessidade de três moléculas de ATP e agente redutor, NAD(P)H⁺, fonte doadora de elétrons, necessários para a redução do fosfato metileritritol e do ácido mevalônico até o isopreno. Piruvato e acetil-CoA, provenientes da respiração de uma molécula de hexose, são os precursores, respectivamente, dos mono e sesquiterpenos. Essas rotas também atuam na dissipação do excesso de energia fotossintética (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013; ZHAO et al., 2013), constituindo-se em importante mecanismo de proteção nessas condições.

Na fase bioquímica da fotossíntese há utilização de ATP e NAD(P)H⁺ na incorporação do carbono para síntese de carboidratos, principal dreno de elétrons. Esses carboidratos podem ser direcionados para o crescimento vegetal e para síntese de moléculas do metabolismo especializado (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013).

Deste modo, plantas em estágio de desenvolvimento juvenil, por apresentar elevada taxa de crescimento podem direcionar grande parte dos seus recursos fotossintéticos para seu crescimento, e menor parte para síntese de metabólitos especializados, havendo competição entre esses processos. Plantas adultas, por apresentar taxa de crescimento reduzida podem direcionar mais recursos fotossintéticos para biossíntese de moléculas do metabolismo especializado, uma vez que essas moléculas são importantes para superação de estresse bióticos e abióticos que a planta está submetida (ROLLAND; MOORE; SHEEN, 2002; GOBBONETO; LOPES, 2007).

Estudo realizado com *Salvia officinalis* L. mostrou que o rendimento e a composição química do óleo essencial apresentaram variações durante os estádios vegetativo, florescimento e frutificação. O conteúdo de óleo essencial aumentou significativamente quando coletado durante o estágio de florescimento e diminuiu no decorrer da frutificação. O rendimento do óleo essencial no estágio de floração diferiu dos rendimentos nos estádios vegetativo e de frutificação. O autor explica este fato, uma vez que, na fase de floração as plantas podem produzir maiores quantidades de compostos secundários para atração de polinizadores; já a baixa taxa de produção de compostos durante a fase vegetativa pode ser devido à inativação parcial de enzimas necessárias para sua biossíntese (BEN FARHAT et al., 2016).

2.2. Família Annonaceae

A família Annonaceae pertence ao grupo Eudicotiledôneas e compreende aproximadamente 110 gêneros e 2400 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008; CHATROU et al., 2012). No Brasil, estão registrados cerca de 30 gêneros e 260 espécies, presentes em praticamente todas as formações vegetais (SOUZA; LORENZI, 2008). De forma geral, as espécies de Anonáceas são de hábito arbóreo, folhas alternadas, dísticas, simples, sem estípulas, margem inteira e veneção penínérvea. Inflorescência cimosas, flores geralmente grandes, vistosas e bissexuadas, diclamídeas; fruto apocárpico ou sincárpico (LOBÃO et al., 2005; JUDD et al., 2009).

Economicamente, diversos gêneros da família Annonaceae são de grande importância como fonte de grupos comestíveis e matéria prima para cosméticos, perfumaria e plantas medicinais (LORENZI, 1998; JOHNSON et al., 2000; PIMENTA et al., 2003). Muitas espécies possuem fragrância devido à presença de óleos essenciais e aromas, que ocorrem na madeira, casca, folhas, flores, frutos e raiz (YOLANDA RÍOS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2010; LIMA et al., 2015).

Entre os gêneros de Annonaceae mais estudados, destacam-se *Annona* spp., *Duguetia* spp. e *Xylopia* spp., pois os diversos produtos vegetais, e as substâncias isoladas a partir destes, demonstraram potencial atividade biológica (LIMA et al., 2015).

O óleo essencial da espécie *Annona cherimola*, isolado de folhas, flores e frutos, apresentou ação antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis* e *Candida albicans* (YOLANDA RÍOS et al., 2003). Estudo realizado com óleos essenciais obtidos das folhas de *Annona crassiflora* revela atividade antifúngica frente a cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, dentre outros (LIMA; FARIAS, 1994). Além disso, os óleos essenciais de *Duguetia gardneriana* Mart. e *D. moricandiana* Mart. foram ativos contra linhagens de *Candida guilliermondii* e *C. albicans*, respectivamente (YOLANDA RÍOS et al., 2003; ALMEIDA et al. 2010).

2.3. Perfil químico e atividade biológica do óleo essencial do gênero *Xylopia*

O gênero *Xylopia* é um dos 33 gêneros da família Annonaceae existentes no Brasil (LORENZI, 2002) que se destaca por apresentar 150 espécies amplamente distribuídas em diversas partes do mundo (BRUMMITT, 1992). Do ponto de vista químico, esse gênero tem sido exclusivamente estudado devido às numerosas espécies odoríferas.

Dentre as espécies, destaca-se a *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae), conhecida popularmente como pimenta-de-macaco (MAIA et al., 2005), uma espécie arbórea cujos frutos podem ser utilizados como tempero (RIOS; PASTORES, 2011). É recomendada para a recuperação de áreas degradadas de "Cerrado" no estado de São Paulo (Resolução SMA nº 47/2003). Além disso, suas folhas, flores e frutos possuem óleo essencial, rico em mono e sesquiterpenos (LAGO et al., 2003; ANDRADE et al., 2004; MAIA et al., 2005).

Alguns estudos mostram que a composição e rendimento do óleo essencial variam em função do órgão de interesse e localização das plantas. Plantas de *Xylopia aromatica* coletadas no estado do Pará, Brasil, revelaram nas flores e frutos a presença de limoneno (44% e 36%), α -pineno (24% e 19%) e β -pineno (16% e 13%). Biciclogermacreno (36,5%) e espatulenol (20,5%) foram majoritários nas folhas (ANDRADE et al., 2004, MAIA et al., 2005). Em folhas frescas de *X. aromatica* coletadas no cerrado em Araraquara, São Paulo, Brasil, foram determinados α -pineno (26%), limoneno (22%), biciclogermacreno (20%) e β -pineno (19%), com rendimento de 0,08% (LAGO et al., 2003).

No Brasil, espécies vegetais do Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica têm sido estudadas e utilizadas como medicamentos para o tratamento de doenças, incluindo infecções causadas por fungos e bactérias. Isso acontece devido ao grande número de constituintes

químicos encontrados nessas espécies que são responsáveis pela atividade biológica, em especial, antibacteriana e antifúngica (LIMA et al., 2015).

Alguns microrganismos têm se mostrado resistentes diante da utilização de alguns medicamentos antifúngicos sintéticos (KHAN et al., 2009). Devido a isso, surge o interesse de identificar substâncias alternativas ao uso de medicamentos tradicionais. Dessa forma, foram e estão sendo desenvolvidos muitos trabalhos científicos que revelam a atividade biológica de óleos essenciais. Neste contexto, plantas do gênero *Xylopi* se destacam na busca de novos bioativos devido aos inúmeros compostos secundários presentes (PIMENTA et al., 2009).

Existem relatos encontrados na literatura demonstrando o potencial antimicrobiano do gênero *Xylopi*. Os óleos essenciais de *X. aethiopica* e *X. parviflora* foram testados e foram ativos contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (MUSLIM HASSAN; ZOHEIR ALMAGBOUL; ABDELGADIR, ; VYRY WOUATSA; MISRA; VENKATESH KUMAR, 2014; WOGUEM et al., 2014) Alguns fungos dermatófitos como *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum spp.* tiveram seu crescimento inibido pelo óleo essencial das folhas de *Xylopi frutescens* Aubl. (LIMA et al., 1992).

Em estudo recente, a composição química e a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de flores e folhas de *Xylopi aromatica* foram testados. Os principais compostos identificados no óleo essencial das folhas foram: espatulenol (27,11%), khusinol (13,04%), biciclogermacreno (8,52%), globulol (6,47%), *cis*-guaia-3,9-dien-11-ol (5,98%), 2-epi- α -cedren-3-ona (4,69 %) e elemicina (4,32 %). O óleo essencial das flores apresentou pentadecan-2-ona (16,38%), biciclogermacreno (9,74%), 7-epi- α -eudesmol (7,76%), khusinol (7,23%), *n*-tricosano (6,17%), heptadecan-2-ona (5,83%), entre outros. Em relação a atividade biológica, as menores concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram observadas frente à *Streptococcus pyogenes* (200 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para as flores e folhas, respectivamente. Quanto ao potencial antifúngico, o óleo essencial das folhas apresentou atividade moderada (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) frente à *Candida albicans* (DO NASCIMENTO et al., 2018).

Os estudos acima registrados desmonstram potencial atividade biológica do óleo essencial do gênero *Xylopi*, incluindo a espécie *Xylopi aromatica*. No entanto, a literatura não traz referências que relacionam o metabolismo primário e o especializado, de forma a destacar a influência dos estádios vegetativo e reprodutivo na composição química e na atividade biológica do óleo essencial.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, J. M. **Composição Química e potencial biológico dos óleos essenciais de Annonaceae dos Campi INPA e UFAM**. Tese - INPA, 2015.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, v. 57, n. 1, p. 99–102, 2001.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Essential oil composition from leaf, fruit and flower of *Xylopia aromatica* (lam.) mart. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 7, n. 2, p. 151–154, 2004.
- APARECIDA, L.; MORAIS, S. De. Química dos óleos essenciais. v. 2, p. 4050–4063, 2009.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.
- ARIMURA, G. I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 5, p. 911–923, 2009.
- BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 1, p. 28–35, 2007.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BEN FARHAT, M. et al. Phenophase effects on sage (*Salvia officinalis*) yield and composition of essential oil. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 87–93, 2016.
- BETTAIEB, I. et al. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 2, p. 271–275, 2009.
- BUCCI, S. J. et al. Water relations and hydraulic architecture in Cerrado trees: Adjustments to seasonal changes in water availability and evaporative demand. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 3, p. 233–245, 2008.
- CAO, B.-L. et al. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and

ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 53–62, 2015.

CARVALHO, F. M. V.; DE MARCO, P.; FERREIRA, L. G. The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, v. 142, n. 7, p. 1392–1403, 2009.

CASER, M. et al. Ecophysiological and phytochemical responses of *Salvia sinaloensis* Fern. to drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 383–394, 2018.

CHAGAS, A. C. de S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247–253, 2005.

CHATROU, L.W. et al. The natural history of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p.1–4, 2012.

DO NASCIMENTO, K. F. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, n. May 2017, p. 351–358, 2018.

DO NASCIMENTO, M. N. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) flowers and leaves. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1578–1590, 2018.

DOS SANTOS, C. P. et al. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 416–421, 2015.

FOURNIER, G. et al. Chemical and biological studies of *Xylopia aromatica* stem bark and leaf oils. **Planta Medica**, v. 60, n. 3, p. 283–284, 1994.

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

GONÇALVES, A.; GUAZZELLI, M. J. **Agrofloresta e óleos essenciais**. 2014.

GOUNGUENÉ, S.P. & TURLINGS, T. C. J. The Effects of Abiotic Factors on Induced Volatile Emissions in Corn Plants. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1297–1307, 2002.

HOSSEIN MIRJALILI, M. et al. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during

its phenological cycle. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 42, n. 1, p. 16–19, 2006.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S.. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of applied research on medicinal and aromatic plants**, v. 9, p. 26-38, 2018.

JOHNSON, H.A.; ORBELIES, N.H.; ALALI, F.Q.; McLAUGHLIN, J.L. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. In: CUTLER, S.J.; CUTLER, H.G. (Eds.). **Biologically active natural products: pharmaceuticals**. Washington: CRC Press, 2000. pp.173-184.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. Artmed, 2009.

KHAN, R. et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against Multi Drug Resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 586–597, 2009.

LAGO, J. H. G. et al. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopi aromatic* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 669–672, 2003.

LARIBI, B. et al. Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 372–379, 2009.

LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121–126, 2007.

LOBÃO, A. Q.; ARAUJO, DOROTHY, S. D. de.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.56, n.87, p.85-96, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. Ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998.

MAIA, J. G. S. et al. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 5, p. 474–477, 2005.

MAKSIMOVIĆ, M. et al. Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 8, p. 473–478, 2007.

- MCKIERNAN, A. B. et al. Effect of limited water availability on foliar plant secondary metabolites of two Eucalyptus species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 105, p. 55–64, 2014.
- MURAKAMI, C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *chromolaena laevigata* during flowering and fruiting stages. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 4, p. 621–627, 2013.
- MUSLIM HASSAN, A.; ZOHEIR ALMAGBOUL, A.; ABDELGADIR, H. Antimicrobial activity of the fruits essential oil of *Xylopia aethiopica* [Dun.] A. Rich. **Advancement in Medicinal plant Research**, v. 2, n. 4, p. 58-61, 2014.
- NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 973–996, 2010.
- PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M. Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, n. 2, p. 115–122, 1993.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 237–243, 2002.
- PIMENTA, L.P.S.; PINTO, G.B.; TAKAHASHI, J.A.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Biological screening of annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine shrimp test.) Phytomedicine. **International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v.4, n.2-3, p.209-209, 2003.
- RADFORD, P. J. Growth analysis formulae - Their use and abuse. **Crop Science**, v. 7, p. 171, 1967.
- RAO, M. L.; SAVITHRAMMA, N.; SUHRULATHA, D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 579–584, 2011.
- RATTER, J. A. et al. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation II: Comparison of the woody vegetation of 98 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 53, n. 2, p. 153–180, 1996.
- RIOS, M. N. D. S.; PASTORES, J. F. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. 2011.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar Sensing and Signalling in Plants. **The Plant Cell**, p. 185–205, 2002.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 436–441, 2009.

SELLAMI, I. H. et al. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 395–402, 2009.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 558–566, 2013.

SHAO, H. B. et al. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 1, p. 37–45, 2007.

SOUSA, J. P. B. et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653–659, 2011.

SOUZA DE OLIVEIRA, L. G. et al. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 455–464, 2017.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SPYCHALLA, J. P.; DESBOROUGH, S. L. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. **Plant Physiology**, v. 94, n. 3, p. 1214–1218, 2008.

TEZARA, W. et al. Photosynthetic capacity and terpene production in populations of *Lippia graveolens* (Mexican oregano) growing wild and in a common garden in the Yucatán peninsula. **Industrial Crops and products**, v. 57, p. 1-9, 2014.

TIAGO J. T. SOUZA¹, MIRIAM A. APEL, SÉRGIO BORDIGNON², NELSON IVO MATZENBACHER³, J.; ÂNGELO S. ZUANAZZI¹, A. T. H. Artigo Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia v. 17, n. 3, p. 368–372, 2007.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. **Genomic Organization of Plant Terpene Synthases**. 2001.

USANO-ALEMANY, J.; PALÁ-PAÚL, J.; HERRÁIZ-PEÑALVER, D. Comprehensive phenological description of essential-oil chemotypes of *Salvia lavandulifolia* VAHL grown under the same environmental conditions. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 12, p. 1963–1977, 2014.

VANDENDOOL, H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–71, 1963.

VRANOVA, E.; INZE, D.; BREUSEGEM, F. Van. Signal trans Oxid Stress. v. 53, n. 372, p. 1227–1236, 2002.

VYRY WOUATSA, N. A.; MISRA, L.; VENKATESH KUMAR, R. Antibacterial activity of essential oils of edible spices, *Ocimum canum* and *Xylopi aethiopica*. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, 2014.

WILHELM, C.; SELMAR, D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 2, p. 79–87, 2011.

WOGUEM, V. et al. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopi a parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **Food Chemistry**, v. 149, p. 183–189, 2014.

YOLANDA RÍOS, M. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Annona cherimola* (Annonaceae) **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.

ZHAO, L. et al. Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 497–530, 2013.

4. CAPÍTULO I

Fotossíntese, perfil químico e atividade do óleo essencial de *Xylopia aromatica* (Lam.)

Mart. nas fases vegetativa e reprodutiva no cerrado paulista

4.1. Resumo

Espécies vegetais são capazes de produzir diversidade de substâncias, que desempenham funções importantes para sua sobrevivência e adaptação ao ecossistema. O metabolismo primário, é essencial para o crescimento, desenvolvimento, maturação e reprodução de qualquer espécie. O metabolismo especializado, dependente do primário, é responsável por originar o óleo essencial, que são misturas de metabólitos especializados voláteis, representados principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos. Cada espécie vegetal produz um óleo essencial de composição característica específica, podendo ser influenciado por fatores bióticos e abióticos. A fenologia pode influenciar processos bioquímicos e rotas metabólicas capazes de modificar a formação de substâncias biologicamente ativas, alterando diretamente o conteúdo e a qualidade dos óleos essenciais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se as fases fenológicas, vegetativa e reprodutiva modificam o desempenho fotossintético e o perfil do óleo essencial de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., influenciando sua atividade biológica na defesa antioxidante e ação antifúngica. As variáveis, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, carboidratos, atividade enzimática e peroxidação lipídica, potencial água, conteúdo relativo de água das folhas, extração, rendimento, caracterização química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Xylopia aromatica* foram avaliadas em 24 plantas, 12 no estágio vegetativo e 12 no reprodutivo, coletadas em 2018 e 2019. Os resultados demonstraram que a influência das fases fenológicas, vegetativa e reprodutiva e da época avaliada, com condições ambientais diferentes, pode ter maior ou menor importância nas características do perfil fotossintético e químico, demonstrando maior atuação na defesa antioxidante da *Xylopia aromatica*.

Palavras-chaves: desempenho fotossintético, metabolismo especializado, fases fenológicas, espatulenol

4.2. Abstract

Plant species are capable of producing diversity of substances, which play important roles for their survival and adaptation to the ecosystem. Primary metabolism is essential for the growth, development, maturation and reproduction of any species. The specialized metabolism, dependent on the primary, is responsible for originating the essential oil, which are mixtures of specialized volatile metabolites, represented mainly by monoterpenes and sesquiterpenes. Each plant species produces an essential oil with a specific characteristic composition, which can be influenced by biotic and abiotic factors. Phenology can influence biochemical processes and metabolic routes capable of modifying the formation of biologically active substances, directly altering the content and quality of essential oils. Therefore, the objective of this work was to evaluate whether the phenological, vegetative and reproductive phases modify the photosynthetic performance and the profile of the essential oil of *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., Influencing its biological activity in antioxidant defense and antifungal action. The variables, chlorophyll a fluorescence, gas exchange, carbohydrates, enzymatic activity and lipid peroxidation, water potential, relative water content of the leaves, extraction, yield, chemical characterization and antifungal activity of the essential oil of *Xylopia aromatica* were evaluated in 24 plants, 12 in the vegetative stage and 12 in the reproductive stage, collected in 2018 and 2019. The results demonstrated that the influence of the phenological, vegetative and reproductive phases and of the evaluated season, with different environmental conditions, may have more or less importance in the characteristics of the photosynthetic profile and chemical, demonstrating greater performance in the antioxidant defense of *Xylopia aromatica*.

Keywords: photosynthetic performance, specialized metabolism, phenological phases, espatulenol

4.3. INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de produzir diversidade de substâncias, pertencentes a diversas classes químicas, que desempenham funções importantes para sua sobrevivência e adaptação ao ecossistema (ALVAREZ-CASTELLANOS; BISHOP; PASCUAL-VILLALOBOS, 2001; ARIMURA; MATSUI; TAKABAYASHI, 2009). Sendo assim, o interesse de diversos setores industriais, como farmacêutico, alimentício, cosmético e perfumaria, por matérias-primas alternativas, tem incentivado estudos envolvendo a caracterização do perfil químico dos óleos essenciais e possível influência biótica e abiótica na porcentagem relativa das substâncias neles encontradas (LIMA et al., 2015).

O metabolismo primário, que consome grande parte da energia produzida pela planta, é essencial para o crescimento, desenvolvimento, maturação e reprodução de qualquer espécie vegetal, e envolve fotossíntese, respiração e transporte de nutrientes na planta. O metabolismo especializado, dependente do primário, é responsável por originar o óleo essencial, cuja composição é característica para cada espécie (GONÇALVEZ; GUAZZELLI, 2014). A produção de óleo essencial dependente de compostos sintetizados no metabolismo primário, está relacionada à produtividade das plantas, determinada pela quantidade de folhas e consequentemente pela capacidade fotossintética (DE FAZIO, 2011).

Os óleos essenciais de espécies vegetais são misturas complexas de metabólitos especializados voláteis, constituídos por diferentes classes de substâncias orgânicas, representados principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos, originados respectivamente pela união de dois ou três isoprenos (SIMÕES; SPITZER, 2003). A formação desses terpenos envolve ATP e agente redutor (NAD(P)H^+), que atua como fonte doadora de elétrons, proveniente da fase fotoquímica da fotossíntese, necessários para a redução do fosfato metileritritol e do ácido mevalônico até o isopreno. Além disso, envolve esqueletos carbônicos gerados na fase bioquímica da fotossíntese, utilizando ATP e NAD(P)H^+ na incorporação do carbono para síntese de carboidratos, principal dreno de elétrons. Esses carboidratos podem ser direcionados para o crescimento vegetal e para síntese de moléculas do metabolismo especializado (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013; TAI; ZEIGER, 2009). Essas rotas de síntese dos terpenos atuam também na dissipação do excesso de energia fotossintética, constituindo importante mecanismo de proteção, protegendo a espécie em condições de elevada incidência luminosa e contribuindo com a defesa do vegetal contra agentes bióticos e abióticos (SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013; ZHAO et al., 2013).

Cada espécie vegetal produz um óleo essencial de composição química específica e apesar de sua produção ser controlada genética e epigeneticamente, condições ambientais

podem interferir na sua qualidade e quantidade (TRAPP; CROTEAU, 2001). Nesse sentido, a biossíntese dos compostos voláteis pode ser influenciada por fatores bióticos, relacionados a espécies de plantas, e fatores abióticos, relacionados ao ambiente em que a espécie se encontra (SHAO et al., 2007). Dentre estes fatores, a sazonalidade (SANTOS et al., 2009), as condições climáticas (MAKSIMOVIĆ et al., 2007), a intensidade luminosa (GOUINGUENÉ, S.P.; TURLINGS, 2002), a fertilização do solo (PICCAGLIA; MAROTTI, 1993), a fase fenológica (HOSSEIN MIRJALILI et al., 2006; MURAKAMI et al., 2013) e a variabilidade genética (LI et al., 2015), devem ser destacados.

O fator fenologia, por exemplo, pode afetar processos bioquímicos e rotas metabólicas capazes de modificar o desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas, como por exemplo os terpenos, influenciando diretamente no conteúdo e na qualidade dos óleos essenciais (SOUSA et al., 2011; USANO-ALEMANY; PALÁ-PAÚL; HERRÁIZ-PEÑALVER, 2014; BEN FARHAT et al., 2016). Este fato eleva a importância da época de coleta do óleo essencial, uma vez que sua composição e quantidade não são constantes no decorrer do ano e ao longo do ciclo de vida do vegetal (AMARAL et al., 2015; HASSIOTIS et al., 2014). Deste modo, o conhecimento da interação da fase fenológica e fotossíntese na biossíntese de compostos especializados pode indicar a influência dos estádios vegetativo e reprodutivo no perfil químico e no rendimento do óleo essencial.

Além disso, diversos compostos do metabolismo especializado, como óleos essenciais, estão sendo estudados por estarem relacionados com propriedades antimicrobianas e antifúngicas (LIMA et al., 2015). Neste contexto, plantas do gênero *Xylopia* se destacam na busca de novos bioativos devido aos inúmeros compostos secundários presentes (PIMENTA et al., 2009).

Xylopia aromatica (Lam.) Mart., espécie pertencente à família Annonaceae, apresenta ampla distribuição no Brasil, sendo uma das 38 espécies de ocorrência em 50% ou mais na composição da vegetação lenhosa de cerrado, embora também possa ser encontrada em regiões de floresta (RATTER et al. 2003). Óleos essenciais de *Xylopia aromatica* obtidos de folhas, frutos e casca apresentam mono e sesquiterpenos, sendo as substâncias principais encontradas, o limoneno, α -pineno, β -pineno, biciclogermacreno e espatulenol (MARTINS et al., 1996; MAIA, et al., 2005; SILVA; ROCHA, 1981).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se as fases fenológicas, vegetativa e reprodutiva, modificam o desempenho fotossintético e o perfil do óleo essencial de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., influenciando sua atividade biológica na defesa antioxidante e ação antifúngica.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram selecionadas 24 plantas de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart, 12 no estágio vegetativo e 12 no reprodutivo, localizados em remanescentes de Cerrado *stricto sensu* em área do município de Botucatu, bairro do Rio Bonito (São Paulo), nas coordenadas geográficas 22°42'31.8"S 48°21'28.6"W (Fazenda Flórida) e 22°42'47.9"S 48°19'49.9"W (Granja Moretto) (Figura 1), cujas características ambientais podem ser observadas na figura 2. As coletas foram realizadas nos dias 21 e 22 de abril de 2018 e 04 e 05 de maio de 2019. Delimitamos como fase vegetativa indivíduos aparentemente jovens e que não possuíam cicatriz do fruto, ou seja, ainda não haviam reproduzido. Como fase reprodutiva escolhemos aqueles indivíduos que apresentavam flores e/ou frutos (Figura 3). Após a realização do estudo do desempenho fotossintético, amostras de folhas foram coletadas e avaliadas junto aos laboratórios do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências (IBB) e do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

Material botânico fértil (ramos com flores e frutos) foi coletado para confecção de exsicatas que foram depositadas no Herbário “Irina Delanova de Gemtchújnicov - BOTU” Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB – UNESP).

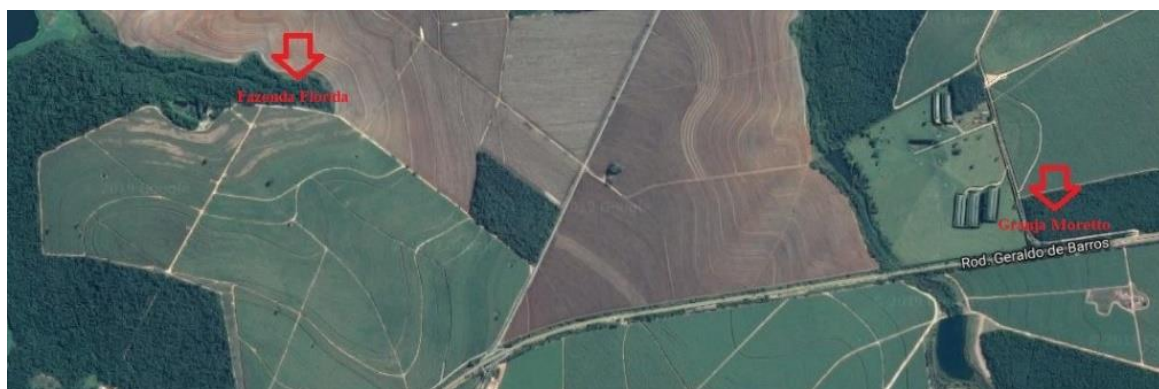


Figura 1. Localização da área de coleta, nas propriedades Fazenda Flórida e Granja Moretto, localizadas no bairro do Rio Bonito, município de Botucatu, São Paulo.

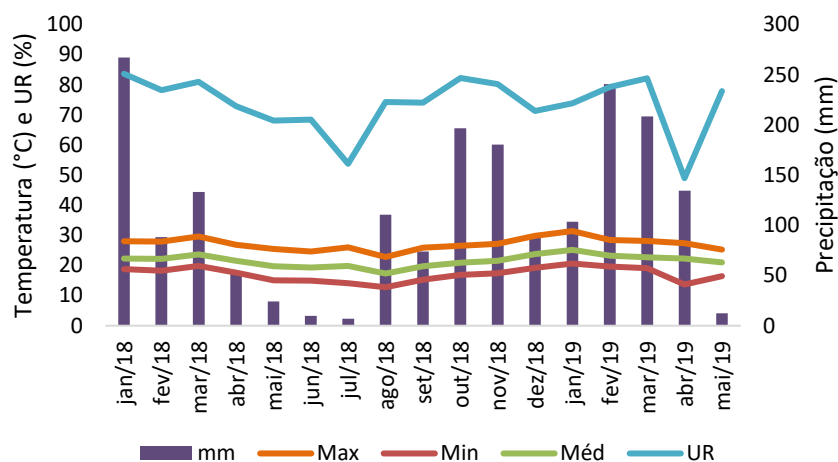


Figura 2. Precipitação (mm); Temperatura (°C) e Umidade relativa (%) no período compreendido entre janeiro de 2018 e maio de 2019. Dados coletados na estação meteorológica localizada no Departamento de Solo e Recursos ambientais, Unesp – Botucatu, São Paulo.



Figura 3. (A) *Xylopia aromatica* no estágio vegetativo; (B) *Xylopia aromatica* no estágio reprodutivo; (C) Flor de *Xylopia aromatica*; (D) Fruto verde de *Xylopia aromatica*; (E) Fruto maduro de *Xylopia aromatica*; (F) Cicatriz do fruto de *Xylopia aromatica*.

CARACTERÍSTICAS AVALIADAS

Potencial água das folhas e conteúdo relativo de água

Para a determinação do potencial água das folhas foram coletadas duas folhas totalmente expandidas de 24 plantas, acondicionadas em sacos plásticos separados, acomodados em caixas térmicas contendo gelo, para transporte ao laboratório onde as avaliações do potencial água (ψ_w) em MPa foram realizadas com analisador de potencial água e controlador de temperatura, WP4-T (Decagon Devices).

A determinação do conteúdo relativo de água da folha (CRA, %) foi realizada pelo método da pesagem e, para tanto, duas folhas de cada indivíduo, coletadas dos mesmos ramos das anteriores, foram acondicionadas em sacos plásticos separados, acomodados em caixas térmicas contendo gelo e transportadas ao laboratório, em seguida tiveram seus limbos cortados em círculos e pesados imediatamente para obtenção da massa fresca (MF). Em seguida as amostras foram colocadas em placas de Petri, com papel de filtro, imersas em água deionizada por 24 horas a 5°C para reidratação de acordo com Elsheery e Cao (2008) e obtenção da massa turgida (MT). A seguir as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 60°C até massa constante e determinação de massa seca (MS) (SMART; BINGHAM, 1974). As massas obtidas foram usadas na fórmula proposta por Weatherley (1949): $CRA = (MF-MS)/(MT-MS)*100$, para a determinação do CRA.

Fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em 24 plantas de *X. aromatica*, no período compreendido entre 9:00 e 11:00 horas, em dia ensolarado, com fluorômetro portátil de luz modulada acoplado ao GSF 3000 Fl sob irradiância saturante.

Foram determinados eficiência quântica potencial (F_v'/F_m'), captação de luz realizada pelo fotossistema II, eficiência quântica efetiva do (Fotossistema II) FSII (Φ_{PSII}), cujo valor se relaciona à estimativa do nível de $NADPH+H^+$, taxa de transporte de elétrons no Fotossistema II ($ETR = DFFF * \Delta F/F_m' * 0,5 * 0,84$), fração de luz absorvida pela antena FSII que é dissipada como calor ($D=1-F_v'/F_m'$) e fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada para a fase fotoquímica ($Ex = (1 - qP)*(F_v'/F_m')$) (DEMMIG-ADAMS et al., 1996).

Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas, nos mesmos indivíduos, utilizando-se equipamento com sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d'água por

radiação infra-vermelha (“Infra Red Gas Analyser – IRGA”, modelo GSF 3000, Walz). Tais medidas foram estimadas a partir da diferença entre a concentração de CO₂ e vapor d’água do ar da referência (valor presente na câmara sem a folha) e da amostra (valor com a folha presente na câmara), obtendo-se as concentrações de vapor d’água e CO₂ que foram liberados (transpiração – vapor d’água) e assimilados (assimilação de CO₂) pelos estômatos das folhas. As medidas foram realizadas no período compreendido entre 9:00 e 11:00 horas, em dia ensolarado.

As características de trocas gasosas analisadas foram: taxa de assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E, $\text{mmol vapor d’água m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs, $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ na folha (Ci, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$). A eficiência do uso da água (EUA, $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) foi determinada por meio da relação entre assimilação de CO₂ e taxa de transpiração (A/E), descrita por Berry e Downton (1983). A eficiência de carboxilação da Ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) foi determinada pela relação da taxa de assimilação de CO₂ com a concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (A_{net}/Ci, $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$).

Carboidratos, atividade enzimática e peroxidação lipídica

Para estas determinações foram coletadas 10 folhas totalmente expandidas, por planta. A coleta foi realizada tomando-se os cuidados necessários para minimizar a degradação das enzimas pela luz. As amostras foram envolvidas em papel alumínio e acondicionadas em sacos plásticos e, em seguida, congeladas em nitrogênio líquido para paralisar todas as reações.

Os açúcares redutores (MILLER, 1959), solúveis totais (MORRIS, 1948, YEMM; WILLIS, 1954) e amido (CLEGG, 1956) foram quantificados.

O teor de proteínas totais solúveis foi determinado pelo método proposto por Bradford (1976). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 595 nm e comparadas com a curva-padrão de caseína a 1%, sendo o teor proteico da amostra expresso em mg de proteína g⁻¹ de matéria fresca.

A determinação da atividade da peroxidase foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Teisseiree Guy (2000). A atividade específica da peroxidase foi expressa em $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína. A determinação da atividade da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o método proposto por Giannopolitis e Ries (1977). O nível de peroxidação de lipídeos foi avaliado utilizando a metodologia de Heath e Packer (1968).

Óleo essencial

Secagem das folhas e extração de óleo essencial

Foram coletados ramos de diferentes posições das 24 plantas de *Xylopia aromatica*. As folhas foram separadas dos ramos e secas em temperatura ambiente durante 15 dias, tempo suficiente para secagem e facilidade de seu acondicionamento no aparato tipo Clevenger.

Os óleos essenciais das folhas foram extraídos por hidrodestilação em aparato tipo Clevenger, por 2 horas, sendo, a seguir, armazenados em frascos de vidro (Vial, 5 mL) e mantidos no freezer até a análise da composição química.

Rendimento e caracterização da composição química do óleo essencial

O rendimento foi determinado, de acordo com a fórmula: $Re = (POE/PFolha) \times 100$. Onde: Re = Rendimento (%); POE = Peso óleo extraído (g); PFolha = Peso das folhas secas (g).

A análise qualitativa dos óleos essenciais foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM - Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste (1,0 mL/min), injetor a 220°C, detector a 230°C. Foi utilizado o programa de temperatura de 60°C-240°C, 3°C/min, efetuando-se as alterações de acordo com a eficiência de separação dos componentes da mistura.

A identificação das substâncias foi realizada pela comparação de seus espectros de massas com o banco de dados do sistema (CG-EM); índices de Retenção (IR) e dados de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos, pela análise nas mesmas condições operacionais das amostras de uma mistura de n-alcenos (C9-C40 - Sigma Aldrich 99%) e aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

A análise quantitativa dos óleos essenciais para estudo da sua composição química foi conduzida por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-DIC), empregando-se as mesmas condições operacionais das análises por CG-EM.

Atividade biológica do óleo essencial: antifúngica

As ATCCs (American Type Culture Collection) de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foram submetidas a testes de sensibilidade aos óleos essenciais de *Xylopia aromatica* das seguintes plantas (P2, P11 e P11), nos estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R) e nas coletas de 2018 e 2019: V2018P2, V2019P2, V2019P11, R2019P11, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM),

empregando-se metodologia de microdiluição consideradas de referência, método europeu AFST-EUCAST, meio líquido RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e tamponado com MOPS, pH 7,0, com 2% de glicose. Foram utilizadas placas de microtitulação, contendo doze colunas e oito fileiras, identificadas de A a H, totalizando noventa e seis poços por placa. Inicialmente, foram depositados os óleos e depois os inóculos de cada amostra, em volumes iguais. Os óleos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções de óleos foram, a seguir, diluídas no meio líquido RPMI-1640 até as concentrações finais (500µg/mL – 0,97µg/mL).

O inóculo de cada amostra foi sob forma de suspensão. A suspensão inicial foi feita em 5,0 mL de água deionizada e esterilizada, a partir de cinco colônias da amostra, ajustada à turbidez igual a 0,5 da escala de MacFarland, que equivale de 1×10^6 a 5×10^6 ufc/mL. Esse inóculo foi diluído 100 vezes, para ser usado nos testes de sensibilidade. O inóculo de cada amostra foi adicionado às mesmas fileiras das placas contendo os antifúngicos, em alíquotas de 100 µL, placas contendo inóculos, meio de culturas (controle-negativo de crescimento ou esterilidade e controle positivo de crescimento) e óleos foram incubadas a 35° C, por 24h. A leitura de inibição de cada amostra frente a cada óleo foi realizada com auxílio de espectrofotômetro de placas a 450nm.

As CIMs dos óleos foram as menores concentrações capazes de inibir, pelo menos, 50% do crescimento do microrganismo, quando comparada ao controle positivo. Após a determinação da CIM, foram realizados subcultivos de todos os poços das microplacas. Alíquotas de 100µL/mL foram semeadas em ágar batata. As placas foram incubadas de acordo com o tempo específico de cada microrganismo. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração do óleo com ≤ 1 colônia visível no meio de cultivo após o período de incubação.

Forma de análise dos resultados

Para verificar a normalidade e a homogeneidade de variância dos dados, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e de Levene (ZAR, 2010).

As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (ZAR, 2010). Análises multivariadas foram realizadas para avaliar tendências sazonais do perfil químico do óleo essencial dos indivíduos no mesmo estágio fenológico, coletados em 2018 e 2019, usando o programa XLSTAT (2017).

4.5. RESULTADOS

Fluorescência da clorofila *a*, potencial água das folhas e conteúdo relativo de água

Plantas de *Xylopia aromatica* coletadas no estágio vegetativo e reprodutivo, em 2018 e 2019 não apresentaram diferenças de eficiência quântica potencial adaptada a luz (F_v'/F_m') ($p > 0,2980$), eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_m'$) do (Fotossistema II) FSII ($p > 0,6223$), taxa de transporte de elétrons (ETR) ($p > 0,6252$), dissipação de calor no complexo antena (D) ($p > 0,2980$) e dissipação do excesso de energia do centro de reação do FSII (Ex) ($p > 0,3290$) (Tabela 1).

Também não foram verificadas diferenças no potencial água das folhas ($p > 0,9393$) e conteúdo relativo de água das folhas (CRA) ($p > 0,2469$) nesses indivíduos.

Tabela 1. Fluorescência da clorofila *a* de *Xylopia aromatica*, nos estádios vegetativo (Veg.) e reprodutivo (Rep.), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019.

Fluorescência da clorofila <i>a</i>										
	F_v'/F_m'		$\Delta F/F_m'$		ETR		D		Ex	
	Veg.	Rep.	Veg.	Rep.	Veg.	Rep.	Veg.	Rep.	Veg.	Rep.
2018	0,458	0,511	0,142	0,123	71,700	62,014	0,541	0,488	0,316	0,388
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,021	0,028	0,009	0,008	4,814	4,123	0,021	0,028	0,026	0,033
2019	0,488	0,497	0,157	0,150	79,490	75,725	0,512	0,502	0,3302	0,347
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,015	0,013	0,012	0,016	6,277	8,085	0,015	0,013	0,0244	0,026

F_v'/F_m' : eficiência quântica potencial adaptada a luz

$\Delta F/F_m'$: eficiência quântica efetiva do FSII

ETR: taxa de transporte de elétrons

D: dissipação de calor no complexo antena

Ex: dissipação do excesso de energia do centro de reação do FSII

Trocas gasosas

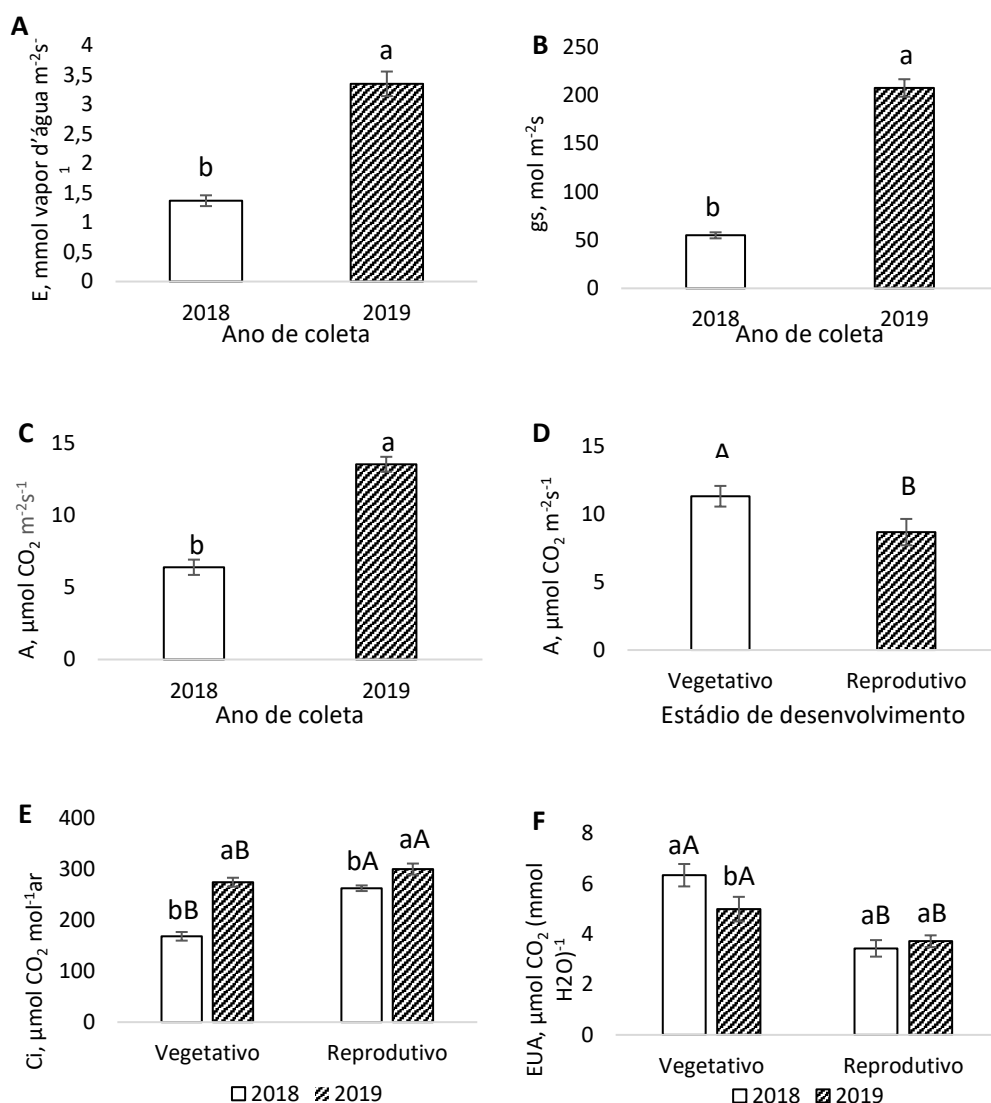
Não houve interação entre coleta e estágio de desenvolvimento para as variáveis taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (*g_s*) e taxa de assimilação de CO₂ (*A*). Em 2019 os indivíduos de *X. aromatica* apresentaram maiores taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (*g_s*) e taxa de assimilação de CO₂ (*A*). Nas duas coletas, 2018 e 2019, a taxa de assimilação de CO₂ (*A*) foi maior para as plantas coletadas no estágio vegetativo.

Eficiência do uso da água (EUA), eficiência de carboxilação da Ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) ($Anet/Ci$) e concentração interna de CO_2 na folha (Ci) apresentaram interação entre ano de coleta e estágio de desenvolvimento.

Embora, a eficiência de carboxilação da Ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) ($Anet/Ci$) tenha sido maior no estágio vegetativo, não foram observadas diferenças nas coletas de 2018 e 2019. Já no estágio reprodutivo o $Anet/Ci$ foi maior na coleta de 2019.

A eficiência do uso da água (EUA) foi maior no estágio vegetativo em 2018. Já nas plantas no estágio reprodutivo não houve diferença entre os anos de coleta.

A concentração interna de CO_2 na folha (Ci) no estágio reprodutivo foi maior que no vegetativo, ocorrendo maior acúmulo em 2019.



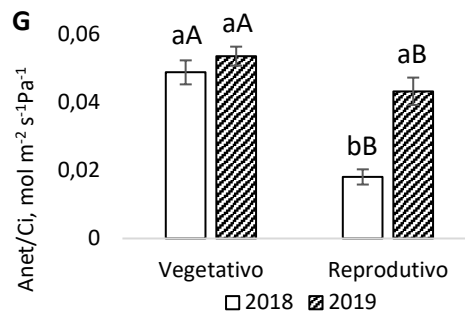


Figura 3. (A) taxa de transpiração (E , mmol vapor d'água $m^{-2}s^{-1}$); (B) condutância estomática (g_s , mol $m^{-2}s^{-1}$); (C) e (D) taxa de assimilação de CO_2 (A , $\mu mol CO_2 m^{-2}s^{-1}$); (E) concentração interna de CO_2 na folha (C_i , $\mu mol CO_2 mol^{-1}ar$); (F) eficiência do uso da água (EUA, $\mu mol CO_2 (mmol H_2O)^{-1}$); (G) eficiência de carboxilação Rubisco ($Anet/C_i$, mol $m^{-2} s^{-1}Pa^{-1}$), em *Xylopia aromatica*, no estágio vegetativo e reprodutivo, coletados em 2018 e reamostradas em 2019. Médias seguidas de letra diferentes diferem ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas representam ano e letras maiúsculas representam estágio de desenvolvimento.

Carboidratos, atividade enzimática e peroxidação lipídica

Plantas de *Xylopia aromatica* coletadas no estágio reprodutivo, independente do ano de coleta, apresentaram maiores teores de açúcares solúveis totais (Figura 4).

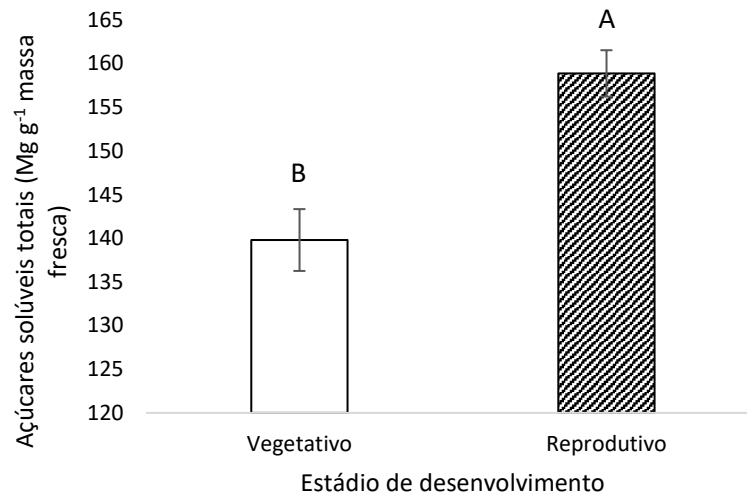


Figura 4. Açúcares solúveis totais ($mg g^{-1}$ massa fresca) de plantas de *Xylopia aromatica*, nos estádios vegetativo e reprodutivo, coletadas em 2018 e reamostradas em 2019. Médias seguidas de letra diferentes diferem ao nível de 5% de significância.

Os açúcares redutores também apresentaram maior acúmulo nas plantas coletadas no estágio reprodutivo, no entanto, maior em 2019 (Figura 5).

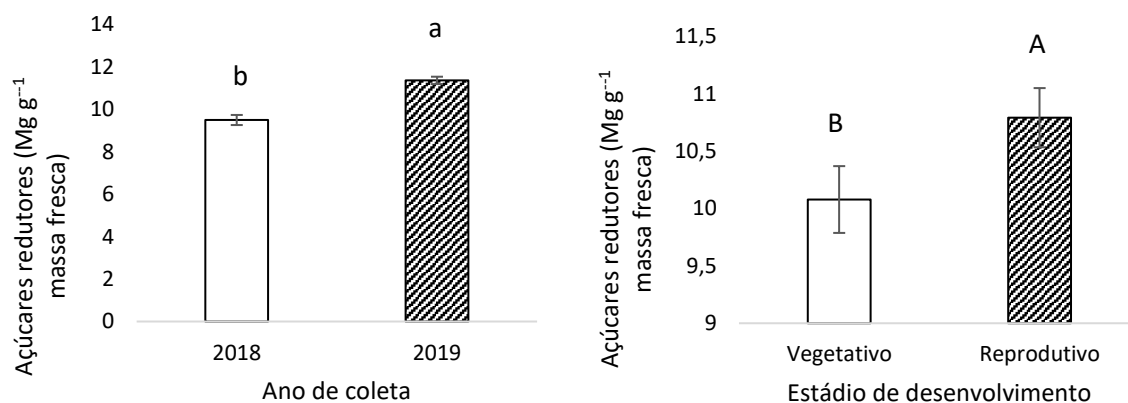


Figura 5. Açúcares redutores (mg g⁻¹ massa fresca) de plantas de *Xylopia aromatica*, nos estádios vegetativo e reprodutivo, coletadas em 2018 e reamostradas em 2019. Médias seguidas de letra diferentes diferem ao nível de 5% de significância.

O acúmulo de amido em 2018 nas plantas coletadas nos estádios vegetativo e reprodutivo não diferiu. Em 2019, plantas de *Xylopia aromatica* coletadas no estágio reprodutivo apresentaram maior acúmulo de amido (Figura 6).

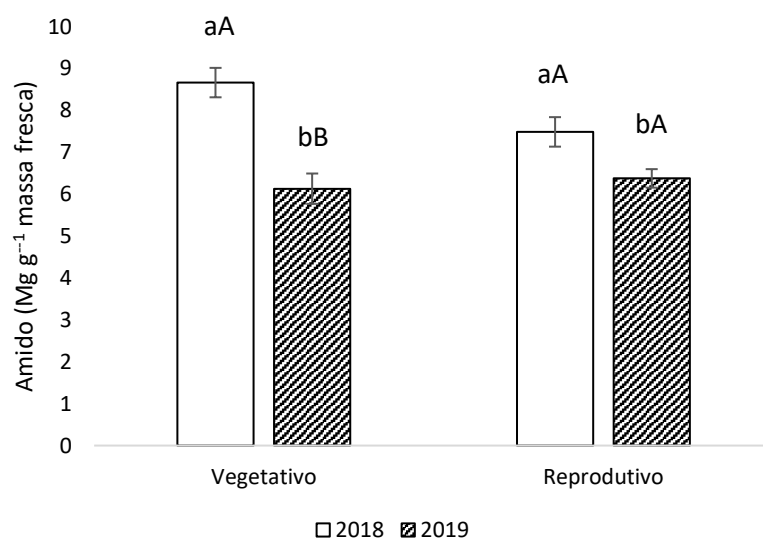


Figura 6. Amido de plantas (mg g⁻¹ massa fresca) de *Xylopia aromatica*, no estágio vegetativo e reprodutivo, coletados em 2018 e reamostrados em 2019. Médias seguidas de letra diferentes diferem ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas comparam ano e maiúsculas, estágio de desenvolvimento.

Plantas de *Xylopia aromatica* coletadas nos estádios vegetativo e reprodutivo, nos anos de 2018 e reamostradas em 2019 não apresentaram diferenças na atividade da enzima peroxidase ($p > 0,1107$) e catalase ($p > 0,5027$) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade das enzimas peroxidase (POD) e catalase (CAT) de plantas de *Xylopia aromatica*, no estágio vegetativo (Veg.) e reprodutivo (Rep.), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019.

Atividade das enzimas peroxidase e catalase				
	POD (umol/min/mg de proteína)		CAT (mKatug de proteína)	
	Veg.	Rep.	Veg.	Rep.
2018	4,343 ± 0,596	4,622 ± 0,460	87,578 ± 31,459	50,255 ± 20,992
2019	5,349 ± 1,246	2,850 ± 0,560	108,624 ± 35,111	108,767 ± 20,248

Plantas de *Xylopia aromatica* reamostradas no estágio vegetativo em 2019 apresentaram maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). No estágio reprodutivo, as plantas apresentaram maior atividade na coleta de 2018 (Figura 7).

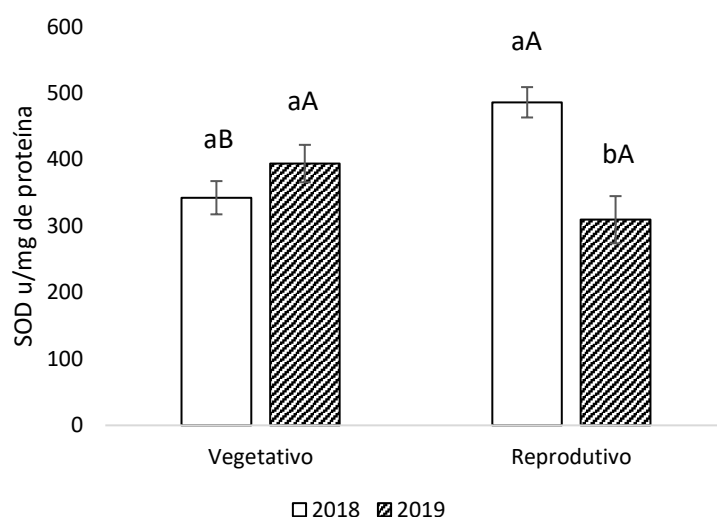


Figura 7. Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) de plantas de *Xylopia aromatica*, nos estádios vegetativo e reprodutivo, coletadas em 2018 e reamostradas em 2019. Médias seguidas de letras diferentes diferem ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas comparam ano e maiúsculas, estágio de desenvolvimento.

Plantas de *Xylopia aromatica* coletadas no estágio reprodutivo, independente do ano de coleta, apresentaram maior peroxidação lipídica (Figura 8).

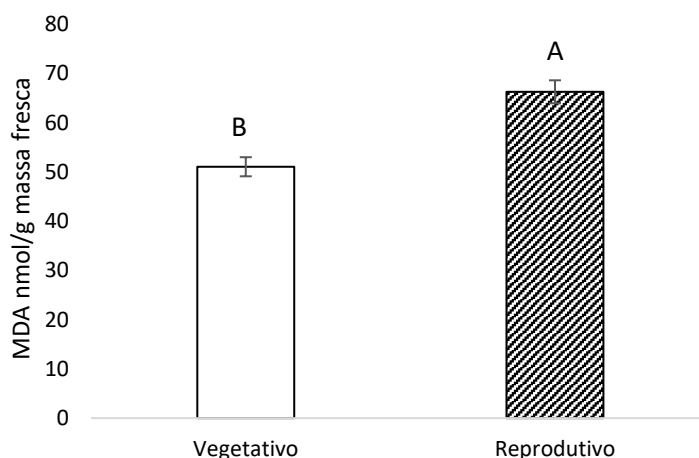


Figura 8. Atividade da Peroxidação lipídica (expresso pela formação de malonaldeído, MDA) de plantas de *Xylopia aromatica*, no estágio vegetativo e reprodutivo, coletados em 2018 e reamostrados em 2019. Médias seguidas de letras diferentes diferem ao nível de 5% de significância.

Rendimento e caracterização da composição química do óleo essencial

No perfil químico do óleo essencial extraído de folhas de 24 plantas, 12 no estágio vegetativo e 12 no reprodutivo coletadas em 2018 e 2019, foram observadas 31 substâncias sendo o espatulenol responsável por mais de 50% do óleo essencial de *Xylopia aromatica*.

A análise de componentes principais (PCA) revela que as substâncias α e β pineno discriminam a planta 2 no estágio vegetativo coletada em 2018 e 2019 (V2018P2 e V2019P2). Os demais indivíduos foram discriminados pelas substâncias espatulenol, globulol, germacreno D, *p*-cimeno e limoneno (Figura 9).

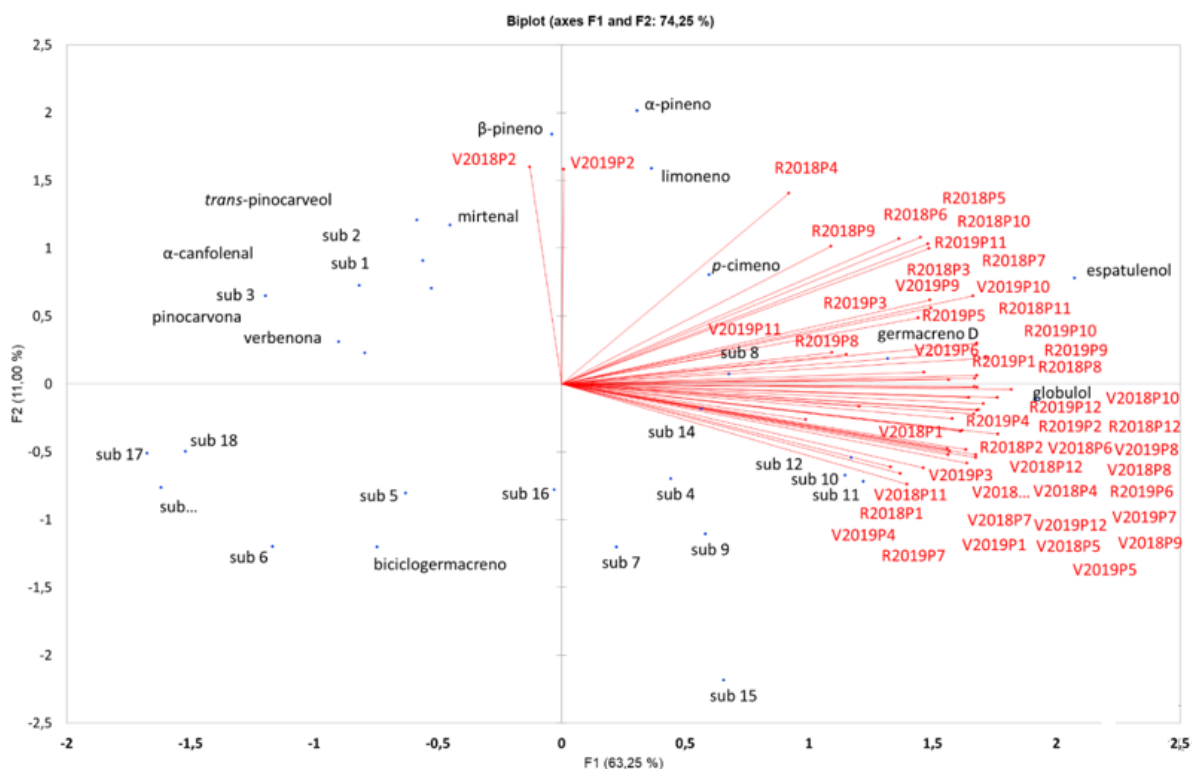


Figura 9. Análise de componentes principais (PCA) com base em 31 substâncias constituintes do óleo essencial de 24 plantas (P) de *Xylopia aromatica*, no estágio vegetativo (V) (12 plantas) e reprodutivo (R) (12 plantas), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019.

O dendrograma apresenta a composição química das 24 plantas, sendo 12 no estágio vegetativo e 12 no reprodutivo, coletadas e avaliadas em dois anos. Oito clusters podem ser observados. No cluster I verifica-se o agrupamento de seis plantas no estágio vegetativo coletadas nos dois anos (V2018P5; V2019P5, V2018P7; V2019P7, V2018P8; V2019P8, V2018P9; V2019P9, V2018P10; V2019P10, V2018P12; V2019P12), quatro plantas no estágio vegetativo no ano de 2018 (V2018P3, V2018P4, V2018P6 e V2018P11) e uma planta no estágio vegetativo no ano de 2019 (V2019P1), totalizando 11 plantas distribuídas em 17 tratamentos. Neste mesmo cluster foi observado o agrupamento de três plantas no estágio reprodutivo coletadas nos dois anos (R2018P1; R2019P1, R2018P2; R2019P2 e R2018P12; R2019P12), duas plantas no estágio reprodutivo no ano de 2018 (R2018P8 e R2018P11) e seis plantas no estágio reprodutivo no ano de 2019 (R2019P4, R2019P5, R2019P6, R2019P7, R2019P9 e R2019P10), totalizando 11 plantas, distribuídas em 14 tratamentos.

O cluster II agrupou duas plantas no estágio vegetativo coletadas em 2019 (V2019P4 e V2019P6). O cluster III foi constituído por 8 plantas do estágio reprodutivo, sendo uma coletada em 2019 (R2018P3, R2018P4, R2018P5, R2018P6, R2018P7, R2018P9 e R2019P11). O cluster IV foi constituído por uma planta no estágio vegetativo coletada em 2018 (V2018P1). O cluster V é representado por uma planta no estágio reprodutivo coletada em 2019 (R2019P3).

O cluster VI foi formado por uma planta no estágio vegetativo coletada em 2019 (V2019P3). O cluster VII é representado por uma planta no estágio vegetativo e uma no estágio reprodutivo coletadas em 2019 (V2019P11 e V2019P8) e o cluster VIII agrupou uma planta no estágio vegetativo coletada em 2018 e 2019 (V2018P2 e V2019P2) (Figuras 10). As plantas agrupadas no Cluster IV, V, VI e VII representam 10% dos tratamentos (Figura 10).

Dessa forma, podemos observar que as plantas no estágio vegetativo apresentaram perfil químico similar, uma vez que houve o agrupamento das mesmas plantas coletadas no ano de 2018 e 2019, agrupadas no cluster I e VIII.



Figura 10. Dendrograma de similaridade (correlação de sperman usando agrupamento UPGMA) com base em 31 substâncias constituinte do óleo essencial de 24 plantas-P de *Xylopia aromatica*, nos estádios vegetativo (V) (12 plantas) e reprodutivo (R) (12 plantas), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019.

A figura 11 apresenta as substâncias majoritárias responsáveis pela formação dos clusters acima referidos.

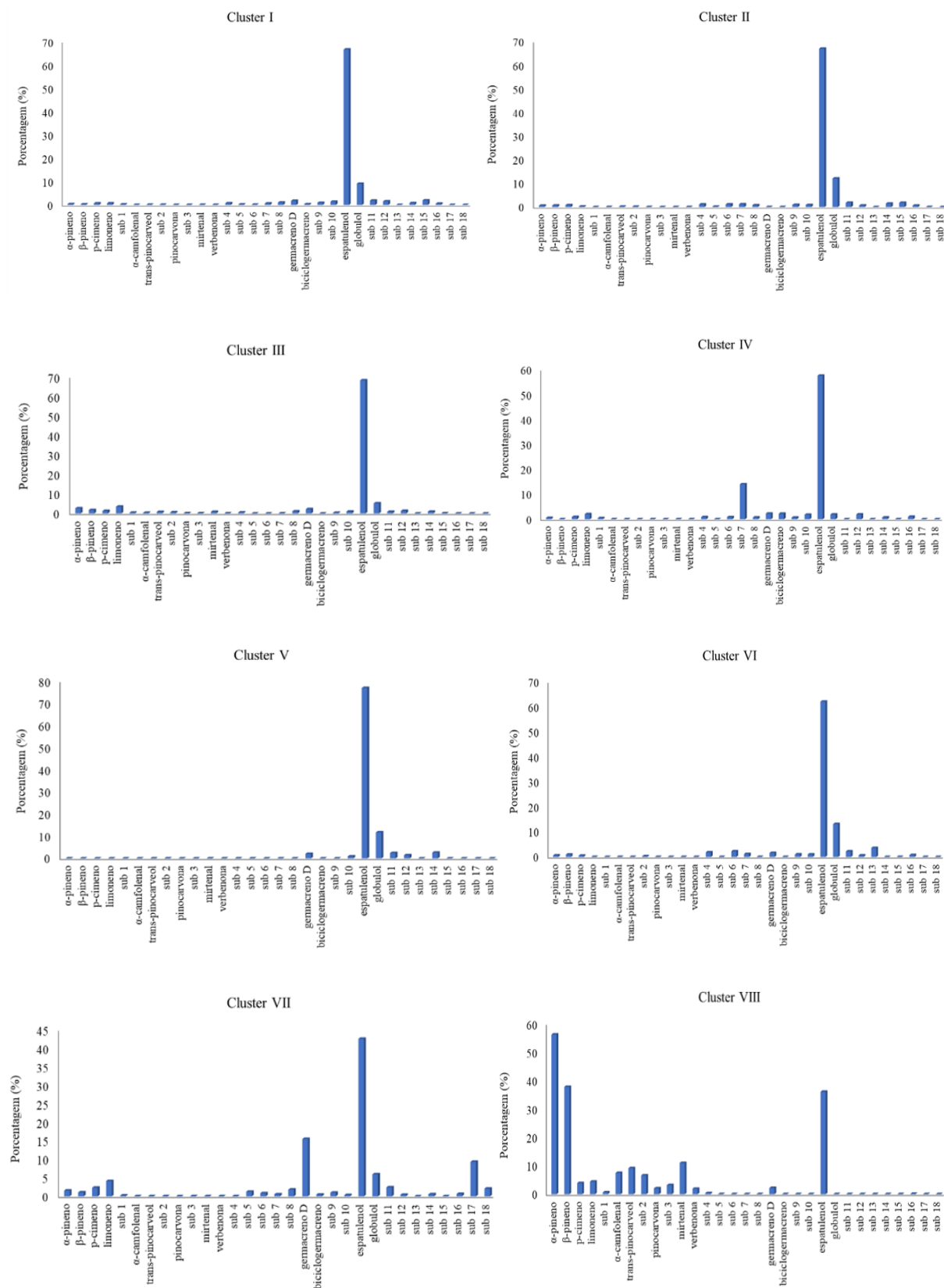


Figura 11. Substâncias do óleo essencial de *Xylopia aromatica* responsáveis pelo agrupamento dos clusters.

O rendimento do óleo essencial de 24 plantas de *Xylopia aromatica*, no estágio vegetativo (12 plantas) e reprodutivo (12 plantas) foi maior na coleta realizada em 2019, independente do estágio reprodutivo (Figura 12).

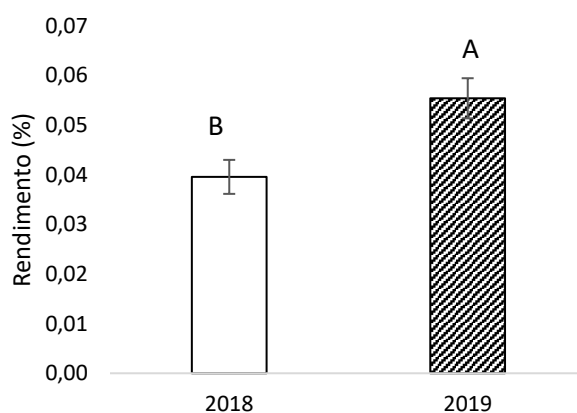


Figura 12. Rendimento do óleo essencial de 24 plantas de *Xylopia aromatica*, nos estádios vegetativo (12 plantas) e reprodutivo (12 plantas), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019. . Médias seguidas de letras diferentes diferem ao nível de 5% de significância.

O α -pineno e β -pineno apresentaram maior porcentagem relativa na coleta de 2019 no estágio vegetativo e em 2018 no estágio reprodutivo. O espatulenol apresentou maior porcentagem relativa no estágio reprodutivo, não diferindo em relação ao ano de coleta. A pinocarvona apresentou maior porcentagem relativa na coleta de 2018 no estágio reprodutivo. O germacreno D apresentou maior porcentagem relativa na coleta de 2018 e o globulol em 2019. Os demais compostos identificados não apresentaram diferenças nos estádios de desenvolvimento e nos anos de coleta (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de retenção linear calculado (IRL_E), máximo e mínimo, e composição química (% relativa) das substâncias do óleo essencial de *Xylopia aromatica*, no estágio vegetativo e reprodutivo, coletadas em 2018 e reamostradas em 2019.

	IRL _E	Ano de coleta	Vegetativo			Reprodutivo			Média ano	p<F
			Mi n	Max	Média	Mi n	Ma x	Média		
α -pineno	932	2018	0,04	20,08	0,47 bA	0,0 4	5,1 8	1,66 aA	1,07	0,042
Média estágio		2019	0,23	36,22	1,18 aA	0,0 1	2,9 8	0,75 aA	0,97	
			0,83			1,21				

β-pineno	975	2018	0,01	12,75	0,28 bA	0,0 4	3,1 7	1,12 aA	0,70	0,025
Média estádio		2019	0,04	25,10	0,95 aA	0,0 1	2,2 2	0,57 aA	0,76	
			0,62		0,85					
p-cimeno	1021	2018	0,04	3,42	0,93 ^{ns}	0,0 4	1,9 6	1,08 ^{ns}	1,01	0,531
Média estádio		2019	0,37	3,21	0,87 ^{ns}	0,0 1	1,4 2	0,74 ^{ns}	0,80	
			0,90		0,91					
Limoneno	1025	2018	0,04	3,67	0,75 ^{ns}	0,0 4	5,0 8	1,50 ^{ns}	1,12	0,193
Média estádio		2019	0,04	4,82	1,25 ^{ns}	0,0 1	16	0,91 ^{ns}	1,08	
			0,99		1,2					
Sub 1		2018	0,01	1,27	0,28 ^{ns}	0,0 1	0,9 2	0,33 ^{ns}	0,3	0,23
Média estádio		2019	0,01	1,79	0,37 ^{ns}	0,0 1	0,6 9	0,14 ^{ns}	0,25	
			0,32		0,24					
α-camfolenal	1122	2018	0,01	4,17	0,38 ^{ns}	0,0 4	1,2 2	0,23 ^{ns}	0,3	0,781
Média estádio		2019	0,04	3,31	0,31 ^{ns}	0,0 1	0,0 4	0,04 ^{ns}	0,17	
			0,35		0,13					
Trans-pinocarveol	1134	2018	0,04	5,28	0,51 ^{ns}	0,0 4	1,7 6	0,48 ^{ns}	0,49	0,732
Média estádio		2019	0,04	3,88	0,42 ^{ns}	0,0 4	0,6 5	0,19 ^{ns}	0,31	
			0,47		0,34					
Sub 2	1140	2018	0,01	3,81	0,37 ^{ns}	0,0 4	1,6 1	0,35 ^{ns}	0,36	0,791
Média estádio		2019	0,01	2,83	0,36 ^{ns}	0,0 1	0,7	0,22 ^{ns}	0,29	
			0,36		0,28					
Pinocarvona	1157	2018	0,04	1,28	0,06 bA	0,0 4	0,4 8	0,17 aA	0,114	0,019
Média estádio		2019	0,04	0,81	0,05 aA	0,0 1	0,0 4	0,32 aB	0,041	
			0,05		0,1					
Sub 3	1181	2018	0,01	2,71	0,24 ^{ns}	0,0 1	0,6 1	0,14 ^{ns}	0,192	0,748
Média estádio		2019	0,01	0,47	0,06 ^{ns}	0,0 1	0,0 4	0,03 ^{ns}	0,047	
			0,154		0,085					
Mirtenal	1191	2018	0,04	6,23	0,59 ^{ns}	0,0 4	2,4	0,57 ^{ns}	0,58	0,671
Média estádio		2019	0,04	4,79	0,43 ^{ns}	0,0 4	0,6 5	0,12 ^{ns}	0,28	
			0,51		0,34					
Verbenona	1204	2018	0,04	1,3	0,14 ^{ns}	0,0 4	0,5 5	0,08 ^{ns}	0,11	0,846

Média estádio		2019	0,04	0,62	0,11 ^{ns}	0,0 4	0,4 1	0,07 ^{ns}	0,08	
			0,13			0,08				
Sub 4	1433	2018	0,01	2,66	1,02	0,0 4	0,8 1	0,50	0,76	
Média estádio		2019	0,04	1,9	0,8	0,0 4	0,8 6	0,37	0,59	
			0,91 a			0,44 b				0,001
Sub 5		2018	0,01	2,05	0,30 ^{ns}	0,0 1	2,9 6	0,28 ^{ns}	0,29	0,972
		2019	0,01	1,44	0,20 ^{ns}	0,0 1	1,0 5	0,17 ^{ns}	0,19	
Média estádio			0,25			0,23				
Sub 6		2018	0,01	0,87	0,09	0,0 1	0,0 1	0,01	0,05 B	0,006
Média estádio		2019	0,01	2,26	0,71	0,0 1	0,7 9	0,13	0,4 A	
			0,4 a			0,07 b				0,015
Sub 7		2018	0,01	14,05	1,16 aA	0,0 4	1,0 1	0,243 bA	0,7	0,027
Média estádio		2019	0,01	1,25	0,624 aB	0,0 1	0,9 1	0,421 aA	0,52	
			0,89			0,33				
Sub 8		2018	0,01	1,49	1,02 ^{ns}	0,7 1	1,6 4	1,11 ^{ns}	1,06	0,458
Média estádio		2019	0,01	2,19	0,72 ^{ns}	0,0 1	2,1 5	1,08 ^{ns}	0,9	
			0,87			1,09				
Germacreno D	1474	2018	0,01	3,03	2,20	1,9 1	3,1 7	2,49	2,34 A	0,001
Média estádio		2019	0,04	16,08	1,39	0,0 4	14, 9	1,28	1,34 B	
			1,8			1,88				
Biciclogerma creno	1489	2018	0,01	2,24	0,21 ^{ns}	0,0 1	1,1 6	0,15 ^{ns}	0,18	0,191
Média estádio		2019	0,01	0,58	0,08 ^{ns}	0,0 1	5,0 7	0,24 ^{ns}	0,16	
			0,15			0,19				
Sub 9		2018	0,01	1,27	1,02	0,0 4	1,2	0,61	0,82	
Média estádio		2019	0,01	1,48	0,94	0,0 1	1,6 3	0,54	0,74	
			0,98 a			0,58 b				0,001
sub 10		2018	0,01	2,35	1,76	0,0 4	2,6 1	1,38	1,57 A	0,001
Média estádio		2019	0,01	1,65	0,92	0,0 4	1,2	0,82	0,87 B	
			1,34			1,1				
Espatulenol	1570	2018	23,1	69,34	59,66	59, 3	73, 7	69,14	64,4	
Média estádio		2019	13	72	58,38	56	78, 5	68,42	63,4	
			59,02 b			68,77 a				0,007

Globulol	1586	2018	0,01	20,13	7,34	3,0 6	11, 5	5,29	6,32 B	0,001
Média estádio		2019	0,01	13,16	10,13	6,2 3	12, 2	9,54	9,83 A	
			8,73			7,41				
Sub 11		2018	0,01	2,22	1,46	0,0 4	1,5 4	0,9	1,18 B	0,001
Média estádio		2019	0,01	3,44	2,29	0,6 1	3,8 7	1,89	2,09 A	
			1,88 a			1,4 b				0,037
Sub 12		2018	0,01	2,82	1,73	0,6 3	2,2 6	1,64	1,68 A	0,001
Média estádio		2019	0,01	2,22	1,05	0,0 4	1,7 7	1,01	1,03 B	
			1,39			1,32				
Sub 13		2018	0,01	0,29	0,04 ^{ns}	0,0 1	0,0 4	0,01 ^{ns}	0,02	0,626
Média estádio		2019	0,01	3,63	0,06 ^{ns}	0,0 1	0,0 4	0,01 ^{ns}	0,03	
			0,05			0,01				
Sub 14		2018	0,01	1,74	0,81 ^{ns}	0,4 1	0,8 6	0,61 ^{ns}	0,71	0,484
Média estádio		2019	0,01	2,46	0,96 ^{ns}	0,3 1	3,0 8	1,02 ^{ns}	0,99	
			0,89			0,81				
Sub 15		2018	0,01	3,42	1,43 ^{ns}	0,0 1	2,0 2	0,59 ^{ns}	1,01	0,14
Média estádio		2019	0,01	3,84	1,62 ^{ns}	0,0 1	3,5 9	1,89 ^{ns}	1,76	
			1,52			1,24				
Sub 16		2018	0,04	1,11	0,7	0,0 4	0,8 4	0,14	0,42	
Média estádio		2019	0,04	1,02	0,56	0,0 1	0,7 8	0,37	0,46	
			0,63 a			0,25 b				0,001
Sub 17		2018	0,01	0,04	0,02 ^{ns}	0,0 1	0,0 4	0,01 ^{ns}	0,02	0,487
Média estádio		2019	0,01	15,14	0,22 ^{ns}	0,0 1	3,4 9	0,06 ^{ns}	0,14	
			0,12			0,04				
Sub 18		2018	0,01	0,04	0,02 ^{ns}	0,0 1	0,0 4	0,01 ^{ns}	0,01	0,392
Média estádio		2019	0,01	4,12	0,07 ^{ns}	0,0 1	0,0 4	0,01 ^{ns}	0,04	
			0,04			0,01				

Médias seguidas de letras diferentes diferem ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas comparam médias na coluna e letras maiúsculas comparam médias na linha. Tukey (p<0,05). N = 12.

Atividade biológica do óleo essencial: antifúngica

As espécies fúngicas avaliadas frente às diferentes concentrações dos óleos essenciais não demonstraram ser sensíveis com concentrações $\geq 500 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Tabela 4), apresentando crescimento em meio de cultura após 24h de incubação com os óleos avaliados e não revelando, portanto, atividade antifúngica.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (MIC) dos óleos essenciais de folhas de plantas (P) de *Xylopia aromatica* nos estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019 em espécies fúngicas.

Espécies fúngicas	MIC ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)			
	Óleo essencial de folhas de <i>Xylopia aromatica</i>			
	V2018P2	V2019P2	V2019P11	R2019P11
<i>Candida albicans</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
<i>Candida parapsilosis</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
<i>Candida glabrata</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
<i>Cryptococcus neoformans</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
<i>Cryptococcus gattii</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500

Na tabela 5 pode ser observada a composição dos óleos extraídos de folhas de plantas (P) de *Xylopia aromatica* nos estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019, testados nas cepas de cinco espécies fúngicas.

Tabela 5. Substâncias identificadas (%) dos óleos essenciais de folhas de plantas (P) de *Xylopia aromatica* nos estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019 utilizados para os testes antifúngicos das cepas das cinco espécies fúngicas (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*)

Substâncias identificadas (%)	Óleo essencial de folhas de <i>Xylopia aromatica</i>			
	V2018P2	V2019P2	V2019P11	R2019P11
α -pineno	20,08	36,22	1,93	2,98
β -pineno	12,75	25,10	1,41	2,22
<i>p</i> -cimeno	3,42	0,50	3,21	t
Limoneno	3,67	0,75	5,52	16,04
α -camfolenal	4,17	3,31	t	t

<i>Trans</i> -pinocarveol	5,28	3,88	t	0,65
Pinocarvona	1,28	0,81	t	t
Mirtenal	6,23	4,79	t	t
Verbenona	1,30	0,62	t	t
Germacreno D	nc	2,16	16,08	t
Biciclogermacreno	nc	nc	0,58	t
Espatulenol	23,14	12,97	30,18	56,00
Globulol	nc	nc	4,94	11,11

4.6. DISCUSSÃO

Xylopia aromatica coletadas no estágio vegetativo e reprodutivo em 2018 e 2019 não apresentaram limitação fotoquímica, uma vez que seus parâmetros de eficiência quântica potencial adaptada a luz (F_v'/F_m'), eficiência quântica efetiva ($\Delta F/F_m'$) do Fotossistema II (FSII), taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação de calor no complexo antena (D) e dissipação do excesso de energia do centro de reação do FSII (Ex), foram iguais para os estádios de desenvolvimento e para os dois anos de coleta (WILHELM; SELMAR, 2011). Talvez o fato da espécie estar adaptada a diferentes condições de luminosidade justifique esse resultado, aproveitando de forma eficiente o recurso luminoso (RATTER et al., 1996; CARVALHO; DE MARCO; FERREIRA, 2009).

Plantas no estágio vegetativo coletadas em 2018 e 2019 apresentaram maior eficiência do uso da água. A menor transpiração e condutância estomática permitiram maior controle do recurso hídrico, sem influenciar a entrada de carbono o que resultou em maior assimilação, uma vez que a eficiência de carboxilação da Rubisco foi similar entre os dois anos de coleta (BUCCI et al., 2008).

A maior assimilação e eficiência de carboxilação das plantas no estágio vegetativo pode ter contribuído com maior taxa de crescimento, uma vez que indivíduos jovens apresentam crescimento mais acelerado que adultos (estádio reprodutivo) (DOS SANTOS et al., 2015; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As plantas no estágio reprodutivo coletadas em 2018 e 2019 apresentaram menores eficiência do uso da água. A menor assimilação de carbono observada sugere limitação da eficiência da Rubisco, confirmada pelos menores resultados desta variável, levando a maior concentração de carbono interno nessas plantas (SAGE et al., 2008).

As maiores taxas de transpiração, condutância estomática e assimilação de carbono observadas na coleta de 2019 podem ser consequência de maior volume pluviométrico nesse período em relação a coleta de 2018 (Figura 2). Maior disponibilidade hídrica contribuiu com melhor aproveitamento do CO₂ e maior síntese de esqueletos carbônicos, uma vez que a eficiência de carboxilação da Rubisco foi adequada (NUNES-NESI; FERNIE; STITT, 2010). Nessas condições maior direcionamento de recursos para o metabolismo de terpenos pode explicar maior rendimento do óleo essencial de *Xylopi aromatic* (AHARONI; GALILI, 2011; SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2017). Esses resultados estão de acordo com maior produção de óleo essencial no final do período chuvoso, coincidiu com o final da frutificação de *Copaifera langsdorffii*. Nesse estudo houve menor rendimento de óleo durante o período mais seco, coincidindo com queda foliar e brotação desses indivíduos. A redução do rendimento de óleo essencial durante a estação seca talvez possa ser mecanismo natural de drenagem, em que a degradação de metabólitos especializados mantém o metabolismo primário (SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2017).

Plantas de *Xylopi aromatic* coletadas no estágio reprodutivo apresentaram maiores teores de açúcares solúveis totais, que são substratos de grande importância para o metabolismo vegetal, envolvidos em eventos fisiológicos e na importação de carbono para dreno metabolicamente ativo, podendo ser utilizado no desenvolvimento dos frutos (KOCH, 2004).

Os açúcares redutores utilizados nos processos metabólicos com maior acúmulo nas plantas coletadas no estágio reprodutivo podem indicar possibilidade de maior investimento na formação dos frutos, uma vez que são os drenos preferenciais de fotoassimilados durante esse período (LAVIOLA et al., 2007). Maior acúmulo de açúcares redutores observado na coleta de 2019 pode estar relacionado com ambiente mais úmido, condição que contribuiu para maior abertura estomática, maior entrada de CO₂ e maior assimilação de carbono, necessárias para síntese de açúcares, conforme também verificado por outros autores (MORGAN, 1984; MUNNS, 1988). O menor acúmulo de açúcares redutores no estágio vegetativo pode ser explicado pelo consumo para crescimento, o que justifica a maior assimilação de carbono.

Maior acúmulo de amido nos dois estádios de desenvolvimento na coleta de 2018, período em que o volume pluviométrico foi menor, pode encontrar explicação na condição desfavorável. Estudos recentes referem amido como molécula chave na mediação das respostas das plantas a estresses abióticos, como falta de água, alta salinidade ou temperaturas extremas, condições nas quais as plantas geralmente remobilizam o amido para fornecer energia e carbono nos momentos em que a fotossíntese pode ser potencialmente limitada, apoiando o desenvolvimento das plantas sob estresse e funcionando como osmoprotetores (THALMANN; SANTELIA, 2017; KRASENSKY; JONAK, 2012). Na coleta de 2019, plantas no estágio

reprodutivo apresentaram maior acúmulo de amido, garantindo assim, a síntese de açúcares na fotossíntese suficiente para o desenvolvimento do fruto e reserva com formação de amido (THALMANN; SANTELIA, 2017). O amido é a principal fonte de armazenamento de carboidratos nas plantas, e seu metabolismo é melhor compreendido nas folhas, onde é sintetizado durante o dia e mobilizado durante a noite para garantir um suprimento constante de carbono e energia quando a fotossíntese não é possível (STITT; ZEEMAN, 2012; THALMANN; SANTELIA, 2017).

Maior peroxidação lipídica no estágio reprodutivo (frutificação) pode se dever a maior suscetibilidade dessa fase a estresses bióticos e abióticos. O ambiente mais seco na coleta realizada em 2018 pode ter colaborado com o aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), primeira enzima na linha de defesa das plantas contra as EROs, (ALSHER et al., 2002), responsável por dismutar o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no cloroplasto, mitocôndria, citoplasma e peroxissomo (HABIB et al., 2016; SCANDALIOS, 1993; WANG et al., 2009). No entanto, como as enzimas catalase e peroxidase não apresentaram aumentos nas atividades, é possível que não tenham sido eficientes em diminuir o nível de H_2O_2 , responsável pela peroxidação lipídica, o que pode causar lesão nas membranas celulares.

A formação de espécies reativas de oxigênio é a primeira resposta bioquímica das células eucarióticas submetidas a estresses bióticos e abióticos, e a sua produção em plantas é conhecida como estresse oxidativo (ANJUM et al., 2011). As EROs são responsáveis por causar danos na membrana plasmática, macromoléculas como DNA e proteínas, e esse dano pode ser monitorado pela avaliação da peroxidação lipídica (APEL; HIRT, 2004). O ácido malondialdeído (MDA) é um dos produtos formados na peroxidação lipídica e tem sido considerado indicador de dano oxidativo (APEL; HIRT, 2004; MOLLER et al., 2007).

A menor peroxidação lipídica observada no estágio vegetativo pode ter resultado da ação efetiva das enzimas antioxidantes. Maior atividade da SOD em 2019 previniu o acúmulo de H_2O_2 e a atividade da CAT e POD foi suficiente para controlar os níveis de espécies reativas de oxigênio, evitando dano na membrana.

A peroxidase (POD) e a catalase (CAT) desempenham papel fundamental na eliminação do peróxido de hidrogênio, sendo a catalase uma das principais enzimas de eliminação de H_2O_2 na mitocôndria (SHIGEOKA et al., 2002). As plantas possuem várias isoformas de CAT, sendo sua atividade mais efetiva em concentrações relativamente elevadas de H_2O_2 , motivo pelo qual são consideradas indispensáveis em condições de estresse, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores (DUBEY, 2011). As PODs utilizam compostos de natureza fenólica como doadores de elétrons para catalisar as reações de dismutação do H_2O_2 e localizam-se principalmente na parede celular e no vacúolo (LOCATO et al., 2011).

O perfil químico do óleo essencial de *X. aromatica* sugere que as plantas coletadas no estágio vegetativo apresentam perfil químico similar, uma vez que, neste estágio, seis plantas foram agrupadas no mesmo cluster (Cluster I) independente do ano de coleta. Além disso, há formação de um cluster (Cluster VIII) com um indivíduo coletado nos dois anos. Este fato pode estar relacionado a maior síntese de esqueletos carbônicos sugeridos pela taxa de assimilação de CO₂ e eficiência de carboxilação da Ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Nessas condições, os esqueletos carbônicos devem estar direcionados mais para crescimento do que para a síntese de terpenos. Resultado oposto foi observado para as plantas em estágio reprodutivo.

Vários resultados observados no presente estudo estão de acordo com observações de diferentes pesquisadores, em que os componentes do óleo essencial estão relacionados as fases de desenvolvimento (estágio vegetativo ou reprodutivo), desenvolvimento de órgãos, partes de plantas e diferentes estágios de colheita (TONÇER, 2005). Além disso, o efeito de diferentes estádios fenológicos no óleo e seus constituintes pode ser devido a atividade enzimática na produção de óleo essencial. Durante o estágio vegetativo pode haver baixa taxa de biossíntese de compostos voláteis explicado por inativação parcial de enzimas necessárias para a biossíntese de componentes (SELLAMI et al., 2009). Plantas em estágio vegetativo por apresentarem crescimento mais rápido podem utilizar grande parte dos recursos fotossintéticos para o seu crescimento, diminuindo assim os recursos para produção de metabólitos especializados. A fase reprodutiva por apresentar crescimento lento pode direcionar mais recursos para a produção de metabólitos especializados, uma vez que nesta fase a presença destes compostos é importante para proteção, podendo evitar a predação de flores e frutos verdes (CHEZEM; CLAY, 2015; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O Cluster VIII constituído por planta em estágio vegetativo nos dois anos de coleta talvez encontre explicação no fato de que esse genótipo, na presença de patógenos observados em todas as plantas durante o estudo pode ter sido responsável pela relevância do α e β -pineno, substâncias com atividade bactericida e fungicida (BAJPAI; RAHMAN; KANG, 2007; LEITE et al., 2007).

Cumprir destacar ainda que as plantas em estágio reprodutivo que constituem o cluster III em 2018 compõem em 2019 o cluster I. Além disso, as plantas do estágio vegetativo que apresentaram perfil químico similar na coleta de 2018 (Cluster I), em 2019 constituíram por diferença mínima o Cluster II. Dessa forma, a diferença de similaridade e formação de diferentes clusters em 2018 foi atenuada em 2019.

Os demais clusters representados por 10% dos tratamentos podem ser explicados pela variabilidade genética entre plantas da mesma espécie (LI et al., 2015).

O espatulenol, substância majoritária no óleo essencial de *Xylopia aromatica* discriminou os indivíduos no estágio reprodutivo, com média de 68,77%. Essa média, menor no estágio vegetativo está de acordo com estudos que mostram que o teor de substâncias consideradas majoritárias no óleo essencial de espécies vegetais tende a ser menor no estágio vegetativo. Moghaddam et al. (2015) avaliaram óleo essencial de *Ocimum ciliatum* em diferentes estágios fenológicos e observaram que o metilchavicol, componente majoritário, atingiu porcentagem máxima em plena floração e menor teor no estágio vegetativo. *Salvia officinalis* também revelou variações na porcentagem das substâncias majoritárias do óleo essencial em função da fase de desenvolvimento (HOSSEIN MIRJALILI et al., 2006).

No presente estudo embora o espatulenol tenha variado foi o componente que apresentou maior porcentagem relativa nas fases de desenvolvimento e nos dois anos. Muitos compostos são geralmente sintetizados pelas plantas de acordo com as suas necessidades específicas, que incluem as condições ambientais, as interações com outras plantas e a proteção contra predadores (RAO; SAVITHRAMMA; SUHRULATHA, 2011). Há relatos de que o espatulenol pode ter atividade biológica quando presente em óleos essenciais, possuindo efeito antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo e propriedades antimicobacterianas (DO NASCIMENTO et al., 2018).

Além do espatulenol, foram encontradas outras substâncias no óleo essencial de *Xylopia aromatica* extraído em diferentes estágios de desenvolvimento, como α e β -pineno, germacreno D e globulol, que também apresentam atividade biológica.

O alfa-pineno e beta-pineno são terpenos (BAKKALI et al., 2008), constituintes de vários óleos essenciais, e em alguns casos, correspondem aos constituintes majoritários. Em estudos de óleos essenciais extraídos de folhas, flores e frutos de *Xylopia aromatica*, o α e β -pineno foram os compostos majoritários (LAGO et al., 2003; ANDRADE et al., 2004). As atividades antimicrobianas do α e β -pineno isolado ou contido nos óleos essenciais têm sido estudadas e comprovadas por pesquisadores. Lima et al. (2005) avaliaram a ação dos monoterpenos α -pineno e β -pineno, mostrando uma atividade antifúngica satisfatória frente às espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilhermondii*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*. Além disso, outros autores também observaram atividade antibacteriana e antifúngica relacionadas a estes compostos (BAJPAI; RAHMAN; KANG, 2007; LEITE et al., 2007)

No óleo essencial extraído da casca de *Xylopia aromatica*, a pinocarvona esteve entre os compostos majoritários (FOURNIER et al., 1994). O germacreno D e o globulol também estão presentes como substâncias majoritárias em óleos essenciais extraídos de folhas de *Xylopia aromatica* (LAGO et al., 2003; DO NASCIMENTO et al., 2018b). O germacreno D

apresenta algumas atividades biológicas interessantes, podendo atuar como sinalizador fundamental na interação de plantas e insetos (SOUZA et al., 2007). Alguns estudos mostram que o globulol pode apresentar propriedades fungistática, como é o caso do óleo essencial de *Eucalyptus urophylla* que apresentou maior atividade antifúngica atribuída à presença do composto globulol (SALGADO et al., 2003).

Entre os óleos essenciais extraídos, quatro selecionados por seus perfis químicos, foram testados e não apresentaram atividade antifúngica as cepas das cinco espécies fúngicas avaliadas (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*). Esses resultados divergem daqueles obtidos em estudo que avaliou a composição química e a atividade biológica de óleos essenciais de flores e folhas de *Xylopia aromatica*, no qual o óleo essencial das folhas apresentou atividade moderada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente à *Candida albicans* (DO NASCIMENTO et al., 2018). Esse resultado pode ser explicado por variações na composição química dos óleos essenciais avaliados nos dois estudos, além disso as diferentes misturas dos compostos químicos podem influenciar a atividade biológica por meio de efeito sinérgico ou potencialização das várias moléculas presentes (DO NASCIMENTO et al., 2018).

A literatura é clara em mostrar que a atividade biológica dos óleos essenciais depende da espécie, composição e da sua concentração, além de seu processamento e condição de estocagem e da espécie fúngica/bacteriana a ser estudada (BERTINI et al., 2005; MONTEIRO, 2017). Além disso, o mecanismo de ação dos óleos essenciais tem sido bastante discutido devido à quantidade e variedade dos compostos químicos presentes, o que dificulta a atribuição de um mecanismo de ação específico para a atividade biológica (BONA et al., 2012; MONTEIRO, 2017).

Os resultados observados demonstram que a influência das fases fenológicas, vegetativa e reprodutiva e da época avaliada, com condições ambientais diferentes, pode ter maior ou menor importância nas características do perfil fotossintético e químico, demonstrando maior atuação na defesa antioxidante da *Xylopia aromatica*.

4.7. CONCLUSÃO

As fases fenológicas influenciam o perfil fotossintético e químico e podem depender das condições do ambiente.

Maior recurso hídrico contribuiu com melhor desempenho fotossintético e rendimento do óleo essencial em *Xylopia aromatica*.

Plantas de *Xylopia aromatica* no estágio vegetativo apresentaram maior desempenho fotossintético, com maior similaridade química do óleo essencial.

Mais pesquisa é necessária para estabelecer associação entre compostos encontrados no óleo essencial e atividade biológica.

4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

ANJUM, S.A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v.6, n.9, p.2026-2032, 2011.

ALCÂNTARA, J. M. **Composição Química e potencial biológico dos óleos essenciais de Annonaceae dos Campi INPA e UFAM**. Tese - INPA, 2015.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role os superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, v. 57, n. 1, p. 99–102, 2001.

ANDRADE, E. H. A. et al. Essential oil composition from leaf, fruit and flower of *Xylopia aromatica* (lam.) mart. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 7, n. 2, p. 151–154, 2004.

APARECIDA, L.; MORAIS, S. De. **Química dos óleos essenciais**. v. 2, p. 4050–4063, 2009.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.

ARIMURA, G. I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 5, p. 911–923, 2009.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 1, p. 28–35, 2007.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BEN FARHAT, M. et al. Phenophase effects on sage (*Salvia officinalis* L.) yield and composition of essential oil. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 87–93, 2016.

BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v.17, n.314, p.80-3, 2005.

BETTAIEB, I. et al. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 2, p. 271–275, 2009.

BONA, T. D. M. M. et al. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle da Salmonella, Eimeria e Clostridium em frangos de corte. **Pesquisa veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 411- 418, 2012.

BUCCI, S. J. et al. Water relations and hydraulic architecture in Cerrado trees: Adjustments to seasonal changes in water availability and evaporative demand. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 3, p. 233–245, 2008.

CAO, B.-L. et al. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 53–62, 2015.

CARVALHO, F. M. V.; DE MARCO, P.; FERREIRA, L. G. The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, v. 142, n. 7, p. 1392–1403, 2009.

CHAGAS, A. C. de S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247–253, 2005.

CHEZEM, W. R.; CLAY, N. K. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs. **Phytochemistry**, v. 131, p. 26-43, 2016.

DO NASCIMENTO, K. F. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, n. May 2017, p. 351–358, 2018.

DO NASCIMENTO, M. N. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of

essential oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) flowers and leaves. **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 5, p. 1578–1590, 2018.

DOS SANTOS, C. P. et al. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 416-421, 2015.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants, in: Gupta, S.D., Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Science Publishers**, p.178–203, 2011.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). DOCUMENT E.DEF 7.3.1 **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts**. 2017.

FOURNIER, G. et al. Chemical and biological studies of *Xylopia aromatica* stem bark and leaf oils. **Planta Medica**, v. 60, n. 3, p. 283–284, 1994.

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

GONÇALVES, A.; GUAZZELLI, M. J. **Agrofloresta e óleos essenciais**. 2014.

GOUNGUENÉ, S.P. & TURLINGS, T. C. J. The Effects of Abiotic Factors on Induced Volatile Emissions in Corn Plants. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1297–1307, 2002.

HABIB, S. H. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

HOSSEIN MIRJALILI, M. et al. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 42, n. 1, p. 16–19, 2006.

RADFORD, P. J. Growth Analysis Formulae - Their Use and Abuse. **Crop Science**, v. 7, p. 171, 1967.

KHAN, R. et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against Multi Drug Resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 586–597, 2009.

KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.3, p.235-246, 2004.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, 2012.

LAGO, J. H. G. et al. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 669–672, 2003.

LARIBI, B. et al. Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 372–379, 2009.

LAVIOLA, B. G., et al. **Alocação de fotoassimilados em folhas e frutos de cafeeiro cultivado em duas altitudes**. 2007.

LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121–126, 2007.

LOCATO, V., PINTO, M.C., PARADISO, A., GARA, L. Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses. **Science Publishers**, p.46–63, 2011.

MAIA, J. G. S. et al. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopia* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 5, p. 474–477, set. 2005.

MAKSIMOVIĆ, M. et al. Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 8, p. 473–478, 2007.

MCKIERNAN, A. B. et al. Effect of limited water availability on foliar plant secondary metabolites of two *Eucalyptus* species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 105, p. 55–64, 2014.

MOLLER IM, JENSEN PE, HANSSON A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual review of plant biology**, v. 58, p. 459–81, 2007.

MONTEIRO, MICHELE VITÓRIA DE MELO. **Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos**

essenciais Citronela (*Cymbopogon winterianus*) e Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2017.

MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual review of plant physiology**, v. 35, p. 299-319, 1984.

MUNNS, R. Why measure osmotic adjustment?. **Functional Plant Biology**, v. 15, p. 717-726, 1988.

MURAKAMI, C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *chromolaena laevigata* during flowering and fruiting stages. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 4, p. 621–627, 2013.

HASSAN, A. M.; ALMAGBOUL, A. Z.; ABDELGADIR, H. Antimicrobial activity of the fruits essential oil of *Xylopi aethiopica* [Dun.] A. Rich. **Advancement in Medicinal plant Research**, v. 2, n. 4, p. 58-61, 2014.

NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 973–996, 2010.

PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M. Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, n. 2, p. 115–122, 1993.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 237–243, 2002.

RAO, M. L.; SAVITHRAMMA, N.; SUHRULATHA, D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 579–584, 2011.

RATTER, J. A. et al. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation II: Comparison of the woody vegetation of 98 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 53, n. 2, p. 153–180, 1996.

RIOS, M. N. D. S.; PASTORES, J. F. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**, 2011.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar Sensing and Signalling in Plants. **The Plant Cell**, p. 185–205, 2002.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 436–441, 2009.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7- 12, 1993.

SELLAMI, I. H. et al. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 395–402, 2009.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 558–566, 2013.

SHAO, H. B. et al. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 1, p. 37–45, 2007.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1305-1319, 2002

SOUSA, J. P. B. et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653–659, 2011.

SOUZA DE OLIVEIRA, L. G. et al. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 455–464, 2017.

SPYCHALLA, J. P.; DESBOROUGH, S. L. Superoxide Dismutase, Catalase, and -Tocopherol Content of Stored Potato Tubers. **Plant Physiology**, v. 94, n. 3, p. 1214–1218, 2008.

STITT, M.; ZEEMAN, S. C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. **Current opinion in plant biology**, v. 15, n. 3, p. 282-292, 2012.

THALMANN, MATTHIAS; SANTELIA, DIANA. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 943-951, 2017.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. **Genomic Organization of Plant Terpene Synthases**, 2001.

USANO-ALEMANY, J.; PALÁ-PAÚL, J.; HERRÁIZ-PEÑALVER, D. Comprehensive

phenological description of essential-oil chemotypes of *Salvia lavandulifolia* VAHL grown under the same environmental conditions. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 12, p. 1963–1977, 2014.

VANDENDOOL, H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–71, 1963.

VRANOVA, E.; INZE, D.; BREUSEGEM, F. Van. Signal trans Oxid Stress, v. 53, n. 372, p. 1227–1236, 2002.

VYRY WOUATSA, N. A.; MISRA, L.; VENKATESH KUMAR, R. Antibacterial activity of essential oils of edible spices, *Ocimum canum* and *Xylopi aethiopica*. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, 2014.

WANG, W.B.; KIM, Y.H.; LEE, H.S.; KIM, K.Y.; DENG, X.P.; KWAK, S. S. Analyses of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 47: 570-577, 2009.

WILHELM, C.; SELMAR, D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 2, p. 79–87, 2011.

WOGUEM, V. et al. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopi aethiopica*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **FOOD CHEMISTRY**, v. 149, p. 183–189, 2014.

YOLANDA RÍOS, M. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.

ZHAO, L. et al. Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 497–530, 2013.

5. APÊNDICE

Apêndice 1. Composição química (%) dos óleos essenciais de folhas de plantas (P) de *Xylopia aromatica* nos estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R), coletadas em 2018 e reamostradas em 2019.

Substâncias	IR _E	IR _L	R2018P1	R2018P2	R2018P3	R2018P4	R2018P5	R2018P6	R2018P7	R2018P8	R2018P9	R2018P10	R2018P11	R2018P12
α-pineno	932	939	t	0,43	1,17	3,60	2,55	5,18	0,81	0,54	1,61	3,23	0,41	0,35
β-pineno	975	979	t	0,34	0,69	2,33	2,01	3,17	0,55	0,37	1,08	2,20	0,40	0,26
p-cimeno	1021	1024	t	0,70	1,47	0,88	1,08	1,96	1,30	1,83	1,29	1,82	t	0,56
limoneno	1025	1029	t	1,06	0,64	0,71	5,08	1,83	1,08	2,00	0,93	1,34	2,84	0,35
sub 1	1121	-	t	0,30	t	t	0,46	0,76	0,41	nc	0,92	0,19	t	0,79
α-camfolenal	1122	1126	t	t	0,25	1,22	0,27	0,36	t	t	0,18	0,27	t	t
trans-pinocarveol	1134	1139	t	t	0,79	1,76	0,66	0,72	0,23	t	0,49	0,64	0,28	t
sub 2	1140	-	t	t	0,58	1,61	0,39	0,44	0,21	t	0,35	0,38	t	t
pinocarvona	1157	1164	t	nc	0,37	0,48	0,36	0,33	t	nc	t	t	t	t
sub 3	1181	-	t	nc	nc	0,31	t	nc	t	t	0,61	0,47	t	t
mirtenal	1191	1195	t	t	1,11	2,40	0,90	0,90	t	t	0,54	0,72	t	t
verbenona	1204	1205	t	t	t	0,55	t	t	t	t	t	t	t	t
sub 4	1433	-	0,77	0,36	0,81	t	0,74	0,83	0,32	t	t	0,70	0,74	0,63
sub 5	1437	-	2,96	t	t	t	nc	t	t	t	t	t	t	t
sub 6	1440	-	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
sub 7	1460	-	1,01	t	t	t	t	t	t	0,26	t	t	0,73	0,60
sub 8	1467	-	1,64	0,87	1,42	0,98	0,90	0,91	0,99	0,71	1,15	1,27	1,38	1,07
germacreno D	1474	1500	2,02	2,57	2,90	1,91	2,41	2,40	2,53	2,03	2,87	2,63	3,17	2,44
biciclogermacreno	1489	1500	0,68	1,16	nc	nc	nc	t	nc	0,60	nc	nc	t	t
sub 9	1504	-	1,20	0,63	t	t	t	0,61	0,78	0,71	0,54	0,58	1,18	0,97
sub 10	1561	-	1,41	1,26	1,80	t	1,07	1,21	1,58	1,29	0,63	1,49	2,61	2,14
espatulenol	1570	1578	59,31	71,98	71,36	71,17	66,99	64,09	73,72	69,85	73,46	69,64	67,56	70,50
globulol	1586	1590	11,48	4,93	4,92	3,06	5,12	5,08	4,82	5,46	3,77	3,50	5,85	5,54
sub 11	1589	-	1,01	1,18	t	t	1,13	0,95	0,89	1,54	0,79	0,71	1,32	1,22
sub 12	1599	-	1,99	2,26	1,20	0,63	1,70	1,59	1,83	1,71	1,84	1,22	1,76	1,91
sub 13	1628	-	t	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
sub 14	1634	-	0,74	0,86	0,78	0,59	0,63	0,60	0,50	0,41	0,41	0,78	0,58	0,46
sub 15	1659	-	2,02	1,29	0,97	t	t	t	t	1,25	nc	t	t	1,38
sub 16	1670	-	t	0,53	t	t	t	t	t	0,84	t	t	t	t
sub 17	1731	-	t	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
sub 18	1831	-	t	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc

Substâncias	IR _E	IR _L	V2018P1	V2018P2	V2018P3	V2018P4	V2018P5	V2018P6	V2018P7	V2018P8	V2018P9	V2018P10	V2018P11	V2018P12
α-pineno	932	939	0,55	20,08	t	0,33	t	t	0,22	t	t	0,62	t	0,17
β-pineno	975	979	t	12,75	t	0,28	t	t	t	t	nc	0,58	t	t
p-cimeno	1021	1024	0,93	3,42	t	1,90	0,42	0,85	0,72	1,11	t	1,24	t	0,55
limoneno	1025	1029	2,06	3,67	t	0,70	t	0,55	0,30	t	t	0,85	t	0,67
sub 1	1121	-	0,46	0,31	nc	1,27	t	0,24	0,45	t	nc	0,31	nc	0,20
α-camfolenal	1122	1126	t	4,17	t	t	t	t	t	t	nc	t	t	t
trans-pinocarveol	1134	1139	t	5,28	t	t	t	t	t	t	t	0,22	0,28	t
sub 2	1140	-	nc	3,81	t	t	t	t	t	t	t	t	0,27	t
pinocarvona	1157	1164	t	1,28	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
sub 3	1181	-	nc	2,71	nc	nc	nc	nc	t	nc	nc	t	t	t
mirtenal	1191	1195	t	6,23	t	t	t	t	t	t	0,46	t	t	t
verbenona	1204	1205	t	1,30	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
sub 4	1433	-	0,88	nc	1,41	1,37	2,66	1,34	0,88	1,02	0,68	0,90	0,48	0,68
sub 5	1437	-	t	nc	nc	0,38	0,39	0,22	t	t	t	t	2,05	0,34
sub 6	1440	-	0,87	nc	nc	nc	nc	t	t	nc	nc	nc	nc	nc
sub 7	1460	-	14,05	nc	1,40	1,84	1,56	1,64	0,48	0,60	0,88	0,53	1,16	0,40
sub 8	1467	-	0,74	nc	1,28	1,45	1,49	1,42	0,73	1,12	0,50	1,07	1,46	0,96
germacreno D	1474	1500	2,29	nc	2,16	2,69	2,74	3,03	2,17	2,29	1,78	2,56	1,79	2,90
biciclogermacreno	1489	1500	2,24	nc	t	t	t	t	0,97	t	nc	t	0,91	t
sub 9	1504	-	0,70	nc	1,06	1,16	1,26	1,19	1,09	1,27	1,21	1,04	1,25	1,02
sub 10	1561	-	1,83	nc	2,15	2,28	2,35	2,06	1,84	2,23	1,70	1,53	1,12	2,04
espatulenol	1570	1578	57,61	23,14	63,96	59,93	61,36	69,34	66,75	65,91	62,69	66,49	52,24	66,56
globulol	1586	1590	1,92	nc	4,80	9,98	5,63	4,94	7,12	7,25	11,02	6,84	20,13	8,43
sub 11	1589	-	nc	nc	1,33	1,38	1,55	1,03	2,22	2,05	2,40	1,76	2,14	1,69
sub 12	1599	-	1,95	nc	2,82	1,77	2,66	1,89	1,63	1,65	1,77	1,80	0,88	1,91
sub 13	1628	-	nc	nc	0,29	nc	t	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
sub 14	1634	-	0,74	nc	1,33	0,86	1,74	0,51	0,69	0,89	1,12	0,64	0,79	0,51
sub 15	1659	-	t	nc	1,82	1,83	1,77	t	1,81	1,89	2,87	1,67	3,42	t
sub 16	1670	-	1,01	t	0,94	t	0,85	0,66	0,94	1,11	1,02	0,81	t	0,99
sub 17	1731	-	nc	nc	nc	t	nc	nc	t	nc	nc	nc	t	t
sub 18	1831	-	nc	nc	nc	t	nc	nc	nc	nc	nc	nc	t	t

Substâncias	IR _E	IR _L	R2019P1	R2019P2	R2019P3	R2019P4	R2019P5	R2019P6	R2019P7	R2019P8	R2019P9	R2019P10	R2019P11	R2019P12
α-pineno	932	939	0,59	0,64	t	0,39	0,62	0,70	nc	1,15	0,53	0,61	2,98	0,74
β-pineno	975	979	0,46	0,57	nc	0,49	0,57	0,55	nc	0,68	0,36	0,50	2,22	0,44
p-cimeno	1021	1024	0,92	1,40	nc	0,53	0,71	1,12	0,43	1,42	0,67	1,15	t	0,49
limoneno	1025	1029	0,42	0,69	nc	1,33	t	t	t	2,74	1,12	0,49	16,04	0,56
sub 1	1121	-	t	nc	nc	0,29	t	t	t	nc	0,25	0,25	t	0,69
α-camfolenal	1122	1126	t	t	nc	t	t	t	t	t	t	t	t	t
trans-pinocarveol	1134	1139	0,22	t	t	0,34	0,42	t	t	t	0,14	0,19	0,65	0,20
sub 2	1140	-	0,23	t	t	0,53	0,70	t	t	t	0,24	0,27	0,49	nc
pinocarvona	1157	1164	t	nc	nc	t	t	t	t	nc	t	t	t	t
sub 3	1181	-	t	nc	nc	t	t	nc	t	t	t	t	t	t
mirtenal	1191	1195	t	0,40	t	0,65	t	t	t	t	t	t	t	t
verbenona	1204	1205	t	t	t	0,41	t	t	t	t	t	t	t	t
sub 4	1433	-	0,53	0,79	t	0,75	0,86	0,56	0,41	t	t	0,36	t	t
sub 5	1437	-	t	t	t	t	nc	0,70	nc	1,05	t	t	t	t
sub 6	1440	-	nc	nc	nc	nc	nc	nc	0,43	0,79	0,30	nc	nc	nc
sub 7	1460	-	0,26	t	nc	0,52	0,50	0,91	0,52	0,68	0,37	0,20	0,59	0,45
sub 8	1467	-	t	1,71	nc	1,38	1,73	0,57	2,15	1,41	1,63	0,23	1,05	1,07
germacreno D	1474	1500	2,08	0,64	2,05	0,86	t	1,17	0,34	14,92	1,33	1,89	t	1,55
biciclogermacreno	1489	1500	0,66	0,61	nc	nc	nc	5,07	nc	0,36	nc	nc	t	t
sub 9	1504	-	t	0,76	nc	0,82	t	1,63	0,87	0,46	0,53	0,54	t	0,78
sub 10	1561	-	0,82	1,03	0,88	1,01	0,91	1,20	1,09	0,61	0,63	0,77	t	0,89
espatulenol	1570	1578	75,28	66,70	77,04	66,39	66,99	59,51	70,62	54,98	75,70	78,51	56,00	73,30
globulol	1586	1590	9,00	9,99	11,74	10,74	12,19	10,32	9,19	6,93	7,23	6,23	11,11	9,79
sub 11	1589	-	0,95	1,93	2,41	1,87	2,16	3,87	1,81	1,87	1,25	0,61	2,31	1,64
sub 12	1599	-	1,06	1,27	1,47	1,11	1,00	0,83	1,77	0,79	0,92	0,76	t	1,11
sub 13	1628	-	t	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
sub 14	1634	-	0,65	0,86	2,61	0,64	0,66	0,54	0,76	1,06	0,38	0,74	3,08	0,31
sub 15	1659	-	2,44	2,95	nc	2,99	3,59	2,51	2,49	nc	1,77	1,28	nc	2,64
sub 16	1670	-	t	0,78	nc	0,69	nc	0,56	0,38	0,65	0,38	0,40	nc	0,53
sub 17	1731	-	nc	nc	nc	t	nc	nc	nc	3,49	nc	t	nc	t
sub 18	1831	-	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	t	nc	nc	nc	nc

Substâncias	IRE	IRL	V2019P1	V2019P2	V2019P3	V2019P4	V2019P5	V2019P6	V2019P7	V2019P8	V2019P9	V2019P10	V2019P11	V2019P12
α -pineno	932	939	0,25	36,22	0,64	0,64	0,84	0,58	0,23	0,41	0,77	0,99	1,93	0,39
β -pineno	975	979	t	25,10	0,94	0,94	0,60	0,42	0,24	0,52	0,77	0,82	1,41	t
<i>p</i> -cimeno	1021	1024	0,48	0,50	0,51	0,51	0,52	1,23	0,49	1,19	0,37	0,79	3,21	0,62
limoneno	1025	1029	t	0,75	t	t	t	0,56	0,54	t	4,82	1,28	5,52	1,30
sub 1	1121	-	t	0,31	nc	nc	t	nc	nc	t	1,79	1,36	0,38	0,40
α -camfolenal	1122	1126	t	3,31	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
<i>trans</i> -pinocarveol	1134	1139	t	3,88	t	t	t	0,39	t	0,21	0,28	t	t	t
sub 2	1140	-	nc	2,83	0,30	0,30	t	t	t	0,28	0,32	t	t	t
pinocarvona	1157	1164	t	0,81	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
sub 3	1181	-	nc	0,47	nc	nc	nc	nc	t	t	t	t	t	t
mirtenal	1191	1195	t	4,79	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
verbenona	1204	1205	t	0,62	t	t	t	t	t	t	0,28	t	t	t
sub 4	1433	-	0,66	0,38	1,90	1,46	1,30	0,80	0,86	0,86	0,48	0,51	t	0,41
sub 5	1437	-	t	nc	nc	0,38	t	t	t	t	t	t	1,44	0,34
sub 6	1440	-	0,72	nc	2,26	2,26	1,13	t	t	0,75	nc	nc	0,87	0,42
sub 7	1460	-	0,41	nc	1,18	1,18	0,74	1,25	0,57	0,40	0,62	0,38	0,39	0,36
sub 8	1467	-	1,48	nc	t	1,59	t	t	nc	t	1,44	1,76	2,19	t
germacreno D	1474	1500	0,79	2,16	1,59	t	1,83	t	1,74	1,71	0,39	0,94	16,08	1,73
biciclogermacreno	1489	1500	t	nc	t	t	t	t	t	t	nc	t	0,58	t
sub 9	1504	-	0,79	nc	1,02	1,02	1,02	0,90	1,19	1,26	0,81	0,84	1,48	0,95
sub 10	1561	-	0,97	nc	1,01	1,01	1,23	0,80	1,32	1,65	1,09	1,01	t	0,97
espatulenol	1570	1578	68,54	12,97	62,17	62,17	63,04	72,00	61,20	61,41	67,85	67,56	30,18	71,53
globulol	1586	1590	10,05	nc	13,16	13,16	12,56	11,06	12,96	12,89	9,18	11,36	4,94	10,21
sub 11	1589	-	2,71	nc	2,22	2,22	2,81	1,50	3,38	3,44	1,48	2,36	2,98	2,43
sub 12	1599	-	2,19	nc	0,63	0,99	1,74	0,38	2,19	2,22	0,46	0,37	t	1,40
sub 13	1628	-	nc	nc	3,63	nc	t	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
sub 14	1634	-	1,08	nc	nc	0,63	0,97	2,40	1,03	1,02	1,60	2,46	t	0,34
sub 15	1659	-	2,99	nc	t	3,63	3,46	t	3,84	3,50	t	nc	t	1,86
sub 16	1670	-	0,59	t	0,78	0,78	0,68	0,47	0,64	0,73	1,02	0,39	0,57	t
sub 17	1731	-	nc	nc	nc	t	nc	nc	nc	nc	t	nc	15,14	nc
sub 18	1831	-	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	4,12	nc

nc = não consta; t = traço, IRE = Índice de retenção experimental e IRL = Índice de retenção de literatura (Adms, 2017)