UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO DE VARIABILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Casearia sylvestris* SWARTZ

FLÁVIO ALEXANDRE CARVALHO

ORIENTADOR: Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

COORIENTADOR: Dr. EDUARDO JOSÉ CREVELIN

ARARAQUARA – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO DE VARIABILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Casearia sylvestris* SWARTZ

FLÁVIO ALEXANDRE CARVALHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
COORIENTADOR: Dr. EDUARDO JOSÉ CREVELIN

ARARAQUARA – SP
2019

Carvalho, Flávio Alexandre.
C788e Estudo de variabilidade do óleo essencial de folhas de *Casearia sylvestris* Swartz / Flávio Alexandre Carvalho. – Araraquara: [s.n.], 2019.
223 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.
Coorientador: Eduardo José Crevelin.

1. *Casearia sylvestris var. sylvestris*. 2. *Casearia sylvestris var. lingua*. 3. Variabilidade química. 4. Óleo essencial e análise de componente principal. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Crevelin, Eduardo José, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DE VARIABILIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE CASEARIA SYLVESTRIS SWARTZ

AUTOR: FLAVIO ALEXANDRE CARVALHO
ORIENTADOR: ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
COORIENTADOR: EDUARDO JOSÉ CREVELIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ARISTEU GOMES TININIS
Campus de Matão / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Matão

Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Prof. Dr. ANTÔNIO EDUARDO MILLER CROTTI
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP

Araraquara, 27 de setembro de 2019

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara -
RODOVIA ARARAQUARA - JAÚ, Km 1, 14800903, Araraquara - São Paulo
http://www2.fcfar.unesp.br/#!/pos-graduacao/ciencias-farmaceuticas/CNPJ: 48.031.918/0025-00.

Epígrafe

A dúvida é o princípio da sabedoria.

Aristóteles

Dedicatória

Dedico este trabalho aqueles que sempre se dedicaram para que eu conseguisse realizar meus objetivos, meus queridos pais, que sempre me apoiaram e a minha namorada Karla, por todo apoio, carinho e confiança.

Agradecimentos

A Deus por todas as conquistas e aos meus pais pela dedicação, apoio e esforços, sempre me apoiando e confiando em meus objetivos.

À Prof.ª Dra. Cleópatra da Silva Planeta pela orientação no início deste trabalho, meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão.

À COTEC – Comissão Técnico Científica, pela aprovação do projeto e consequente execução junto ao Parque Estadual Carlos Botelho e Estação Experimental de Araraquara.

Ao Prof. Dr. Luís Vitor Silva do Sacramento pela colaboração, ao Laboratório de Botânica e à Angélica pela grande contribuição nas análises botânicas.

Ao Laboratório de Produtos Naturais HPLC – PN 2, à Prof.ª Dra. Isabele R. Nascimento e a doutoranda Camila L. Cunha, pela colaboração nos experimentos de rotação óptica específica.

Ao Laboratório de Produção e Purificação de Bioprodutos e a doutoranda Agnes Magri pela colaboração nos experimentos de infravermelho.

Ao Laboratório de Farmacologia e ao doutorando Ricardo Benini, por auxiliar na análise microscópica.

Ao Laboratório Didático de Físico-Química e ao Robson L. Mascarelli, pela colaboração nos experimentos de índice de refração.

Ao doutorando Fernando Bombarda Oda por toda colaboração, parceria e apoio durante a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório de Solos do CTA pela colaboração nas análises de solos.

Ao Dr. Alberto Camilo Alécio, pela disposição em colaborar.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Química de Produtos Naturais, pela colaboração nas análises de CG-EM.

Ao Laboratório de Farmacognosia, ao Caio pela colaboração em diversas etapas do trabalho e aos alunos que de alguma forma colaboraram Ana Carolina, Luíza, Bruna, Rafael, Elaíse, Helena, Chiba, Marcelo Amorim, Natália Noronha pelos conhecimentos compartilhados e doações de materiais e ao Sr. Eduardo Dini pelas grandes colaborações.

Ao Conselho de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de ser membro discente e a Seção Técnica de Pós-Graduação pelas colaborações.

Ao Prof. Dr. Rafael Mara de Paula Dias, agradeço pelas orientações e ensinamentos durante o estágio docência.

Ao Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, pelos ensinamentos, parceria e apoio.

À Prof.ª Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira, pela grande contribuição e dedicação nos ensinamentos de fundamental importância.

À Prof. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi e ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro pelas colaborações no Exame Geral de Qualificação que foram fundamentais e importantes na conclusão do trabalho.

Aos Professores Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti, Cristiano Soleo de Funari, Aristeu Gomes Tininis, Alberto José Cavalheiro pelas grandes considerações na Defesa da Tese.

Ao Prof. Dr. pela enorme contribuição e parceria de fundamental importância durante a realização deste trabalho, meus leais agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, coorientador, colaborador e parceiro, meus francos agradecimentos por todo empenho e dedicação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, orientador, colaborador e grande parceiro na realização deste trabalho, com grande contribuição, experiência compartilhada, ensinamentos transmitidos e amizade, meus sinceros agradecimentos.

Agradecimento Especial

Agradeço com todo carinho a mulher que me apoiou, incentivou, confiou e esteve ao meu lado em todos os momentos, fazendo a diferença nas horas mais difíceis. Karla, você foi ponto de equilíbrio, seu carinho, caráter, dedicação, companheirismo e compreensão foram fundamentais, sempre disposta a ajudar você me faz acreditar que é possível sempre. Sou muito feliz por ter você ao meu lado, isto é o melhor que me aconteceu. Me faltam palavras para expressar meus sentimentos de amor e gratidão por você.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* (São Miguel Arcanjo-SP), altura aproximada 12 m. Fonte: O Autor. 35
Figura 2. *Casearia sylvestris* var. *lingua* (Estação Experimental de Araraquara, Araraquara-SP), altura aproximada de 2,5 m. Fonte: O Autor. 36
Figura 3. Folhas de *C. sylvestris*. A: var. *sylvestris* (FCF 103) e B: var. *lingua* (EEA 207). Fonte: O Autor. 37
Figura 4. A) Estrutura geral das casearinas, componentes majoritários (diterpenos clerodânicos) de *C. sylvestris* var *sylvestris*, B) narcisina (flavonoide) identificada em *C. sylvestris* var. *lingua*, C) casearialignana e D) ácido gálico. 41
Figura 5. Rota biosintética do DMAPP através do intermediário ácido mevalônico (Dewick, 2009). 43
Figura 6. Rota biosintética do IPP através do intermediário ácido pirúvico (Dewick, 2009). 44
Figura 7. Esquema da rota biosintética dos terpenos (Lobo e Lourenço, 2007; Dewick, 2009). 45
Figura 8. Estruturas químicas dos componentes majoritários do OE de folhas de *C. sylvestris*. Sesquiterpenos, A: biciclogermacreno, B: germacreno D, C: espatulenol, D: *δ*-cadineno, E: *α*-zingibereno e F: *E*-cariofileno. 50
Figura 9. Estruturas químicas dos monoterpenos, A: *α*-pineno, B: pulegona, C:linalol e do fenilpropanoide, D: eugenol, encontrados no OE de folhas de *C. sylvestris*..... 50
Figura 10. Esquema referente ao Planejamento Geral Experimental. 64
Figura 11. Perda de massa (%) na secagem em estufa de folhas de *C. sylvestris*. [1]FCF e EEA são estatisticamente diferentes, $p < 0,05$; [2]FCF e CB são estatisticamente iguais, $p < 0,05$. 81
Figura 12. Perda por dessecação (%) da DV em balança por infravermelho de folhas de *C. sylvestris*. *EEA e FCA são estatisticamente diferentes, $p < 0,05$. 82
Figura 13. Amostras de folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (A: FCF 103 e B: CB 401) e *C. sylvestris* var. *lingua* (C: EEA 201 e D: FCA 304). Fonte: O Autor. 83
Figura 14. Exsicatas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (A: FCF 105 e B: CB 407) e *C. sylvestris* var. *lingua* (C: EEA 207 e D: FCA 310). Fonte: O Autor. 84

Figura 15. Troncos dos espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua* (A: EEA 202 e B: EEA 209) com cascas profundamente sulcadas e *C. sylvestris* var. *sylvestris* com troncos lisos (C: FCF 105 e D: FCF 107). Fonte: O Autor. 87
Figura 16. Superfície abaxial das folhas de *C. sylvestris*. São destacados nos círculos os estômatos do tipo paracítico dos espécimens das populações; A) FCF, B) EEA, C) CB e D) FCA. 90
Figura 17. Superfície adaxial das folhas de *C. sylvestris*. São destacados nos círculos os estômatos e nos retângulos as células epidérmicas e paliçádicas dos espécimens das populações; A) FCF, B) EEA, C) CB e D) FCA. 91
Figura 18. Folhas dos espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua*, da população EEA (A: EEA 201, B: EEA 205, C: EEA 209 e D: EEA 207). As folhas apresentaram curvatura para cima. Fonte: O Autor. 95
Figura 19. Teor médio de OE % (v/m) de 10 espécimens de cada coleta populacional de *C. sylvestris*. [a]População FCF estatisticamente diferente entre Jul/Dez $p < 0,05$; [b]População CB apresentou valor médio estatisticamente diferente das populações EEA e FCA, $p < 0,05$. 98
Figura 20. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF. [a]Espécimens estatisticamente diferentes da média $p < 0,05$. 99
Figura 21. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA. [a]Espécimens estatisticamente diferentes da média $p < 0,05$. 100
Figura 22. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF. [a]Períodos que apresentaram diferença estatística Jul/16 e Jan/18 $p < 0,05$. 101
Figura 23. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA. 102
Figura 24. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris*, das populações FCF e EEA. [a]Valores são estatísticamente diferentes de FCF Jan/18 $p < 0,05$, [b]Valores estatisticamente diferentes de EEA Jul/16 $p < 0,05$. 105
Figura 25. Correlação entre teor de OE da população FCF com os fatores climáticos temperatura e pluviometria (média mensal), UR e IUV. 106

Figura 26. Correlação entre teor de OE da população EEA com os fatores climáticos temperatura e pluviometria (média mensal), UR e IUV. 107
Figura 27. Teor médio de OE % (v/m) dos 10 espécimens de folhas de *C. sylvestris*, das populações FCF e EEA. Valores são estatisticamente semelhantes; $p < 0,05$.108
Figura 28. Teor médio de OE % (v/m) dos 10 espécimens das folhas frescas e folhas secas de *C. sylvestris*. [a,b]Valores das folhas secas e frescas entre as populações FCF e EEA são estatisticamente diferentes $p < 0,05$; [c]Valores das folhas secas entre populações FCF e EEA são estatisticamente diferentes $p < 0,05$; [d]Valores das folhas frescas entre populações FCF e EEA são estatisticamente semelhantes $p < 0,05$. 110
Figura 29. Rotação óptica específica dos OE das folhas de *C. sylvestris*. *Valores estatisticamente diferentes na respectiva população, $p < 0,05$. 112
Figura 30. Cromatoplacas do OE das populações FCF, EEA, CB e EEA coletados em Jul/Dez (40 µL/mL, hexano) e os padrões *E*-cariofileno, óxido de cariofileno e *α*-humuleno (6 µL/mL, hexano), utilizando a FM 1 hex: AcOEt 85:15 (v/v). Revelador, ácido sulfúrico 10 %, 110 ºC, 10 min. 116
Figura 31. Cromatoplacas do OE das populações FCF, EEA, CB e EEA coletados em Jul/Dez (40 µL/mL, hexano) e os padrões *E*-cariofileno, óxido de cariofileno e *α*-humuleno (6 µL/mL, hexano), utilizando a FM 2 hex. Revelador, ácido sulfúrico 10 %, 110 ºC, 10 min. 117
Figura 32. Estruturas químicas dos componentes majoritários do OE de folhas de *C. sylvestris*. A: espatulenol, B: óxido de cariofileno, C: biciclogermacreno, D: epóxido de humuleno II, E: *β*-elemeno e F: *α*-humuleno. 122
Figura 33. Estruturas químicas: A) monoterpeno limoneno e B) sesquiterpeno aromático curcumeno. 123
Figura 34. Componentes do OE específicos da var. *sylvestris*, A: bulnesol, B: *γ*-gurjuneno, C: 10-*epi*-*β*-acoradieno, conforme as análises populacionais e de folhas secas e folhas frescas. 123
Figura 35. CG-EM expandidos do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA (10 espécimens de cada população, respectivamente) das coletas de Jul e Dez/2016. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno). 124

Figura 36. CG-EM expandidos do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações CB e FCA (10 espécimens de cada população, respectivamente) das coletas de Jul e Dez/2016. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno). 125
Figura 37. Perfil cromatográfico populacional do OE das folhas de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA. 126
Figura 38. Perfil cromatográfico do OE das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (população FCF) e *C. sylvestris* var. *lingua* (população EEA). 127
Figura 39. Perfil cromatográfico circadiano do OE das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (população FCF). 128
Figura 40. Perfil cromatográfico circadiano do OE das folhas de *C. sylvestris* var. *lingua* (população EEA). 129
Figura 41. Espectro de massas do *β*-elemeno, *E*-cariofileno, *α*-humuleno e germacreno D (componentes majoritários) do OE das folhas de *C. sylvestris*. 131
Figura 42. Espectro de massas do biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e epóxido de humuleno II (componentes majoritários) do OE das folhas de *C. sylvestris*. 132
Figura 43. Componentes do OE identificado apenas folhas *in natura* da *C. sylvestris*. 133
Figura 44. CG-EM expandidos dos componentes voláteis das folhas *in natura*, do OE de folhas secas e folhas frescas de *C. sylvestris* da população FCF. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno). A coluna cromatográfica foi cortada em 10 cm em ambas as extremidades antes das análises das folhas *in natura*. 139
Figura 45. CG-EM expandidos dos componentes voláteis das folhas *in natura*, do OE de folhas secas e folhas frescas de *C. sylvestris* da população EEA. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno). A coluna cromatográfica foi cortada em 10 cm em ambas as extremidades antes das análises das folhas *in natura*. 140
Figura 46. Proposta de mecanismo da conversão do biciclogermacreno em espatulenol, adaptado de Toyota *et al.* (1996). 142

Figura 47. Proposta de mecanismo da oxidação do *E*-cariofileno em óxido de cariofileno, adaptado de Sköld *et al.* (2006). 144
Figura 48. Proposta de mecanismo da oxidação do *α*-humuleno em epóxido de humuleno II. 144
Figura 49. Proposta de mecanismo da oxidação *E*-*β*-farneseno em *E*-nerolidol. .. 145
Figura 50. Esquema geral da biossíntese dos componentes majoritários presentes em *C. sylvestris*. 147
Figura 51. Espectros na região do IV-FT do OE de folhas de *C. sylvestris* populações FCF, EEA, CB e FCA coletadas em Jul e Dez/2016. Cada população é formada pelo OE da mistura de 10 espécimens. 148
Figura 52. Representação ampliada dos cromatogramas antes (esquerda) e depois (direita) do alinhamento: A) t_R 35,000 min, B) t_R 3,000 min, C) t_R 40,000 min, d) t_R 43,000 min. 151
Figura 53. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA, mostrando os agrupamentos de acordo com as populações. 153
Figura 54. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA. 153
Figura 55. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA mostrando os agrupamentos de acordo com as populações. 155
Figura 56. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA. 156
Figura 57. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF mostrando o agrupamento de acordo com as estações do ano. ... 157
Figura 58. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF. 157
Figura 59. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA mostrando os agrupamentos de acordo com as estações do ano. 158
Figura 60. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA mostrando os agrupamentos de acordo com as estações do ano. 159
Figura 61. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF mostrando o agrupamento de acordo com os horários (à esquerda fevereiro e à direita Agosto). 159

Figura 62. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF (à esquerda fevereiro e à direita Agosto). 160
Figura 63. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA mostrando os agrupamentos de acordo com os horários (à esquerda fevereiro e à direita Agosto). 161
Figura 64. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA (à esquerda fevereiro e à direita Agosto). 162

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Uso popular das várias partes de *C. sylvestris*, adaptado de Castro (2016) 39
Tabela 2. Teor de OE das folhas de *C. sylvestris*, descrito na literatura. 46
Tabela 3. Composição do OE (%) das folhas de *C. sylvestris*, descrito na literatura. 48
Tabela 4. Códigos de registros das exsicatas FCF 101 – 110, depositadas no Herbário do Instituto Botânico do Estado de São Paulo. 70
Tabela 5. Códigos de registros das exsicatas EEA 201 – 210, depositadas no Herbário Dom Bento Pickel. 70
Tabela 6. Códigos de registros das exsicatas FCA 301 – 310, depositadas no Herbário do Instituto Botânico do Estado de São Paulo. 71
Tabela 7. Códigos de registros das exsicatas CB 401 – 410, depositadas no Herbário Dom Bento Pickel. 71
Tabela 8. Índice de paliçada de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA. *EEA apresentou diferença estatística para as demais populações $p < 0,05$. 89
Tabela 9. Caracterizações química e granulométrica dos solos das populações FCF, EEA, CB e FCA. 94
Tabela 10. Composição química e teor (%) dos componentes do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA (10 espécimens de cada população, respectivamente), coletadas em julho e dezembro de 2016, identificados por CG-EM. 120
Tabela 11. Composição química e teor (%) dos componentes voláteis das folhas *in natura*, folhas secas e frescas de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA (10 espécimens de cada população, respectivamente) analisados por CG-EM. 137
Tabela 12. Bandas de absorção relativas as deformações vibracionais dos OE das folhas de *C. sylvestris*. Cada população está representa pelas coletas de Jul e Dez/2016. 149

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt: acetato de etila

AINEs: anti-inflamatórios não-esteroides

ATR: *attenuated total reflectance* (modo de reflexão atenuada)

Cas B: casearina B

Cas S: casearina S

Cas T: casearina T

Cas U: casearina U

Cas X: casearina X

Casg F: caseargrewiina F

CB: Parque Estadual Carlos Botelho

CCD: cromatografia em camada delgada

CC: cromatografia em coluna

CC_{50}: concentração citotóxica para 50 % das células

CE_{50}: concentração mínima efetiva 50 %

CIM: concentração inibitória mínima

Cfa: clima – mesotérmico úmido com verão quente

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CG-DIC: cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chamas

COX: cicloxigenase

COX 1: cicloxigenase tipo 1

COX 2: cicloxigenase tipo 2

COW: *correlation optimized warping* (correção de deslocamentos da linha de base)

CTC: capacidade de troca de cátions

Cwa: clima – mesotérmico de inverno seco

DAP: diâmetro do caule na altura do peito

DE_{50}: dose mínima efetiva 50 %

DE_{100}: dose mínima efetiva 100 %

DL_{50}: dose mínima letal 50 %

DMAPP: *dimethylallyl diphosphate* (dimetilalil difosfato)

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DT-CG-EM: dessorção térmica acoplada a cromatografia gasosa e a espectrometria de massas

DV: droga vegetal

DXP: 1-deoxi-*D*-xiluose-5-fosfato

EEA: Estação Experimental de Araraquara

EM: espectro de massas

FCA: Faculdade de Ciências Agronômicas

FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FE: fase estacionária

FM: fase móvel

FPP: farnesil difosfato

GFPP: geranilfarnesil difosfato

GGPP: geranilgeranil difosfato

GPP: geranil difosfato

GPS: *global positioning system* (sistema de posicionamento global)

H + Al: acidez potencial

hex: hexano

HPLC: *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

HSV-1: herpes simples tipo I

IC_{50}: concentração mínima inibitória 50 %

IL-1*β*: interleucina IL-1*β*

iNOS: *inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico-sintase induzível)

IR: índice de retenção

IPP: *isopentenyl diphosphate* (isopentenil difosfato)

IV-FT: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

IUV: índice ultravioleta

MEP: *methylerythritol phosphate* (metileritritol fosfato)

MVA: *mevalonic acid* (ácido mevalônico)

MO: matéria orgânica

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

OE: óleo essencial

PCA: *principal component analysis* (análise de componentes principais)

PGE_2: prostaglandina E_2

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS

R_f: fator de retenção

RMN: ressonância magnética nuclear

SB: soma das bases

SNC: sistema nervoso central

TNF-*α*: *tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)

t_R: tempo de retenção

TTP: tiamina difosfato

UR: umidade relativa

V: saturação por bases

RESUMO

A *Casearia sylvestris* Swartz apresenta duas variedades: var. *sylvestris* (típica de Mata Atlântica) e var. *língua* (típica do Cerrado). As ações anti-inflamatória, antiulcerogênica, antitumoral e antimicrobiana do óleo essencial (OE) das folhas foram comprovadas. A variabilidade química nas plantas é associada a fatores genéticos e ambientais, entretanto, como existem poucos estudos de variabilidade do OE da *C. sylvestris*, o objetivo foi avaliar o teor e composição química de ambas variedades em locais, períodos e horários diferentes, estabelecendo parâmetros botânicos, físicos e químicos do OE. Neste estudo foram realizadas análises morfoanatômicas e da composição dos solos dos espécimes coletados. O OE foi extraído por hidrodestilação das folhas frescas e folhas secas, para determinação do teor e composição (CG-EM) correlacionando com fatores edáfico-climáticos. Foram realizadas análises físicas e quimiométricas do OE. A morfologia dos troncos e folhas, estômatos e índice de paliçada diferenciaram as variedades. Os resultados da densidade, índice de refração, infravermelho e CCD foram semelhantes entre as variedades e a rotação óptica diferenciou as variedades. As folhas secas e a var. *sylvestris* possuem maior teor de OE, já o teor de sesquiterpenos oxigenados no OE aumentou com a secagem e extração. Foi verificada variabilidade populacional, intrapopulacional e sazonal no teor de OE. O *β*-elemeno, *α*-humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e epóxido de humuleno II foram os componentes majoritários do OE. O teor de germacreno D, *α*-muurolol e *α*-cadinol foi maior na var. *língua.* A composição do OE apresentou variabilidade química populacional, sazonal e circadiana, sendo influenciada pela temperatura, pluviometria e ventos. Os parâmetros botânicos, físicos e químicos diferenciaram as variedades de *C. sylvestris* e foi verificada variabilidade populacional, sazonal e circadiana, com influência dos fatores edáfico-climáticos na morfologia das folhas, teor e composição do OE.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris* var. *sylvestris*, *Casearia sylvestris* var. *lingua*, variabilidade química, óleo essencial e análise de componente principal.

ABSTRACT

Casearia sylvestris Swartz exhibits two varieties: var. *sylvestris* (typical from Atlantic Fores) and var. *língua* (typical from Cerrado). The anti-inflammatory, antiulcerogenic, antitumor and antimicrobial activities of essential oil (EO) from leaves were proven. Chemical variability in plants is associated with genetic and environmental factors, however, as there are few studies of *C. sylvestris* from EO variability, the aim was to evaluate chemical content and composition of both varieties in different places, periods and times, establishing botanical, physical and chemical parameters from EO. In this study, morpho-anatomical and soil analysis from collected specimens were performed. EO was extracted by hydrodistillation from fresh leaves and dry leaves to determine the content and composition (GC-MS) correlating with edaphic-climatic factors. Physical and chemometrics analysis of EO were performed. Morphology of trunk and leaves, stomata and palisade index differentiated varieties. Density, refractive index, infrared and TLC results were similar between varieties and optical rotation differentiated varieties. Dried leaves and var. *sylvestris* have higher EO content, whereas oxygenated sesquiterpenes content in EO increased with drying and extraction. Population, intrapopulation and seasonal variability in the EO content were verified. *β*-elemene, *α*-humulene, germacrene D, bicyclogermacrene, spathulenol, caryophyllene oxide and. humulene epoxide II were the major components in EO. Germacrene D, *α*-muurolol e *α*-cadinol contents were higher in var. *língua*. Composition of EO showed chemical population, seasonal and circadian variability, being influenced by temperature, rainfall and winds. Botanical, physical and chemical parameters differentiated *C. sylvestris* varieties and it was verified population, seasonal and circadian variability, with the influence of edaphic-climatic factors on leaves morphology, EO content and composition.

Keywords: *Casearia sylvestris* var. *sylvestris*, *Casearia sylvestris*, var. *lingua*, chemical variability, essential oil and principal component analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 26
2 OBJETIVOS 30
2.1 Objetivo Geral 30
2.2 Objetivos Específicos 30
3 REVISÃO DA LITERATURA 32
3.1 Descrição Botânica 32
3.2 Etnobotânica e etnofarmacologia 37
3.3 Metabólitos secundários (ou metabólitos especiais) em *C. sylvestris* 39
3.3.1 Óleos essenciais (ou voláteis) 41
3.4 Farmacologia 53
3.5 Toxicologia 57
3.5.1 Óleo essencial 57
3.6 Variabilidade química do metabolismo secundário vegetal 58
4 MATERIAL E MÉTODOS 64
4.1 Planejamento Experimental Geral 64
4.2 Materiais e equipamentos 65
4.3 Material vegetal 67
4.3.1 Coletas do material vegetal 67
4.3.2 Secagem 68
4.3.2.1 Determinação do tempo de secagem do material vegetal 68
4.3.2.2 Perda por secagem do material vegetal 69
4.3.2.3 Perda por dessecação em balança por infravermelho (INFRATEST) da droga vegetal 69
4.4 Análises botânicas 69
4.4.1 Preparo das exsicatas 69
4.4.2 Análise macroscópica 71
4.4.3 Análises anatômicas das folhas 71
4.4.3.1 Análise anatômica dos cortes paradérmicos 72
a) Índice de paliçada 72
b) Análise de estômatos 72
4.5 Análises de solos 73
4.6 Extração e determinação do teor de óleo essencial 73

4.7 Determinação dos parâmetros físicos do óleo essencial 74
4.7.1 Índice de refração 74
4.7.2 Rotação óptica específica 74
4.7.3 Densidade relativa 74
4.8 Análises cromatográficas e espectroscópicas do óleo essencial 75
4.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) 75
4.8.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) 75
4.8.3 Dessorção térmica acoplada a cromatografia gasosa e espectrômetro de massas (DT-CG-EM) 76
4.8.4 Espectroscopia no IV-FT 77
4.9 Análises quimiométricas 77
4.9.1 Alinhamento cromatográfico 77
4.9.2 Análise quimiométrica populacional 77
4.9.3 Análise quimiométrica sazonal 78
4.9.4 Análise quimiométrica circadiana 78
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 80
5.1 Coletas e secagem do material vegetal 80
5.1.1 Dados das coletas 80
5.1.2 Determinação do tempo de secagem do material vegetal 80
5.1.3 Perda por secagem do material vegetal 80
5.1.4 Perda por dessecação em balança por infravermelho (INFRATEST) da droga vegetal 81
5.2 Análises Botânicas 82
5.2.1 Preparo das exsicatas 82
5.2.2 Análise macroscópica 84
5.2.3 Análises anatômicas das folhas 88
5.2.3.1 Índice de paliçada e Análise de estômatos 88
5.3 Análises de solos 91
5.4 Determinação do teor de óleo essencial 96
5.4.1 Determinação do teor de OE populacional (FCF, EEA, CB e FCA) 96
5.4.1.1 Determinação do teor de OE por espécimens (FCF e EEA) 98
5.4.2 Determinação do teor de OE sazonal (FCF e EEA) 100
5.4.3 Determinação do teor circadiano (FCF e EEA) 108
5.4.4 Determinação do OE em folhas frescas e folhas secas (FCF e EEA) 109

5.5 Determinação dos parâmetros físicos do óleo essencial 110
5.5.1 Índice de refração 111
5.5.2 Rotação óptica específica 111
5.5.3 Densidade relativa 113
5.6 Análises cromatográficas e espectrométricas do óleo essencial 114
5.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) 114
5.6.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) 117
5.6.2.1 Análise populacional da composição do OE (FCF, EEA, CB e FCA) .. 118
5.6.2.2 Perfil cromatográfico (*Fingerprint*) do OE de folhas de *C. sylvestris* 126
5.6.2.3 Análise comparativa dos componentes voláteis *in natura*, do OE das folhas frescas e das folhas secas (FCF e EEA) 133
5.6.3 Espectroscopia no IV-FT 148
5.7 Análises quimiométricas 150
5.7.1 Alinhamento cromatográfico 150
5.7.2 Análises quimiométricas 151
6 CONCLUSÕES 164
7 REFERÊNCIAS 166
8 APÊNDICES 195

C. sylvestris var. *lingua*, Cerrado – Botucatu-SP. Fonte: O Autor

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na medicina tradicional é relatado há milênios, sendo às vezes considerado como a única forma de tratamento acessível (Borchardt, 2002). Devido à grande variabilidade de espécies e composição química, as plantas são fonte de novos medicamentos. Cerca de 50 % dos medicamentos utilizados pela população mundial são originários de plantas medicinais ou obtidos diretamente de plantas e alterados através de semissíntese (Li e Vederas, 2009). Newman e Cragg (2016), demonstraram que dos 1.211 agentes terapêuticos lançados no mercado entre 1981 – 2014 (extratos vegetais, fármacos, macromoléculas biológicas e vacinas), 55 % estão associados aos produtos naturais (6 % fármacos naturais, 1 % extratos vegetais, 21 % fármacos derivados de produtos naturais e 27 % fármacos sintéticos análogos a produtos naturais) e entre os fármacos naturais a maioria são metabólitos secundários extraídos de plantas medicinais.

As formas de uso terapêutico das plantas são variáveis, sendo frequentemente utilizadas como preparações simples de uso tradicional ou popular (chás, garrafadas, decocto, maceração, banhos, compressas, inalações e unguentos), bem como por formulações farmacêuticas mais elaboradas desenvolvidas a partir de seus derivados, como os fitoterápicos (produtos tradicionais fitoterápicos e medicamentos fitoterápicos), que são produtos provenientes de matérias-primas vegetais (geralmente extratos ou óleos essenciais) com objetivo curativo, paliativo ou profilático (Brasil, 2014). A fitoterapia (*phyton* – plantas; *therapia* - tratamento) é uma prática muito antiga e é bastante utilizada como complemento ao tratamento usualmente empregado, principalmente pelas populações de baixa renda.

Devido ao amplo território, o Brasil concentra vários tipos de biomas, climas, solos e ampla biodiversidade vegetal (Nodari e Guerra, 2004), com cerca de 20 mil espécies de plantas endêmicas das mais de 30 mil espécies de plantas já catalogadas (Stehmann e Sobral, 2017), apresentando assim uma ampla diversidade biológica que representa 20 % das espécies conhecidas no mundo. No Brasil, o uso de plantas medicinais no tratamento de várias doenças é uma prática muito comum e aliado aos conhecimentos da medicina popular e medicina indígena, os quais tem grande potencial para o desenvolvimento de fármacos e

medicamentos sintéticos ou precursores de medicamentos semissintéticos originários de plantas (Lorenzi e Matos, 2002).

A *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae), popularmente conhecida como guaçatonga no Brasil, consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS) e está presente no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, que regulamenta a padronização de fitoterápicos, garantindo a qualidade, eficácia e segurança de princípios ativos naturais. O uso indicado da *C. sylvestris* é por infusão (chá medicinal) das folhas (produto tradicional fitoterápico) para combater a dificuldade de digestão (dispepsia) (Brasil, 2011). Entretanto, a *C. sylvestris* não está relacionada na lista de medicamentos ou produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado ou sujeitos à notificação da RDC ANVISA n. 26/2014 e não consta nenhum tipo de medicamento proveniente ou derivado da *C. sylvestris* inscrito na ANVISA (Brasil, 2014; 2018), contudo os extratos são utilizados em farmácias e farmácias vivas como chás (antidispéptico) e pomadas (anti-inflamatório e analgésico), de acordo com Pereira *et al.* (2017).

As folhas da *C. sylvestris* são utilizadas na medicina popular (infuso ou decocto) como anti-inflamatório, cicatrizante, antiulceroso, gastroprotetor, anestésico tópico, contra picadas de cobras, abelhas e insetos, queimaduras, herpes, sífilis, aftas, halitose, sedativo, estimulante sexual, tônico, infecções microbianas, depurativo, antirreumático, antisséptico, febrífugo e antidiarreico (Ferreira *et al.*, 2011; Tomazi *et al.*, 2014). Contudo, apenas as atividades cicatrizante, anti-inflamatória, antiulcerosa, contra *Helicobacter pylori* e antiofídica dos extratos e óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* foram comprovadas (Fapesp *et al.*, 2003; Esteves *et al.*, 2005; Lorenzi e Matos, 2008; Ferreira *et al.*, 2011; Pierri *et al.*, 2017; Spósito *et al.*, 2019).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que derivados vegetais ou substâncias isoladas da *C. sylvestris* apresentaram baixa toxicidade (Basile *et al.*, 1990; Maistro *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2014; Ameni *et al.*, 2015; Bou *et al.*, 2015), indicando que podem ser utilizados na terapia com segurança.

Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) apresentam várias restrições, pois são agentes causadores de distúrbios gastrointestinais e cardiopatias, e juntamente com a bactéria *Helicobacter pylori* são os principais agentes etiológicos

de lesões gastroduodenais (Grosser *et al.*, 2011). Como os derivados (extratos e óleo essencial) da *C. sylvestris* apresentaram atividades anti-inflamatória, gastroprotetora e anti-*H. pylori*, a espécie demonstra grande potencial terapêutico para distúrbios gástricos e inflamatórios (Spósito *et al.*, 2019).

A *C. sylvestris* apresenta plasticidade fenotípica, sendo conhecidas 2 variedades morfológicas, a *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*, podendo apresentar espécimens com características intermediárias (características botânicas intermediárias as 2 variedades), dificultando a sua distinção (Sleumer, 1980; Klein e Sleumer, 1984; Cavallari *et al.*, 2010; Claudino *et al.*, 2013). Entretanto, são poucos os dados na literatura sobre a variabilidade química do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*, que apontem diferenças químicas significantes intrapopulacional, interpopulacional, sazonal e circadiana, assim como se o perfil dos metabólitos presentes no óleo essencial pode ser utilizado ou não para diferenciar as variedades.

Visando o desenvolvimento e padronização de um medicamento fitoterápico a base do óleo essencial de folhas de *C. sylvestris* com atividade anti-inflamatória e cicatrizante, os estudos de variabilidade química do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* são necessários a fim de caracterizarem e determinarem a composição química das variedades var. *sylvestris* e var. *lingua*, de modo a apontar os seus respectivos marcadores químicos, variedade, época do ano e horário ideais para a coleta.

C. sylvestris var. *sylvestris*, Mata Atlântica – PE Carlos Botelho-SP. Fonte: O Autor

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a variabilidade química populacional, sazonal e circadiana de substâncias voláteis presentes em folhas de *Casearia sylvestris* Swartz var. *sylvestris* e *Casearia sylvestris* Swartz var. *lingua*, contribuindo para o determinação dos parâmetros botânicos, químicos e físicos do OE e das folhas secas e folhas frescas de *C. sylvestris* Sw.

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a morfologia dos espécimens e a variabilidade das estruturas secretoras presentes nas folhas;

b) Determinar parâmetros físicos de controle de qualidade para o OE;

c) Avaliar a variabilidade química populacional, sazonal e circadiana dos OE coletados dos diferentes espécimens das duas variedades de *C. sylvestris*, através de análise estatística multivariada e correlacionar com fatores ambientais e composição dos solos;

d) Comparar a composição química do OE obtido por hidrodestilação e identificado por CG-EM das folhas frescas e folhas secas, assim como a composição química *in natura* dos componentes voláteis das folhas frescas utilizando CG-EM acoplado ao sistema de dessorção térmica;

C. sylvestris var. *lingua*, Cerrado – Araraquara-SP. Fonte: O Autor

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Descrição Botânica

O nome dado ao gênero *Casearia* é uma homenagem ao missionário holandês Casearius e a espécie *sylvestris* (latim) é referente a floresta ou silvestre (selva), já o seu nome popular "guaçatonga" tem origem no tupi-guarani (Klein e Sleumer, 1984; Güntzel, 2008). O primeiro relato foi de Swartz em 1797 na *Flora Indiae Occidentalis*, até que Eichler (1871) incluiu-a na *Flora Brasiliensis*, na família *Bixaceae*, depois alterada para família *Flacourtiaceae* (Absy e Scavone, 1973; Sleumer, 1980) e após estudos de sequenciamento genético foi transferida para a família *Salicaceae* (Azuma *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2002; Apg, 2003; Souza e Lorenzi, 2005).

Considerada de fácil adaptação em diferentes climas, a *C. sylvestris* distribui-se em todo o Brasil e Américas Central e do Sul (Darwinion, 2002; Cavallari *et al.*, 2010; Marquete e Mansano, 2010; Ferreira *et al.*, 2011).

O termo "guaçatonga" é o nome popular mais conhecido da *C. sylvestris*, entretanto, outros nomes comuns são atribuídos no Brasil, tais como: apia-açu, arco-de-pipa, baga-de-pomba, breu-de-tucano, bugre-branco, cabatão, caibium, caroba, café-bravo, café-do-diabo, cafeeiro, café-silvestre, cafezinho-do-mato, caferana, camarão, cambróe, canela-de-veado, catinguá-verde, chá-de-bugre, chá-de-frade, cavalinho, erva-de-bugre, erva-de-lagarto, erva-de-macuco, erva-de-pontada, espeto, fruta-de-saíra, gaibim, lagarteiro, língua-de-lagarto, língua-de-tiú, marinheiro, marinheiro-bravo, marmelada vermelha, marmelinho-do-campo, mata-gado, para-tudo, pau-de-lagarto, petumba, pióia, porangaba, ramo-de-carne, são-gonçalo, saritan, vaçatonga e varre-forno (Caminhoá, 1877; Silva, 1926; Hoehne, 1939; Absy e Scavone, 1973; Correa, 1975; Scavone *et al.*, 1979; Torres e Yamamoto, 1986; Lorenzi, 2002; Marquete e Vaz, 2007), rajador, palo de rajados, gazatumba, yerba de lagarto e catinguá-verde (Argentina), cusé (Bolívia), cafecillo cimarrón, hierta de burro e burro kaa (Paraguai), guazatunga (Uruguai), aguedita macho e sarnilha em Cuba (Possolo e Ferreira, 1949; Carvalho, 2007a; Valdés *et al.*, 2008).

Casearia sylvestris é encontrada como subarbusto, arbusto ou árvore, de 1,5-15,0(20) m, perenifólia, heliófita, higrófita e esciófita, com copa densa e arredondada, tronco de 20-30 cm; ramos patentes, delgados, flexuosos, extremidade glabra e pubescente, marrom a avermelhado, lenticelas esparsas a numerosas;

folhas oblongas, elípticas ou ovado-oblongas, base atenuada, simétrica a assimétricas, lisas ou ásperas, medindo (3)6–14 cm x (1)2–3,2(4,2)5,0 cm, membranáceas a papiráceas, glabras, ápice curto a longo-acuminado a falcado, cuneada ou obtusa, pecíolo glabo a pubescente, com cerca de 0,5-0,6 cm, delgado, lâminas lanceolado-ovadas, margem mucronado-serrado a serrado, cartáceas, concolor, nítidos na face adaxial (fresco), pontuações e traços translúcidos densos, pequenos, numerosos, distribuídas por toda a lâmina, margem levemente glandular-serrulada a serrada, glabras, raro curto-pubescente na face abaxial, sempre sobre as nervuras central e secundárias, nervuras secundárias ascendentes 5 a 8 pares, proeminentes na face abaxial, com reticulações nas veias e vênulas inconspícua a conspícua na face abaxial e inconspícua a proeminente na face abaxial. As flores são pequenas, aroma adocicado, verdes, actinomorfas, hipóginas e hermafroditas, fasciculadas sésseis, 24-40 flores por inflorescência, bractéolas pequenas, escamiformes na base dos pedicelos; pedicelos com 2,0-6,0 mm, articulados, glabro a pubescente; Botão floral obovado a globoso, 5 séplalas esverdeadas, cremes ou alvoamareladas, levemente unidas na base, internamente glabras, externamente glabras a pubescentes, oblongas, 4,0 x 2,0 mm, apresenta 10 estames (8-9)10(11-14); filetes glabros a seríceos, conectivo com glândula apical glabra; anteras com glândula apical pequena, néctar de fácil acesso. Lobos do disco seríceos a tomentosos, 0,5-1,0 mm; ovário ovóide, glabro a seríceo na parte superior, estilete com 2-3 ramos na extremidade, estigmas 2-3, capitados (Absy e Scavone, 1973; Klein e Sleumer, 1984; Marquete, 2001; Imatomi *et al.*, 2009). O florescimento varia de junho a novembro e frutificação de setembro a novembro (Absy e Scavone, 1973; Lorenzi e Matos, 2002; Marquete e Vaz, 2007) e segundo Torres e Yamamoto (1986), a floração é de março a dezembro, já a frutificação de agosto a novembro. Os frutos são ovóide, globosos a obtusangular, glabros a tênue piloso no ápice, verde escuro a vermelho, medindo 4,0-7,0 x 5,0 mm, de 1–4(7) sementes elipsoides, glabras, lisas, pegajoso, arilo alaranjado e marrom quando seco (Klein e Sleumer, 1984; Torres e Yamamoto, 1986; Marquete, 2001; Marquete e Vaz, 2007).

A distribuição de *C. sylvestris* em diversos biomas altera sua morfologia, apresentando variação de tamanho, tronco de casca lisa a fissurada, forma, textura e tamanho das folhas. A *C. sylvestris* apresenta semelhanças morfoanatômicas com a *Casearia obliqua Spreng.* e *Casearia decandra* Jacq. (Torres e Yamamoto, 1986; Marquete, 2001), dificultando a identificação. São reconhecidas 2 variedades de *C.*

sylvestris com base na morfologia externa (Sleumer, 1980; Klein e Sleumer, 1984; Silva, 2003a; Botrel *et al.*, 2006; Cavallari *et al.*, 2010).

Como exemplo de diferenciação morfológica, nas Figuras 1 e 3A é apresentada a *C. sylvestris* var. *sylvestris*, que é uma espécie arbórea, com altura superior a 2 m, as folhas são verdes escuras e maiores, oblongas, com reticulação das veias e veinhas um pouco obscuras; flores são glabras, laxa a densamente cinzento-pubérulas; típicas de florestas densas e úmidas.

Nas Figuras 2 e 3B é apresentada a *C. sylvestris* var. *lingua*: que é uma espécie arbustiva, as folhas são verdes claras e menores, mais ou menos ovadas a oblongo-ovadas, com reticulação das veias e veinhas mais marcadas em ambas as faces, geralmente discolores; tronco com a casca fissurada marrom a cinza; flores mais ou menos densamente pubérulas; típicas de regiões de cerrado e clima seco.

Contudo, podem existir espécimens com características morfológicas e genéticas intermediárias, tornando a identificação imprecisa (Klein e Sleumer, 1984; Torres e Yamamoto, 1986; Cavallari *et al.*, 2010).

As variedades *sylvestris* e *lingua* podem ser distinguidas anatomicamente em cortes paradérmicos considerando a forma das células epidérmicas, presença dos estômatos nas faces abaxial e adaxial e pelo índice de paliçada. Quimicamente, a var. *lingua* apresenta maiores concentrações de compostos fenólicos, enquanto a var. *sylvestris* apresenta maiores concentrações de diterpenos clerodânicos (Marquete, 2001; Cavallari *et al.*, 2010; Claudino *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2015).

Figura 1. *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* (São Miguel Arcanjo-SP), altura aproximada 12 m. Fonte: O Autor.

Figura 2. *Casearia sylvestris* var. *lingua* (Estação Experimental de Araraquara, Araraquara-SP), altura aproximada de 2,5 m. Fonte: O Autor.

Figura 3. Folhas de *C. sylvestris*. A: var. *sylvestris* (FCF 103) e B: var. *lingua* (EEA 207). Fonte: O Autor.

3.2 Etnobotânica e etnofarmacologia

As folhas, cascas e raízes da guaçatonga são utilizadas por populações indígenas da América Latina (Ferreira *et al.*, 2011) como antitérmico no uso externo (banho) ou interno (decocto) (Junges *et al.*, 1985). Tribos nativas do Brasil como Karajá e outras maceram as cascas e raízes para tratar diarreia, ferimentos, lepra e picada de cobra, já os indígenas da tribo Xucuru utilizam as folhas no tratamento de doenças venéreas, enquanto tribos do Peru (Shipibo-Conibo) utilizam o decocto das cascas no tratamento de gripes e resfriados (Hoehne, 1939; Vieira e Martins, 2000), antiespasmódico e tônico (Itokawa *et al.*, 1990).

O uso de *C. sylvestris* como anti-inflamatório, antisséptico, cicatrizante, analgésico e contra picadas de cobra é comum por tribos indígenas da Bolívia (Baya, 2001), já o decocto dos ramos e folhas frescas e caules são utilizados na medicina popular colombiana em cortes, feridas e como antitumoral e no Paraguai tem-se usado na cura de reumatismo, sarnas e eczemas (Graham *et al.*, 2000; Alonso, 2007).

O decocto de folhas e raízes é utilizado na medicina tradicional como antiparasitário, afrodisíaco e tratamento de sífilis, feridas, cortes, herpes, anestésico tópico, fungicida e controle de temperatura corporal (Alonso, 2007), depurativo do sangue (Baldauf *et al.*, 2009) e em picadas de cobra (Barata-Silva *et al.*, 2005), já o decocto das cascas tem sido utilizado como anti-inflamatório, as folhas no tratamento de herpes, sífilis, diminuição da febre e picada de cobra, já as raízes são empregadas para aliviar dores no corpo (Hirschmann e Arias, 1990; Souza e Felfili, 2006).

Folhas e ramos de *C. sylvestris* são utilizados na medicina popular no tratamento de alergias, coceiras, antitussígeno, gripes, reumatismo, cicatrizante, analgésico, digestivo, emagrecedor, diurético, regulação da pressão arterial e contra má circulação sanguínea (Vendruscolo e Mentz, 2006; Bratti *et al.*, 2013). As cascas são utilizadas para controlar a febre, diarreia e herpes (Esteves *et al.*, 2005) e os ramos para sanar doenças no fígado e pneumonia (Vendruscolo *et al.*, 2005).

Há relatos sobre o uso de *C. sylvestris* no tratamento de anemia (Moreira e Guarim-Neto, 2009) hipolipidemia e anorexígeno (Silva *et al.*, 2010b), anemia e em caso de baixa imunidade, colesterol, diurético, picada de inseto (Tomazi *et al.*, 2014) diminuição do peso, pressão arterial, colesterol, afecções do ovário, próstata e doenças cardíacas (Pereira *et al.*, 2009).

Como mencionado, a *C. sylvestris* é usada na medicina popular e na medicina indígena na forma de infuso, decocto ou banho, podendo atribuir as ações farmacológicas aos extratos e ao OE, considerando que Sertié *et al.* (2000) e Santos (2008) identificaram a presença de componentes do óleo essencial nos extrato hidroetanólico (75 %) e etanólico, respectivamente.

Algumas das formas de uso popular da *C. sylvestris* no Brasil são associadas as várias atividades farmacológicas relatadas na literatura científica (Lorenzi e Matos, 2008; Ferreira *et al.*, 2011), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Uso popular das várias partes de *C. sylvestris*, adaptado de Castro (2016)

Usos	Partes usadas[1]	Referências
antiofídico	-----	(Caminhoá, 1877)
cicatrizante	folhas	(Pupo, 1926)
anestésico tópico, cicatrizante diarreia, trauma, lesões na pele, ulcerações, antitérmico, herpes, antiofídico e gripe antitérmico, antisséptico tópico estomáquico e moléstias de pele	folhas folhas folhas folhas ----- -----	(Hoehne, 1939; Guil-Guerrero e Campra, 2009)
anestésico depurativo	folhas, raízes	(Hoehne *et al*., 1941)
antileprótico, antipruriginoso antitérmico, cicatrizante entorses, estomáquico e antisséptico	-----	(Possolo e Ferreira, 1949)
antitérmico antiulceroso depurativo moléstias de pele	folhas	(Coimbra, 1958)
Antidiarreico e antiofídico moléstias herpéticas antitérmico anti-inflamatório tópico antirreumático e depurativo	folhas folhas, caule caule ----- -----	(Correa, 1975)
afecções oro-faringeanas anestésico local cicatrizante hemostático	folhas ----- ----- -----	(Scavone *et al.*, 1979)
depurativo, hidropisias moléstias de pele e sífilis	folhas, raízes	(Balbach, 1981)
abortivo	-----	(Sinnott-Silva *et al.*, 1984; Oliveira *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 1988)
antitérmico	folhas, cascas	(Junges *et al.*, 1985)
antiofídico	-----	(Rizzini *et al.*, 1988; Ruppelt *et al.*, 1990a; Ruppelt *et al.*, 1990b; Pereira *et al.*, 1992)
antiulceroso, gastrite, halitose	folhas	(Panizza, 1998)
afecções de pele, antidiarreico antiofídico, antirreumático antitérmico e depurativo	folhas, cascas	(Rodrigues e Carvalho, 2001)
antiulceroso, cicatrizante, herpes gastrite, halitose, queimaduras, lepra tópica, úlcera, supressor de apetite, anestésico tópico e cicatrizante anti-inflamatório e antiofídico antirreumático e tônico depurativo, hemostático e analgésico	folhas folhas folhas folhas folhas, cascas folhas ,cascas -----	(Lorenzi e Matos, 2002; Tobias *et al.*, 2007)
analgésico, anti-inflamatório, sífilis, antimicrobiano, anticâncer, antitérmico e antiofídico	planta inteira	(Mesquita *et al.*, 2005; Napolitano *et al.*, 2005)
emagrecimento	-----	(Dickel *et al.*, 2007)

3.3 Metabólitos secundários (ou metabólitos especiais) em *C. sylvestris*

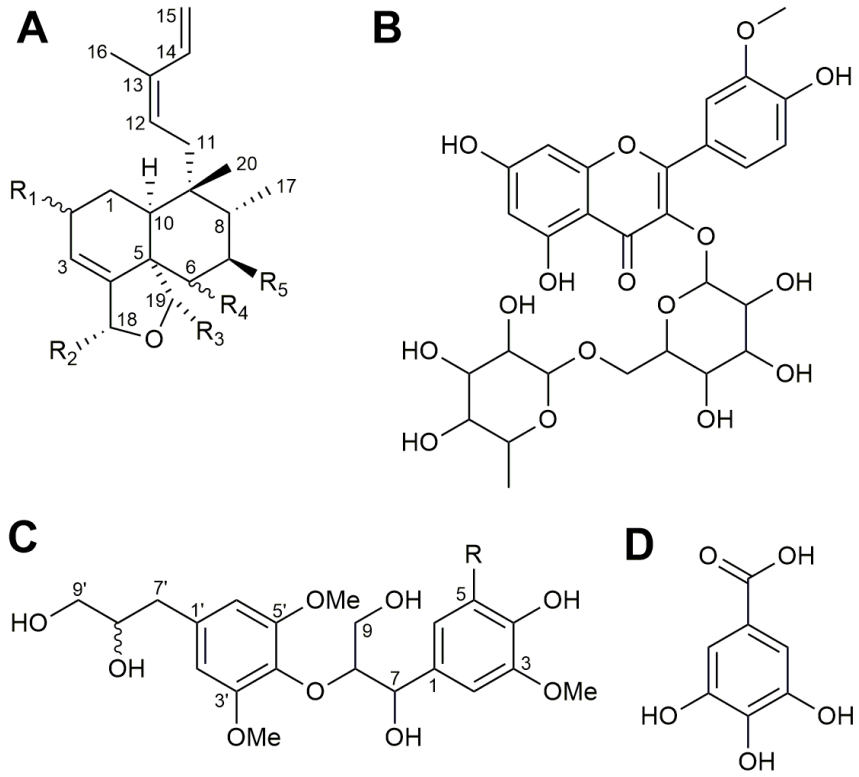
Os metabólitos secundários isolados e/ou identificados em *C. sylvestris* incluem monoterpenos e sesquiterpenos (Sousa *et al.*, 2007; Silva, S. L. *et al.*, 2008; Bou *et al.*, 2013), diterpenos clerodânicos, triterpenos e *nor*isoprenoides (Itokawa *et al.*, 1990; Morita *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2009a; Santos *et al.*, 2010; Bou *et al.*, 2015), flavonoides (Figura 4), incluindo isoquercetina, rutina, hesperidina, quercetina, isoramnetina, 4'-*O*-metoxicanferol (Junges *et al.*, 1985; Raslan *et al.*, 2002; Bueno *et al.*, 2016) e outros 7 compostos fenólicos, ácido

cafeico, ácido clorogênico, ácido vanílico, tirosol; além de uma naftoquinona, o lapachol (Raslan *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2014). Bueno *et al.* (2016), identificaram 15 flavonoides de folhas de *C. sylvestris* var. *lingua*, destes 14 eram flavonoides glicosilados: isoramnetina-3-*O*-triglicosídeo (ramnose + ramnose + glicose ou galactose), quercetina-3-*O*-diglicosídeo (ramnose + arabinose ou xilose), kaempferol-3-*O*-diglicosídeo (ramnose + glicose ou galactose), quercetina-3-*O*-glicosídeo (glicose ou galactose), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina), isoramnetina-3-*O*-neohesperidosideo, isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo (narcisina), quercetina-3-*O*-glicosídeo (arabinose ou xilose), isoramnetina-3-*O*-glicosídeo (glicose ou galactose), isoramnetina-3-*O*-[ramnopiranosil-3-hidroxi-3-metilglutaroil]-glucopiranosideo, kaempferol-3-*O*-diglicosídeo (ramnose + arabinose ou xilose), isoramnetina-3-*O*-*α*-*L*-ramnopiranosil-(1→2)-*α*-L-arabinopiranosideo, isoramnetina-3-*O*-[3-hidroxi-3-metilglutaroil]-galactopiranosideo, isoramnetina-3-*O*-pentosídeo (arabinose ou xilose) e a (+)-catequina.

Além destas substâncias foram identificadas nas folhas 6 neolignanas (casearialignanas A-F) que pertencem a classe dos fenilpropanoides (Wang *et al.*, 2010), derivados do ácido elágico e ácido gálico (Silva, S. L. *et al.*, 2008) e ésteres derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE) (Silva *et al.*, 2009).

Cerca de 41 diterpenos clerodânicos (Figura 4) foram identificados em *C. sylvestris*, casearinas A-X, dinor casearina X, caseargrewiina F, casearvestrinas A-C e caseamembrina A (Itokawa *et al.*, 1990; Morita *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 1998; Oberlies *et al.*, 2002; Espindola *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009b; Santos *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2014; Bou *et al.*, 2015).

Figura 4. A) Estrutura geral das casearinas, componentes majoritários (diterpenos clerodânicos) de *C. sylvestris* var *sylvestris*, B) narcisina (flavonoide) identificada em *C. sylvestris* var. *lingua*, C) casearialignana e D) ácido gálico.



Do ponto de vista químico, os diterpenos clerodânicos (casearinas) e os flavonoides são marcadores quimiotaxonômicos que diferenciam as variedades *sylvestris* de *lingua*, de modo que os diterpenos clerodânicos são predominantes em *C. sylvestris* var *sylvestris*, enquanto os flavonoides predominam em *C. sylvestris* var *lingua* (Bueno *et al.*, 2015)

3.3.1 Óleos essenciais (ou voláteis)

Óleos essenciais são metabólitos secundários líquidos voláteis, lipossolúveis, os quais apresentam composição química muito variável e geralmente com forte odor. A maioria dos OE são constituídos majoritariamente por monoterpenos (10 átomos de C), sesquiterpenos (15 átomos de C) ou fenilpropanoides (9 átomos de C). A volatilidade é atribuída a estrutura química desses compostos no OE aliado a baixa massa molecular e o tipo e intensidade das interações intermoleculares, conferindo a cada planta os seus respectivos odores (Bakkali *et al.*, 2008).

Os OE geralmente são incolores ou amarelos (variando do claro ao escuro), com sabor ácido ou picante (Esteves *et al.*, 2005). Eles atuam nas plantas como agente de defesa contra microrganismos (bactérias, vírus e fungos), predadores, na atração de polinizadores, evitando perda de água e aumento de temperatura (Oliveira *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Os terpenos são formados por unidades de isopreno (2-metil-buta-1,3-dieno) e nas plantas a síntese ocorre por meio de 2 vias, que são as vias do ácido mevalônico (MVA) e do fosfato de metileritritol (MEP), sendo que geralmente as plantas utilizam ambas as vias simultaneamente. A via do MVA é iniciada através da condensação das moléculas de acetil-CoA, formando o *β*-hidroxi-*β*-metilglutaril-CoA que origina o MVA através das reações de hidrólise e redução enzimática, que por fosforilação sucessiva dos grupos hidroxilas do MVA, seguida de descarboxilação e eliminação do grupo carboxílico resulta na formação do 3,3'-dimetilalil difosfato (DMAPP), um isômero do 3-isopentenil difosfato (IPP) (Figura 5). A via do MEP tem início com a molécula do intermediário ácido pirúvico mediada pela coenzima tiamina difosfato (TPP), com as etapas de rearranjo do tipo pinacólico seguido de redução, formando a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) que é transformada no 2-*C*-metil-D-eritritol-4-fosfato, seguida de uma série de reações químicas até a biossíntese do IPP, Figura 6 (Dewick, 2009).

Figura 5. Rota biosintética do DMAPP através do intermediário ácido mevalônico (Dewick, 2009).

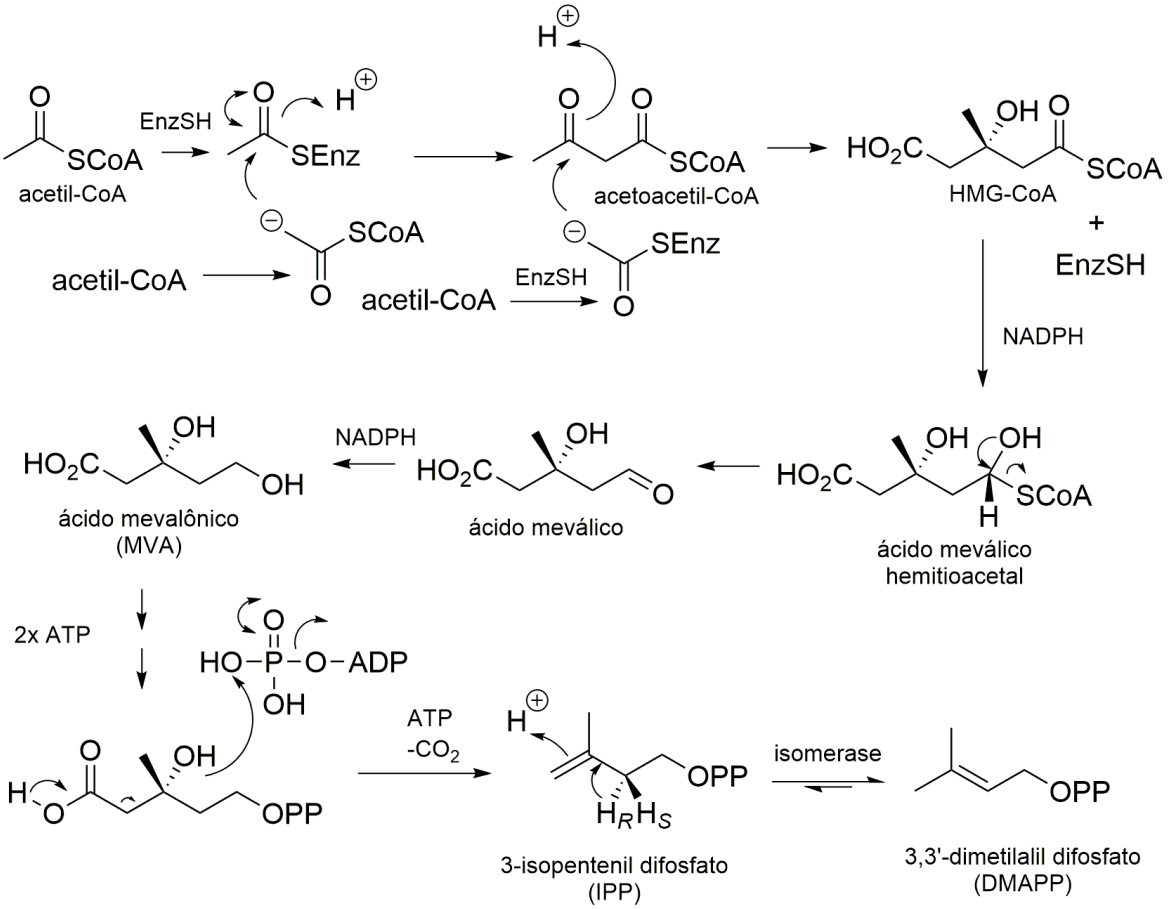
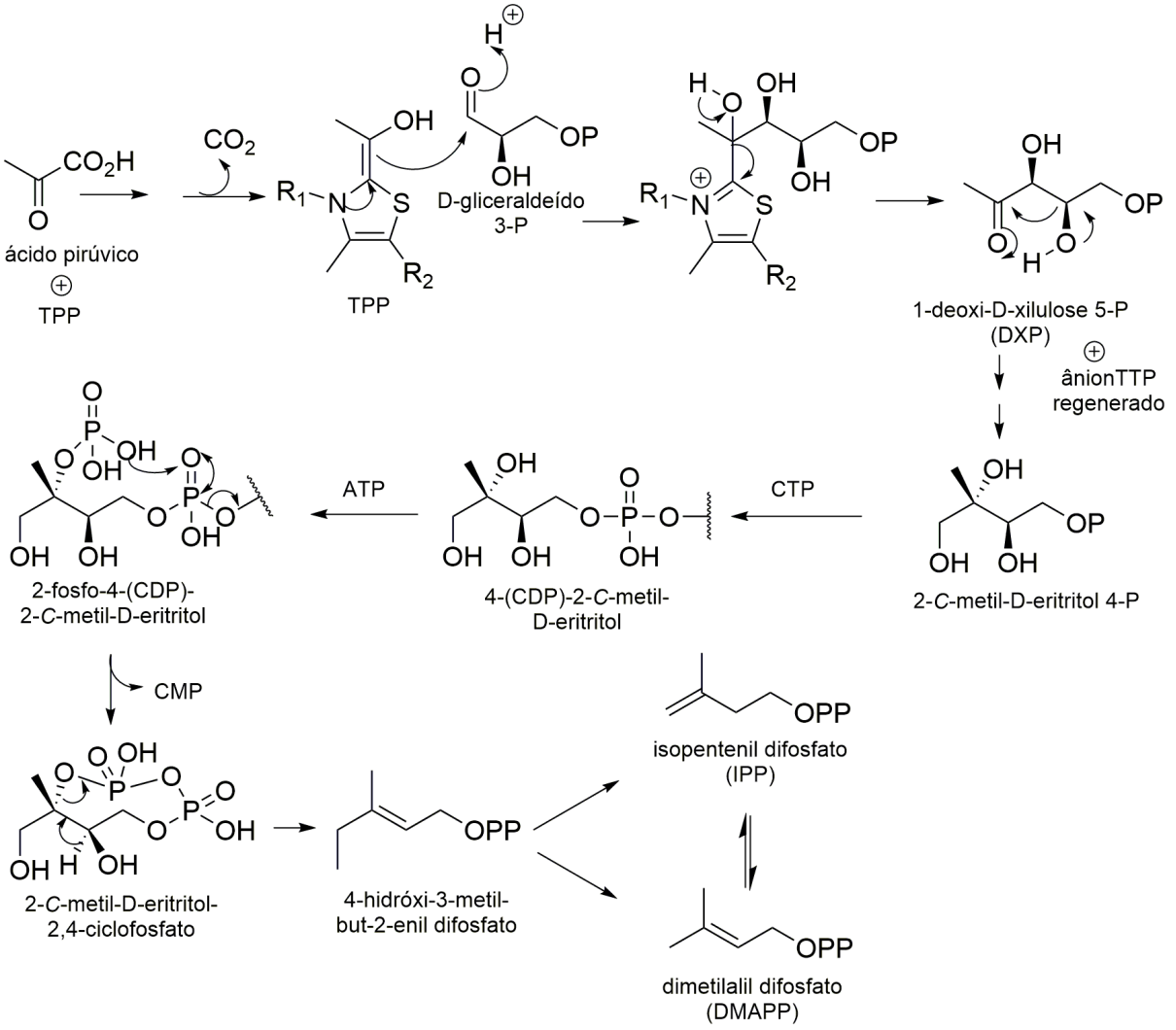


Figura 6. Rota biosintética do IPP através do intermediário ácido pirúvico (Dewick, 2009).



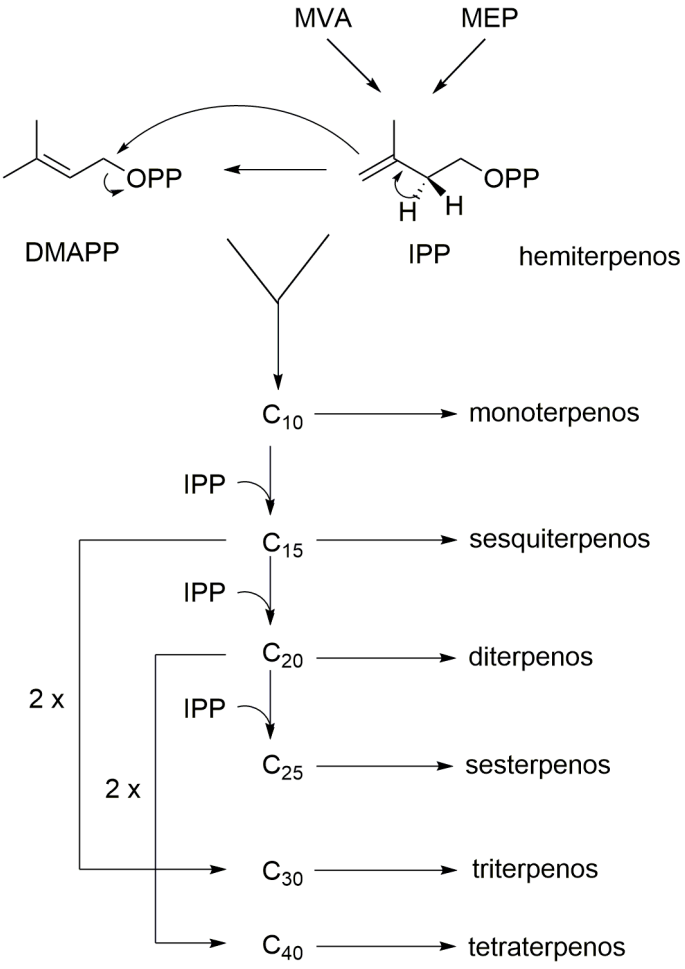
As enzimas da via do MEP estão localizadas nos cloroplastos das células vegetais, onde são biossintetizados os monoterpenos (C-10), diterpenos (C-20) e tetraterpenos (C-40), enquanto que as enzimas da via do MVA estão localizadas no citosol das células vegetais, onde são biossintetizados os sesquiterpenos (C-15), triterpenos (C-30) e esteroides, que sugere que os sesquiterpenos presentes no OE da *C. sylvestris* são biossintetizados através da via do MVA.

Através da condensação cabeça-cauda dos hemiterpenos (C-5) DMAPP e IPP (Figura 7), que é catalisada pela enzima preniltransferase, é formada a cadeia precursora dos monoterpenos, o geranil difosfato (GPP), que através de sucessivas condensações com o IPP forma o farnesil difosfato (FPP), geranilgeranil difosfato (GGPP) e geranilfarnesil difosfato (GFPP), enquanto que a condensação de 2 FPP

forma o precursor dos triterpenos (esqualeno) e de 2 GGPP forma o precursor dos tetraterpenos (Dewick, 2009).

Em relação à biossíntese de sesquiterpenos Dewick (2009), verifica que no início há a biossíntese de sesquiterpenos monocíclicos (germacreno B e D) e após vários rearranjos na cadeia carbônica formam os mais diversos sesquiterpenos.

Figura 7. Esquema da rota biosintética dos terpenos (Lobo e Lourenço, 2007; Dewick, 2009).



Nos OE são encontrados em geral de 20 a 60 componentes diferentes, entretanto, cerca de 2 ou 3 são os constituintes majoritários e representam na maioria das vezes cerca de 20 a 70 % da composição química (Pichersky *et al.*, 2006). Geralmente, as propriedades biológicas dos OE são definidas pelos componentes majoritários (Betts, 2001), mas muitas vezes a ação de uma substância isolada pode não representar a ação do OE, pois a atividade pode ser decorrente da interação com as substâncias minoritárias presentes nos OE (Apel, 2001).

O teor de OE das folhas secas de *C. sylvestris* variou, sendo relatado na literatura valores de 0,1 a 2,5 % (Tabela 2). Quando a variedade foi citada, fez referência a var. *sylvestris*, portanto pode ser que algum estudo foi realizado com a var. *lingua*, mas não foi informado. Desse modo, foi observado que os dados sobre teor de OE das folhas de *C. sylvestris* apresentaram grande variabilidade quantitativa, pois os OE foram extraídos de folhas coletadas em diferentes biomas, locais, épocas do ano e diferentes métodos, os quais apresentam fatores climáticos com características diferentes que podem influenciar no teor de OE.

Tabela 2. Teor de OE das folhas de *C. sylvestris*, descrito na literatura.

Teor (%)	Hidrodestilação	variedade	Bioma	mês/ano	Autor
0,3	4 h	*sylvestris*	Cerrado	07/16	Spósito *et al.* (2019)
0,3	4 h	*sylvestris*	Cerrado	02/17	Moreira *et al.* (2019)
0,4	4,5 h	*sylvestris*	Mata Atlântica	02/12	Amaral *et al.* (2017)
1,2	2 h	*sylvestris*	-----	2014	Pereira *et al.* (2017a)
0,8	4 h	-----	-----	11/11	Cavalheiro *et al.* (2016)
0,3 – 0,8	3 h	-----	-----	03/12- 12/13	Pezzi (2014)
0,2	5 h	*sylvestris*	Mata Atlântica	10/12	Bou *et al.* (2013)
0,1 – 0,4	2,5 h	-----	-----	05/07 – 01/08	Spandre (2010)
1,0	5 h	-----	-----	-----	Becker (2009)
1,0	4 h	-----	-----	03/05	Silva, S. L. *et al.* (2008)
0,6	4 h	-----	-----	12/04	Sousa *et al.* (2007); Schneider *et al.* (2006)
0,6 – 1,1	arraste a vapor 1 h	*sylvestris*	Mata Atlântica	01 – 09/00	Castellani *et al.* (2006a)
-----	AcOEt 10 min*	*sylvestris*	Mata Atlântica	-----	Tininis *et al.* (2006)
2,5	2 h	-----	-----	-----	Esteves *et al.* (2005)

*Sonicação

Outro fato importante que pode ter alterado o teor de OE são as condições de secagem e extração (tipo, tempo e temperatura), pois podem influenciar no rendimento de OE (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Os componentes majoritários, geralmente são os componentes que caracterizam o OE e podem ser identificados no OE de um determinado espécimen em qualquer época, horário ou local de coleta. Entre os principais metabólitos secundários presentes no OE das folhas de *C. sylvestris*, destacam-se como componentes majoritários os sesquiterpenos hidrocarbonetos, tais como: biciclogermacreno, germacreno D, *δ*-cadineno, *α*-zingibereno, *β*-cariofileno; e o sesquiterpeno oxigenado, espatulenol (Figura 8).

Conforme observado no perfil dos OE das folhas de *C. sylvestris* (Tabela 3), quase todos os componentes são sesquiterpenos, com poucos relatos de monoterpenos e fenilpropanoides (C6–C9), Figura 9. Os monoterpenos identificados no OE de *C. sylvestris* foram o *α*-pineno com 2,0 - 4,0 %, a pulegona com 0,5 % e o linalol com 0,7 - 0,8 % (Schneider *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2007; Silva, S. L. *et al.*,

2008), enquanto o único fenilpropanoide citado foi o eugenol com 0,2 %, identificado por Schneider *et al.* (2006).

Quimicamente, o OE apresentou grande variabilidade entre os quase 20 artigos sobre OE de folhas de *C. sylvestris* publicados. O número de componentes identificados variou entre 9 a 31, sendo a ampla maioria composta por hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, 3 monoterpenos (3 relatos na literatura) e 1 fenilpropanoide mencionado (Tabela 3). Componentes do OE como os germacrenos B e D, que são precursores de outros componentes (Dewick, 2009) foram identificados na maioria dos OE citados na literatura. Alguns dos componentes citados como majoritários não foram identificados em todos os OE, assim como alguns componentes minoritários foram relatados em apenas um ou em poucos OE. De acordo com a Tabela 3, alguns autores relataram erroneamente o teor dos componentes do OE, pois alguns OE estão com os seus componentes com teor acima de 100 %.

Os OE foram coletados em vários locais, sendo que as variedades, biomas, condições de secagem e extração na maioria das vezes não foram informados na literatura. Nesse sentido, pode-se justificar o estudo sistemático de variabilidade qualitativa do OE, pois foram identificados diferentes componentes majoritários, além de que os componentes variaram conforme o local, época e horário de coleta. De acordo com os dados da literatura, o OE das folhas de *C. sylvestris* apresentaram variabilidade química, pois a composição do OE variou bastante entre os OE mencionados na literatura.

Tabela 3. Composição do OE (%) das folhas de *C. sylvestris*, descrito na literatura.

	Teor de metabólitos secundários do OE de folhas de *C. sylvestris* (%)									
Componentes	**Spósito *et al.* (2019)**	**Moreira *et al.* (2019)**	**[1]Amaral *et al.* (2017)**	**Pereira *et al.* (2017a)**	**Bou *et al.* (2013)**	**Silva, S. L. *et al.* (2008)**	**Sousa *et al.* (2007)**	**Schneider *et al.* (2006)**	**[2]Tininis *et al.* (2006)**	**Esteves *et al.* (2005)**
eugenol*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,2	-----	-----
linalol**	-----	-----	-----	-----	-----	0,7	-----	0,8	-----	-----
α-pineno**	-----	-----	-----	-----	-----	4,0	2,0	2,0	-----	-----
pulegona**	-----	-----	-----	-----	-----	0,5	0,5	0,5	-----	-----
ciclosativeno	0,8	0,3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
α-acoradieno	-----	-----	-----	-----	4,1	-----	-----	-----	-----	-----
β-acoradieno	-----	-----	-----	-----	2,3	-----	-----	-----	-----	20,8
alloaromadendreno	1,6	0,3	1,1 (1,4)	-----	-----	-----	0,3	0,3	-----	-----
aromadendreno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,3	0,3	-----	-----
biciclogermacreno	29,4	12,2	18,4 (19,6)	3,1	-----	43,6	24,2	24,2	(3,6)	40,9
α-himachaleno	2,0	0,5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
α-bisaboleno	0,1	0,3	-----	-----	-----	-----	0,7	0,7	-----	-----
β-bisaboleno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,2	-----	-----	-----
β-bourboneno	-----	-----	-----	-----	-----	0,5	0,3	0,3	-----	-----
isodeleno	0,2	9,0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
cipereno	3,4	1,8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
α-cubebeno	3,9	2,4	-----	7,2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
β-cubebeno	0,5	0,2	-----	1,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
γ-cadineno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,3	0,3	-----	-----
δ-cadineno	10,3	6,6	-----	2,5	1,3	0,8	0,6	0,6	(1,7)	-----
E-cariofileno	9,2	22,2	7,2 (9,1)	7,6	14,2	18,1	27,5	-----	-----	13,8
α-cariofileno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	27,5	-----	-----
α-copaeno	4,1	0,5	2,5 (4,3)	8,5	0,2	0,8	0,6	0,6	-----	-----
α-zingibereno	-----	-----	-----	-----	48,3	-----	-----	-----	-----	-----
α-elemeno	-----	-----	-----	-----	-----	1,1	-----	-----	-----	-----
β-elemeno	-----	-----	2,3 (2,9)	3,8	2,2	1,6	1,3	1,3	-----	-----
γ-elemeno	-----	-----	-----	4,8	-----	-----	1,1	0,2	-----	-----
δ-elemeno	0,6	1,5	-----	-----	0,3	0,4	-----	-----	-----	-----
calameneno	-----	-----	-----	-----	-----	2,3	-----	-----	-----	-----
germacreno A	-----	-----	2,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
germacreno B	-----	-----	2,3 (2,3)	7,4	0,4	5,2	0,9	-----	14,8 (13,7)	3,9
germacreno D	4,7	19,6	11,5 (13,4)	3,1	-----	3,9	7,8	7,8	79,2 (66,2)	1,9
α-gurjuneno	0,7	1,4	-----	-----	0,1	-----	0,1	0,1	-----	-----
β-gurjuneno	-----	-----	-----	-----	-----	0,4	0,4	0,4	(1,1)	-----
γ-gurjuneno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	(2,2)	-----
α-humuleno	-----	-----	1,1 (1,3)	17,8	1,7	4,7	3,9	3,9	-----	3,7
Z-*β*-farneseno	0,3	4,3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
longifoleno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1,8 (3,2)	-----
γ-muuroleno	0,2	0,4	-----	0,1	5,1	0,5	0,2	0,5	(3,0)	-----
seicheleno	-----	-----	-----	2,4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
α-selineno	0,2	1,3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
β-selineno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,2 (5,2)	-----
γ-selineno	0,2	0,2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

β-santeleno	3,5	2,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Teor de metabólitos secundários do OE de folhas de *C. sylvestris* **(%)**										
Componentes	**Spósito *et al.* (2019)**	**Moreira *et al.* (2019)**	**[1]Amaral *et al.* (2017)**	**Pereira *et al.* (2017a)**	**Bou *et al.* (2013)**	**Silva, S. L. *et al.* (2008)**	**Sousa *et al.* (2007)**	**Schneider *et al.* (2006)**	**[2]Tininis *et al.* (2006)**	**Esteves *et al.* (2005)**
β-santeleno	3,5	2,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6,9-guaiadieno	-----	-----	0,9 (1,3)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7-*epi*-*α*-selineno	-----	-----	-----	2,1	1,0	-----	-----	-----	-----	-----
tujopseno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5,2
α-guaieno	0,2	0,2	1,3 (1,9)	-----	1,5	-----	-----	-----	-----	-----
α-patchouleno	-----	-----	-----	-----	1,0	-----	-----	-----	-----	-----
E-*α*-bergamoteno	0,8	1,8	-----	-----	0,2	-----	-----	-----	-----	-----
E-*β*-guaieno	-----	-----	-----	-----	1,3	-----	-----	-----	-----	-----
α-longipineno	0,3	3,6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Hidrocarbonetos Sesquiterpenos	**77,2**	**93,3**	**51,3 (57,5)**	**72,1**	**85,2**	**83,9**	**70,7**	**69,1**	**100 (99,9)**	**90,2**
elemol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,8	-----	-----	-----
E-nerolidol	0,4	0,9	6,8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
espatulenol	2,4	-----	4,2 (7,5)	11,8	-----	15,9	0,9	-----	-----	12,6
eudesmol	-----	-----	6,9 (5,7)	2,6	-----	-----	0,6	-----	-----	-----
Z-*E*-farnesol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,3	-----	-----	-----
globulol	-----	-----	-----	-----	-----	3,0	1,2	-----	-----	2,2
guaiol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,7	-----	-----	-----
epóxido de humuleno II	-----	-----	-----	4,1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ledol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,8	-----	-----	-----
α-muurolol	-----	-----	-----	-----	3,7	2,7	-----	-----	-----	-----
óxido de cariofileno	-----	-----	3,9 (3,5)	3,5	-----	-----	0,6	-----	-----	-----
cubebol	-----	-----	1,5	-----	-----	-----	0,4	0,4	-----	-----
carotol	3,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
bulnesol	1,5	-----	-----	-----	-----	-----	4,2	-----	-----	-----
α-cadinol	-----	-----	4,5 (4,4)	-----	3,2	-----	-----	-----	-----	-----
epi-*α*-cadinol	-----	-----	3,0 (2,9)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
viridiflorol	0,6	0,2	-----	-----	5,1	-----	1,9	-----	-----	-----
longipinanol	-----	1,0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
khusimona	-----	-----	-----	-----	0,2	-----	-----	-----	-----	-----
1-*epi*-cubenol	0,6	-----	-----	1,8	0,5	-----	-----	-----	-----	-----
10-*epi*-*γ*-eudesmol	3,2	-----	-----	-----	0,3	-----	-----	-----	-----	-----
Sesquiterpenos Oxigenados	**12,4**	**2,1**	**30,8 (24,0)**	**23,8**	**13,0**	**21,6**	**16,4**	**0,4**	**0,0 (0,0)**	**14,8**
Identificado	**89,6**	**95,4**	**82,1 (81,5)**	**95,9**	**98,2**	**110,7**	**89,6**	**73,0**	**100 (99,9)**	**105,0**

[1]valores entre parênteses referentes às folhas secas.

[2]valores entre parênteses são referentes às análises de folhas coletadas durante a tarde e em itálico durante a manhã.

*fenilpropanoide, **monoterpeno

Figura 8. Estruturas químicas dos componentes majoritários do OE de folhas de *C. sylvestris*. Sesquiterpenos, A: biciclogermacreno, B: germacreno D, C: espatulenol, D: δ-cadineno, E: α-zingibereno e F: *E*-cariofileno.

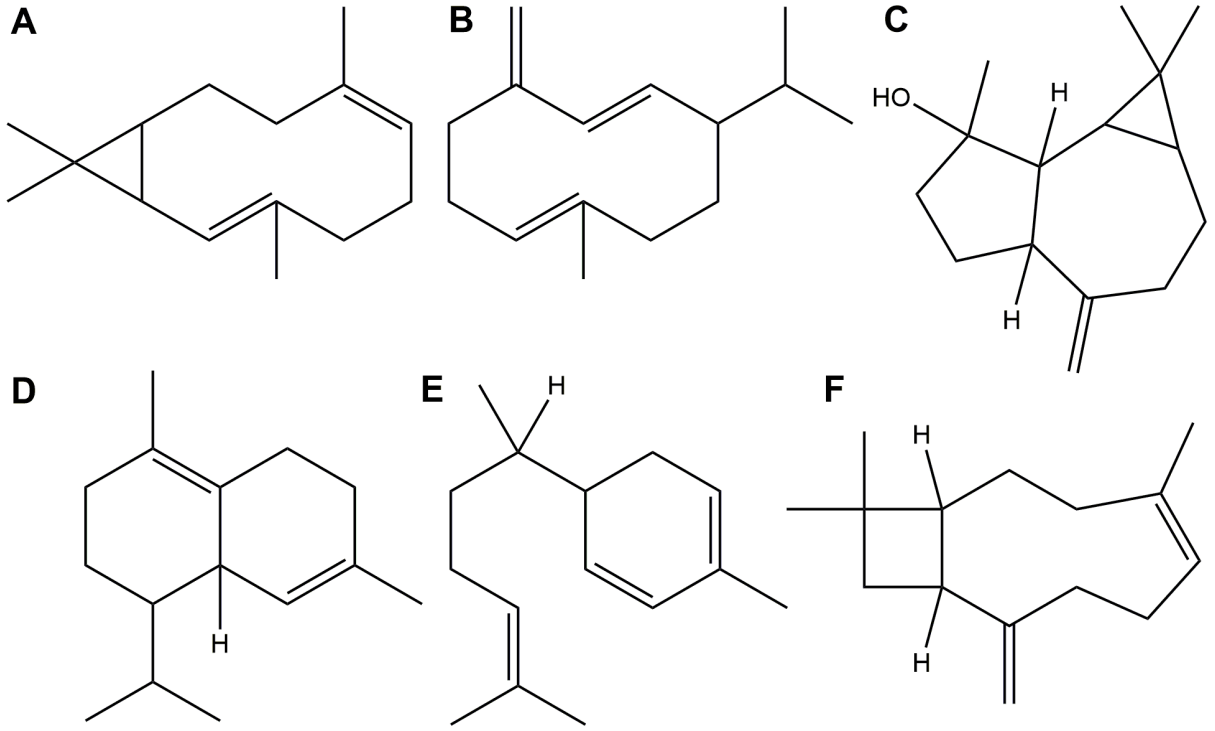
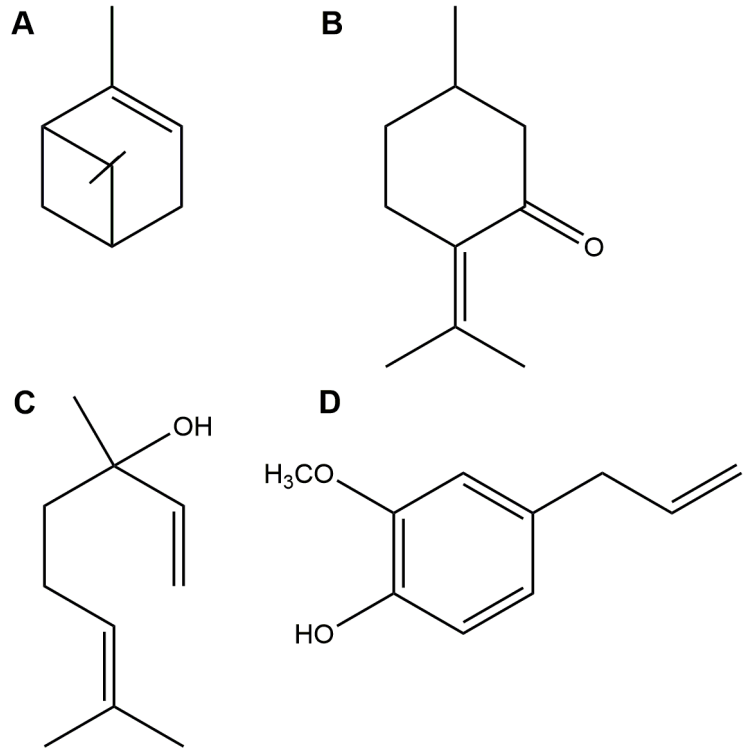


Figura 9. Estruturas químicas dos monoterpenos, A: α-pineno, B: pulegona, C:linalol e do fenilpropanoide, D: eugenol, encontrados no OE de folhas de *C. sylvestris*.



Como componentes majoritários foram escolhidos entre 2 a 5 componentes de maior teor e que representassem cerca de 60 a 70 % do teor da composição dos OE analisado relatados na literatura.

A composição de OE tende a variar muito conforme o local e época de coleta e conforme o trabalho de Spósito *et al.* (2019) os componentes majoritários do OE (coletado em julho/16) foram o biciclogermacreno (29,4 %), o *δ*-cadineno (10,3 %) e o *E*-cariofileno (9,2 %), enquanto no trabalho de Moreira *et al.* (2019) os componentes majoritários (coletado em fevereiro/17) foram o *E*-cariofileno (22,2 %), germacreno D (19,6 %) e o biciclogermacreno (12,2 %). Observa-se que houve variabilidade na composição química, pois os autores utilizaram o OE extraídos do mesmo espécimen, porém em épocas diferentes, entretanto o teor de OE foi semelhante.

Na análise circadiana do OE das folhas de *C. sylvestris* realizada por Tininis *et al.* (2006) foi verificada variabilidade apenas no teor do germacreno D de 79,2 % no período da manhã, com diminuição para 66,2 % à tarde, enquanto que para o germacreno B foi 14,8 % na parte da manhã e 13,7 % na parte da tarde, o que praticamente não alterou o teor, entretanto os cromatogramas apresentados não demonstraram este resultado.

Amaral *et al.* (2017) relataram que os componentes majoritários em folhas frescas e folhas secas de *C. sylvestris* foram o biciclogermacreno (18,4 % frescas e 19,6 % secas), *δ*-cadineno (11,7 % frescas e 15,0 % secas) e germacreno D (11,5 % frescas e 13,4 % secas), indicando que a secagem aumentou o teor dos componentes majoritários no OE.

Em um conjunto de trabalhos sobre avaliação das atividades biológicas que utilizaram o mesmo OE de *C. sylvestris*, os componentes identificados como majoritários foram o *α*-humuleno (17,8 %), espatulenol (11,8 %) e *α*-copaeno (8,5 %) nas folhas de *C. sylvestris* (Pereira *et al.*, 2016a; Pereira *et al.*, 2016b; Pereira *et al.*, 2017a; Pereira *et al.*, 2017b).

Cavalheiro *et al.* (2016) relataram que as substâncias majoritárias foram o germacreno D, biciclogermacreno, *δ*-cadineno, espatulenol e *β*-cariofileno, porém, não apresentaram dados quantitativos.

O único relato do *α*-zingibereno (48,3 %) na composição do OE de *C. sylvestris* foi de Bou *et al.* (2013), sendo juntamente com o *E*-cariofileno (14,2 %) os componentes majoritários do OE.

Spandre (2010) avaliou a composição do OE das folhas frescas de *C. sylvestris* e após a secagem à temperatura ambiente, 40 ºC e 60 ºC, sendo que os componentes majoritários foram o biciclogermacreno (13,7, 17,5, 20,3 e 23,5 %, respectivamente), *δ*-cadineno (6,1, 10,8 11,2 e 12,1 %, respectivamente) e germacreno D (12,9, 8,6, 13,4 e10,6 %, respectivamente). As diferenças observadas nos teores dos componentes majoritários foram pequenas entre as secagens em estufa a 40 ºC e 60 ºC, bem como a 40 ºC e temperatura ambiente.

A composição do OE apresentou (no período de maio a janeiro) ampla faixa no teor dos componentes majoritários, como o germacreno D de 12,9–31,8 %, biciclogermacreno de 2,7–26,7 %, *δ*-cadineno de 1,6–15,4 % e *β*-cariofileno de 3,7–13,6 % (Spandre, 2010). A variação no teor dos componentes majoritários indica que houve variabilidade sazonal na composição do OE, bem como utilizando diferentes processamentos de secagem das folhas previamente à extração do OE.

Esteves *et al.* (2005) analisaram as folhas secas em temperatura ambiente, identificando como componentes majoritários o biciclogermacreno (40,9 %), *β*-acoradieno (20,8 %), *β*-cariofileno (13,8 %) e espatulenol (12,6 %), semelhante a composição do OE das folhas frescas no trabalho de Silva, S. L. *et al.* (2008), sendo neste caso os componentes majoritários o biciclogermacreno (43,6 %), *β*-cariofileno (18,1 %) e espatulenol (15,9 %). Embora os OE analisados foram coletados em locais diferentes (Alfenas-MG e Campinas-SP), apresentaram semelhanças na composição e teor, entretanto o rendimento de OE (1,0 e 2,5 %) variou.

O espatulenol (17,5 %), biciclogermacreno (8,6 %) e *α*-curcumeno (8,5 %) foram os componentes majoritários determinados por Santos (2008), na fração hexano: AcOEt (95:05, v/v), do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, demonstrando a presença de sesquiterpenos componentes do OE no extrato etanólico.

O *β*-elemeno (31,7 %) e o *α*-humuleno (28,2 %) foram os componentes majoritários do OE das folhas de *C. sylvestris*, no trabalho desenvolvido por Güntzel (2008).

O *α*-cariofileno (27,5 %) identificado por Schneider *et al.* (2006) e o *β*-cariofileno (27,5 %) identificado por Sousa *et al.* (2007), podem ser o mesmo componente, pois ambos utilizaram o mesmo OE e o índice de retenção (1425) foi o mesmo para os 2 componentes, inclusive com o biciclogermacreno (24,2 %) sendo um dos componentes majoritários. Considerando que não há relatos do *α*-cariofileno

na literatura como componente do OE de *C. sylvestris*, há possibilidade de ter ocorrido erro na identificação.

3.4 Farmacologia

Na literatura há relatos de ensaios farmacológicos realizados com o OE das folhas de *C. sylvestris* para determinar as atividades antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antileishmanicida, antinociceptiva e antiulcerogênica.

O OE (componentes majoritários: *α*-humuleno 17,8 e espatulenol 11,8 %) na concentração de 4,0 µg/mL possibilitou a diminuição de 6 % na formação de colônias da linhagem de células tumorais A549 (carcinoma do pulmão humano), em relação ao valor obtido pelo grupo controle (Pereira *et al.*, 2016b). A concentração efetiva - CE_{50} para a linhagem celular tumoral A549 foi de 4,0 µg/mL para o OE, ao ser incorporado em um sistema nanoemulsionado o efeito citotóxico foi maior (1,0 µg/mL), contudo, o valor de CE_{50} da doxorrubicina foi de 0,01358 µg/mL (Pereira *et al.*, 2017b), concluindo que os resultados foram insignificantes.

O OE (componentes majoritários: *α*-zingibereno 48,3 e *E*-cariofileno 14,2 %) demonstrou citotoxicidade para as linhagens celulares HL60 (12,0 µg/mL), Siha (IC_{50} 23,9 µg/mL), U-87 (IC_{50} 27,1 µg/mL), HeLa (IC_{50} 29,0 µg/mL), A2058 (IC_{50} 41,1 µg/mL) e MCF-7 (IC_{50} 42,2 µg/mL). Entretanto o componente majoritário do OE (*α*-zingibereno, 48,3 %) foi citotóxico para as linhagens HeLa, U-87, Siha e HL60, com valores de IC_{50} maiores que o OE, o que pode ser atribuído as interações entre o *α*-zingibereno e os demais metabólitos secundários. O OE foi testado na linhagem de células de melanoma B16F10-Nex2, apresentando ação citotóxica com valor de IC_{50} de 61,0 µg/mL e o *α*-zingibereno com valor de 27,0 µg/mL, abaixo do controle positivo (cisplatina), com IC_{50} de 176,0 µg/mL, indicando que o *α*-zingibereno apresentou melhor resultado que o OE, para a linhagem de células de melanoma B16F10-Nex2. Estes resultados indicam que o *α*-zingibereno contribui para a ação citotóxica do OE (Bou *et al.*, 2013).

Silva, S. L. *et al.* (2008), comprovaram a citotoxicidade seletiva para as células tumorais HeLa (carcinoma cervical humano), A-549 (carcinoma do pulmão humano) e HT-29 (adenocarcinoma do cólon humano) com valores de IC_{50} de 63,0, 61,0 e 91,0 µg/mL, respectivamente, comparando com células não-tumorais Vero (rim de macaco) e macrófagos de camundongos com valores de IC_{50} de 210,0 e

234,0 µg/mL, respectivamente. O efeito citotóxico do OE (componentes majoritários: biciclogermacreno 43,6, *β*-cariofileno 18,1 e espatulenol 15,9 %) pode ser parcialmente atribuído ao *β*-cariofileno (IC_{50}: HeLa 21,8; A-549 29,3 e HT-29 41,0 µg/mL) e *α*-humuleno (IC_{50}: HeLa 35,2; A-549 18,9 e HT-29 24,8 µg/mL), pois apresentaram valores de IC_{50} menores para as linhagens de células analisadas.

Ao ser avaliado contra *H. pylori* (ATCC 43504), o valor da concentração inibitória mínima (CIM) do OE das folhas de *C. sylvestris* foi de 125 µg/mL, maior que o valor da fração do extrato etanólico concentrada em diterpenos (62,5 µg/mL), enquanto o valor para a amoxicilina foi de 0,007 µg/mL. A atividade anti-*H. pylori* do OE pode estar relacionada ao biciclogermacreno por ser o componente majoritário (29,4 %) e ao *β*-cariofileno (9,2 %), pois de acordo com Tzakou e Skaltsa (2003) o *β*-cariofileno em concentração proporcional apresentou atividade anti *H. pylori*, ou ainda a outros componentes do OE (Spósito *et al.*, 2019).

Ao avaliar a atividade do OE (componentes majoritários: *β*-elemeno 31,7 e *α*-humuleno 28,2 %) contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, Güntzel (2008) verificou atividade frente a estes agentes patógenos, a qual apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 3,12 mg/mL para todos os microrganismos, enquanto o padrão cloranfenicol apresentou CIM de 0,2 mg/mL.

A atividade antibacteriana do OE (componentes majoritários: *β*-cariofileno 27,5 e biciclogermacreno 24,2 %) na concentração de 12,8 µg/mL foi demonstrada frente as bactérias causadoras de gastroenterites *Staphylococcus aureus, Shigella flexnerri*, *Salmonella* e *Enterobacter*, contudo o OE (1,3 µg/mL) foi mais eficiente contra as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus* (Schneider *et al.*, 2006).

A atividade bactericida do OE de folhas de *C. sylvestris* (componentes majoritários: *β*-cariofileno 27,5 e biciclogermacreno 24,2 %) foi avaliada por Nogueira *et al.* (2007), frente a *Streptococcus mutans* nas concentrações de 5,0, 2,5 e 1,25 µg/µL e contra o *Lactobacillus casei* nas concentrações de 5,0 e 2,5 µg/µL, exibindo resultados melhores do que a clorexidina (10 µg/µL).

Pereira *et al.* (2017a), observaram através dos valores de IC_{50} para as linhagens de *Candida krusei* (IC_{50} 74,3 µg/mL) que o OE foi mais eficiente e para as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (IC_{50} 23,3 µg/mL) e *Candida glabrata* (IC_{50} 23,3 µg/mL) a fração 1-6 (OE foi fracionado em coluna cromatográfica) foi mais

eficiente, inibindo o crescimento dessas linhagens de fungos. O *α*-humuleno foi o componente majoritário no OE (17,8 %) e na fração 1-6 foi o 14-hidroxi-9-*epi*-*β*-cariofileno (18,0 %).

A atividade antifúngica do OE avaliada Pezzi (2014), mostrou que na concentração de 2,5 % houve inibição em 100 % do crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Alternaria alternata*, *Alternaria radicinia*, *Alternaria brassicicola* e *Botrytis* sp e na concentração de 1,5 % o OE inibiu *A*. *alternata* em 81 %, *A*. *radicinia* em 90 %, *A*. *brassicicola* e *Botrytis* sp em 94 %. No entanto, nenhum um fármaco foi mencionado como padrão para comparar os valores de inibição e concentrações com o OE.

O OE de folhas de *C. sylvestris* (componentes majoritários: *α*-humuleno 17,8 %, espatulenol 11,8 % e copaeno 8,5 %) na concentração de 200 µg/mL foi analisado também contra o vírus herpes simples tipo I (HSV-I), inibindo 90 % da atividade do vírus e ao ser incorporado em nanoemulsão (200 µg/mL) inibiu 99,8 % da atividade do vírus, enquanto o aciclovir (200 µg/mL) inibiu 99,0 % da atividade do vírus. A citotoxicidade do OE (CE_{50} 29,7 µg/mL), nanoemulsão incorporada com OE (CE_{50} 0,0016 µg/mL) e do aciclovir (CE_{50} 0,8 µg/mL) foram baixas. Pereira *et al.* (2016b) concluíram que o OE ao ser incorporado em um sistema nanoemulsionado aumentou a eficiência anti-HSV-I e diminuiu a citotoxicidade.

Ao ser avaliado contra *L. amazonensis* o OE de folhas de *C. sylvestris* (componentes majoritários: *E*-cariofileno 22,2 e germacreno D 19,6 %) apresentou valor de IC_{50} contra as formas promastigotas e amastigotas nas concentrações de 29,8 e 10,7 µg/mL, enquanto para a anfotericina B o valor de IC_{50} foi de 0,06 e 0,42 µg/mL, respectivamente, segundo Moreira *et al.* (2019).

A atividade antinociceptiva foi avaliada através do teste de contorções em camundongos, onde o OE (componentes majoritários: biciclogermacreno 40,9, *β*-acoradieno 20,8, *E*-cariofileno 13,8 e espatulenol 12,6 %) na concentração e 125 mg/kg inibiu 58 % das contorções induzidas pelo ácido acético administrado via intraperitoneal, enquanto a indometacina (10 mg/kg) inibiu 56 %. Ao avaliarem a atividade anti-inflamatória, observaram que o OE inibiu o edema de pata induzido pela carragenina, porém, não inibiu o edema induzido pelo dextran e nem o extravasamento do azul de Evans para a cavidade peritoneal induzido pela histamina. O OE não bloqueou o receptor H1 envolvido na inflamação induzida pela histamina (Esteves *et al.*, 2005).

Em relação aos componentes identificados na *C. sylvestris,* o *α*-humuleno e o *E*-cariofileno apresentaram atividade anti-inflamatória, sendo que *α*-humuleno reduziu a produção do fator de necrose tumoral *α* (TNF-*α*), interleucina IL-1*β* (IL-1*β*), prostaglandina E_2 (PGE_2), a enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS), cicloxigenase tipo 2 (COX-2) e o *E*-cariofileno (ambos na dose de 50 mg/kg, por via oral) exerceu efeitos semelhantes, mesmo não inibindo a IL-1*β*, foram equivalentes ao controle (dexametasona) ao serem avaliados no processo inflamatório induzido pela carragenina (Fernandes, Passos, Medeiros, Da Cunha*, et al.*, 2007).

O *α*-humuleno e o *E*-cariofileno isolados de *Cordia verbenacea* D.C. (50 mg/kg) apresentaram resultados semelhantes a dexametasona (0,5 mg/kg) nos ensaios que demonstraram a diminuição do edema de pata induzido por carragenina, entretanto somente o *α*-humuleno diminuiu o edema de pata formado por histamina, indicando que podem ser promissores no tratamento da inflamação (Fernandes, Passos, Medeiros, Cunha*, et al.*, 2007). A atividade anti-inflamatória do *α*-humuleno foi demonstrada no modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas (Rogerio *et al.*, 2009), corroborando seu potencial anti-inflamatório.

O *E*-cariofileno administrado em conjunto com o paclitaxel facilitou a passagem deste pelas membranas celulares, aumentando o acúmulo intracelular, assim potencializando o efeito anticâncer do paclitaxel contra as linhagens de adenocarcinoma do cancro de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de cólon (DLD-1) e de fibroblastos murinos (L-929) (Legault e Pichette, 2007).

Esteves *et al.* (2005), avaliaram a atividade antiulcerogênica e verificaram que a diminuição do volume de secreção gástrica em ratos tratados com OE na dose de 125 mg/kg por via oral, foi menor em relação ao grupo controle e constataram não haver alteração do pH da secreção ácida ao compararem com o grupo tratado com cimetidina (50 mg/kg), podendo sugerir que o OE reduz a secreção gástrica em geral juntamente com a secreção de H^+ e antagonistas de H_2.

De acordo com Kim *et al.* (2014) o óxido de cariofileno foi avaliado nas linhagens celulares de mieloma múltiplo humano, carcinoma de próstata humana e carcinoma de mama humano apresentando potencial para ser utilizado no tratamento destes tipos de câncer. Park *et al.* (2011), sugerem que o óxido de cariofileno age interferindo nas cascatas de sinalização da formação dos tumores, reforçando que o óxido de cariofileno pode ser utilizado na prevenção e tratamento de câncer.

O óxido de cariofileno isolado das cascas de *Annona squamosa* L. na concentração de 25 mg/kg apresentou resultados semelhantes a aspirina 100 mg/kg no edema de pata induzido pela carragenina, indicando que o óxido de cariofileno pode ser utilizado como antinociceptivo (Chavan *et al.*, 2010).

O *E*-cariofileno aumenta a eficácia de alguns medicamentos antineoplásicos e reduz a dor crônica, podendo ser uma alternativa muito útil na terapia do câncer (Fidyt *et al.*, 2016).

Ao avaliarem o potencial anti-inflamatório do *β*-elemeno, Sieniawska *et al.* (2019) verificaram que foi semelhante a dexametasona nos ensaios de atividade imunomoduladora em neutrófilos estimulados por LPS.

Pode ser atribuído ao espatulenol (62,0 % de pureza) isolado de *Salvia mirzayanii* Rech. F. & Esfand. a atividade imunomoduladora, devido à inibição da proliferação dos linfócitos, além de indução da apoptose (Ziaei *et al.*, 2011). O espatulenol apresentou atividade antioxidante, antitumoral contra a linhagem celular de cancro de ovário e reduziu o edema de pata em camundongos no modelo de pleurisia (Nascimento *et al.*, 2018), demonstrando que tem potencial para várias atividades farmacológicas.

Os componentes majoritários do OE de folhas de *C. sylvestris* que podem ser relacionados à atividade antitumoral foram o biciclogermacreno, *E*-cariofileno, *α*-humuleno, *α*-zingibereno e espatulenol, já para a atividade antimicrobiana podem ser considerados responsáveis o biciclogermacreno, *E*-cariofileno, *α*-humuleno e *β*-elemeno: enquanto que para as atividades contra herpes, *L. amazonensis*, antinociceptiva e antiulcerogênica os componentes majoritários associados foram o *α*-humuleno, espatulenol, biciclogermacreno, *β*-acoradieno e *E*-cariofileno. De forma geral, pode-se considerar que os 3 principais componentes majoritários relacionados as atividades farmacológicas foram o biciclogermacreno, *E*-cariofileno, *α*-humuleno.

3.5 Toxicologia

3.5.1 Óleo essencial

O OE de folhas de *C. sylvestris* foi avaliado por Esteves *et al.* (2005) em camundongos por via oral e a DL_{50} foi de 1.100 mg/kg, sendo cerca de 10 vezes maior que a dose efetiva, sugerindo baixa toxicidade aguda para o OE das folhas de *C. sylvestris*.

Sousa *et al.* (2007), analisaram o OE (15, 30 e 45 µg/mL) em células de hepatoma de ratos (HTC), concluindo que o OE induziu danos no DNA (efeito clastogênico), entretanto, em associação com o agente mutagênico metanossulfonato de etila apresentou ação anticlastogênica.

Silva, S. L. *et al.* (2008), avaliaram o OE de folhas de *C. sylvestris* (componentes majoritários: *β*-cariofileno 18,1 % e *α*-humuleno 4,7 %) em 7 tipos de eritrócitos de mamíferos, demonstrando que todas as amostras causaram hemólise nos eritrócitos, indicando que o OE das folhas de *C. sylvestris* e seus componentes podem apresentar toxicidade.

Pereira *et al.* (2016a), avaliaram a CC_{50} do OE de folhas de *C. sylvestris*, verificando que apresentou citotoxicidade na concentração de 4,0 µg/mL e observando danos no DNA de células tumorais A549 (teste do cometa) apresentando CC_{50} de 10,0 µg/mL, enquanto a doxorrubicina apresentou CC_{50} de 0,02 µg/mL, indicando que o OE foi mais citotóxico que o controle.

Os poucos estudos sobre o OE de *C. sylvestris* demonstram haver segurança no uso terapêutico, contudo, uma avaliação detalhada deve ser realizada com o intuito de demonstrar sua segurança para o uso em medicamentos.

O extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* contêm componentes do OE que podem contribuir para as atividades farmacológicas e/ou toxicidade destes extratos (Sertié *et al.*, 2000; Santos, 2008). Ao avaliarem a citotoxicidade do extrato etanólico Espinosa *et al.* (2015) obtiveram o valor de 724,7 µg/mL para DL_{50}.

3.6 Variabilidade química do metabolismo secundário vegetal

Os metabólitos secundários ou metabólitos especiais são compostos de baixo peso molecular e alta variabilidade química estrutural, representados por estruturas químicas complexas, sendo compostos com distribuição restrita e de diferenciação com funções especializadas, tais como defesa contra predadores e patógenos, proteção contra raios ultravioleta, alelopatias, atração de polinizadores e dispersores de sementes, que apresentam atividades biológicas uteis nas áreas farmacêutica, alimentícia, cosmética, entre outras (Simões *et al.*, 2017).

Os metabólitos secundários presentes nas plantas apresentam grande variação qualitativa e quantitativa, devido a uma série de condições, dentre elas os fatores genéticos (quimiotipos) e evolução (crescimento e desenvolvimento da

planta); fatores extrínsecos ou condições ambientais (temperaturas, pluviometria, altitude, latitude, umidade, salinidade, metais pesados, sazonalidade, ciclo circadiano, radiação ultravioleta, poluição, vento, chuva, granizo, ataque de herbívoros ou patógenos, doenças, composição do solo e nutrientes, dentre outros); tipo de órgãos: folhas, flores, frutos, cascas, raízes e galhos; ou tipo de estrutura secretora: estruturas secretoras externas/internas, tricomas, ductos e canais e ciclo de atividade do polinizador. A variação na composição química das plantas processadas pós-colheita, como drogas vegetais, ainda pode ser produzida por processos de secagem, moagem, extração, purificação, secagem de extratos e OE, assim como o armazenamento (Lopes *et al.*, 1997; Schwob *et al.*, 2004; Blank *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Sellami *et al.*, 2009; Botrel *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012; Taiz e Zeiger, 2013; Sarrazin *et al.*, 2015; Kiazolu *et al.*, 2016).

Variações no metabolismo vegetal visam melhorar a adaptação das plantas nas mais diversas condições ambientais, resultando no aumento da quantidade e diversidade de metabólitos secundários (Grotewold, 2005), pois os componentes químicos produzidos pelas plantas podem ser alterados pela interação com o meio ambiente circundante, modificando assim a sua composição química (Bitu *et al.*, 2015).

A lesão mecânica ou química é um dos fatores que pode induzir as plantas a biossíntese metabólitos secundários que em situação normal não seriam biossintetizados. Estas fitoalexinas são biossintetizadas em altas concentrações apresentam propriedades antimicrobianas com a finalidade de combater os microrganismos invasores. Já as estruturas secretoras externas podem sofrer lesões mecânicas e através da ruptura da cutícula sofrem alterações quali/quantitativa, enquanto as estruturas secretoras internas estão menos susceptíveis a estes danos (Figueiredo *et al.*, 2008).

A composição química entre plantas da mesma espécie em seu habitat natural pode sofrer variação, em relação as plantas que foram domesticadas e são cultivadas com fins comerciais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Barros *et al.*, 2009). Dessa maneira, há a necessidade de estudos mais detalhados sobre o teor e a composição química, pois tal variação dos metabólitos secundários pode interferir na ação farmacológica destes possíveis produtos farmacêuticos, tal como os

medicamentos fitoterápicos, prejudicando assim a sua qualidade, segurança e eficácia.

Em relação à variação do perfil dos componentes ativos durante o ano, tornam-se necessários estudos de variabilidade química, em relação as condições de cultivo (local, manejo) e colheita (época do ano, período do dia, idade da planta), garantindo plantas com teores desejados de princípios ativos nos OE (Passreiter e Aldana, 1998; Sangwan *et al.*, 2001). Vale ressaltar que as alterações sazonais podem ser confundidas com as etapas de desenvolvimento das plantas, assim como a temperatura, a qual é um fator que não pode ser relacionado diretamente, por sofrer influência da altitude, latitude e sazonalidade (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Na produção de fitoterápicos as condições de coleta devem ser realizadas também de acordo com o perfil qualitativo visando não apenas o teor de marcadores com atividades biológicas (Sellami *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010).

A secagem do material vegetal desacelera o crescimento de microrganismos e evita algumas reações químicas ocasionadas umidade, temperatura e oxidação, prolongando assim o prazo de validade, de modo que o material vegetal pode ter a sua composição modificada através da perda de OE, e degradação de metabólitos secundários, alterando a aparência, aroma e ação biológica (Figueiredo *et al.*, 2008).

Alguns estudos demonstraram que componentes presentes no OE, como o *δ*-elemeno, *E*-cariofileno, germacreno (A, B e D), *δ*-cadineno, 1-*epi*-cubenol e *β*-gurjuneno apresentaram maior teor durante a fase vegetativa, e são associados a atividade inseticida, dispersão de insetos e inibição do crescimento bacteriano (Moraes *et al.*, 2002; Kiran *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009). Convém ressaltar que a variação no teor dos metabólitos secundários está associada a variações na atividade biológica (Silva *et al.*, 2010a).

Em pesquisa com folhas de *Psidium guyanense* Pers. (araçá), foi demonstrado que a composição química do OE de 12 espécimens coletados em 4 locais diferentes, apresentarem 3 perfis químicos distintos, comprovando através de variáveis quimiométricas haver variabilidade química populacional quali/quantitativa do OE (Figueiredo *et al.*, 2018). O OE de flores e frutos de 93 espécimens de *Pituranthos scoparius* (Coss. & Durieu) Schinz (Guezzah, Argélia) foi coletado de 4 populações em locais diferente, apresentando 3 tipos de OE com composição química diferente, demonstrando que houve variabilidade química intrapopulacional (Malti *et al.*, 2018).

Fernandes *et al.* (2017) observaram variabilidade sazonal na composição do OE de folhas de *Trembleya phlogiformis* DC. (quaresminha-do-campo), assim como a interferência do ciclo de desenvolvimento das folhas interferiu na composição química do OE. A variação quali/quantitativa do OE de folhas de *Cordia verbenacea* DC. (erva-baleeira) foi verificada no estudo sobre variabilidade, demonstrando o aumento do teor de OE nos meses de menor pluviosidade (Matias *et al.*, 2016).

Os menores índices pluviométricos podem estar associados aos menores teores de OE nas folhas de *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer (sassafrás) no outono, considerando que no inverno, primavera e verão os teores de OE e a pluviometria aumentaram consideravelmente (Castellani *et al.*, 2006a), enquanto os OE de *Trilichia catigua* A. Juss. (catuaba) e *Siparuna guianensis* (negramina) não apresentaram variabilidade sazonal no teor de OE (Castellani *et al.*, 2006b). Em estudos sobre a composição química do OE de folhas de *Hortia oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (para-tudo, quina), foi observado que houve variação sazonal (Santos *et al.*, 2016). Sá *et al.* (2016) concluíram que variabilidade sazonal na composição química do OE de folhas de *Hyptis carpinifolia* Benth. (rosmaninho, mata-pasto), pode ser associada a pluviometria.

Nota-se que cada planta se comporta de maneira diferente em relação aos fatores ambientais, enquanto algumas aumentam o teor de OE sob baixas temperaturas e índices pluviométricos, outras diminuem o teor, de acordo com suas necessidades metabólicas, condições de adaptação e sobrevivência.

Embora existam poucos estudos de variabilidade química relatados na literatura sobre a *C. sylvestris*, a grande variabilidade genética da *C. sylvestris* está associada a fatores ambientais e fisiológicos, influenciando na composição do OE (Spandre, 2010).

O OE de folhas de *C. sylvestris* apresentou variabilidade sazonal, com maiores teores de OE nos meses de outono/inverno, justamente quando os índices pluviométricos foram os menores (Castellani *et al.*, 2006a), indicando que em condições extremas o teor de metabólitos secundários aumentou, além de recomendar a coleta nos meses de maior teor de OE. As folhas produziram quantidades significativamente maiores de OE do que os galhos, que por sua vez não apresentaram variações sazonais. Para Castellani *et al.* (2006a), os maiores índices pluviométricos nos meses de primavera/verão podem diminuir a produção de

OE das folhas de *C. sylvestris*, enquanto a fenofase (meses de inverno, Viçosa-MG), pode aumentar a produção de OE.

De acordo com Tininis *et al.* (2006), o OE das folhas de *C. sylvestris* apresentou variabilidade intrapopulacional entre os 12 espécimens (Parque Estadual Carlos Botelho-SP) e variabilidade química circadiana entre os períodos avaliados, manhã (7:00 h) e tarde (15:00 h).

Como a *C. sylvestris* é coletada por extrativismo (Balzon *et al.*, 2008) e pode ser uma espécie cultivada especificamente para produção de medicamentos, torna-se fundamental identificar a melhor época de coleta, fundamentando-se na composição química e teor, permitindo a padronização quali/quantitativa de princípios ativos, correlacionando com a ação farmacológica.

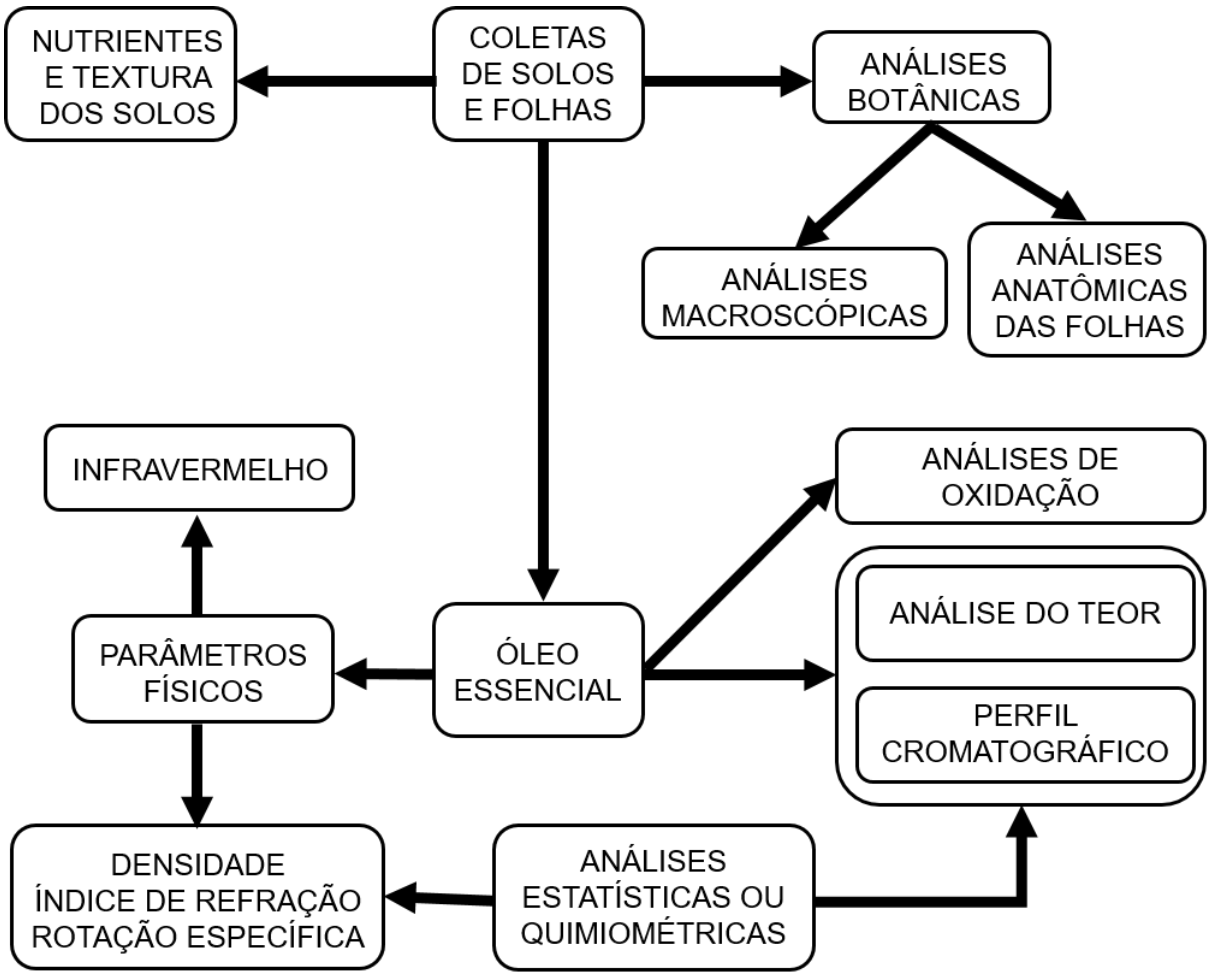
C. sylvestris var. *lingua*, Cerrado – Araraquara-SP. Fonte: O Autor

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Planejamento Experimental Geral

O planejamento experimental geral (Figura 10) estabelece uma sequência lógica de trabalho para facilitar o entendimento das etapas do projeto. As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas para os estudos botânicos, que correspondem a elaboração de exsicatas, análises morfológicas e anatômicas visando identificar a espécie, distinguir as variedades e apontar diferenças entre as populações. Amostras de solo de cada população foram analisadas em relação aos seus constituintes químicos e teor granulométrico.

Figura 10. Esquema referente ao Planejamento Geral Experimental.



Após as coletas das folhas o OE foi extraído para estudos de variabilidade química populacional, sazonal e circadiano. Os estudos de variabilidade química foram realizados com amostras das coletas populacional, sazonal e circadiana,

determinando os seus teores de OE por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e a composição química utilizando-se de técnicas cromatográficas (CCD) e espectrométricas (CG-EM) para obter o perfil químico quali/quantitativo do OE, apontando possíveis diferenças entre as variedades, locais, épocas e horários de coleta. As avaliações dos parâmetros de qualidade (densidade, rotação específica, índice de refração e perfil espectroscópico por IV-FT) foram realizadas com os OE da coleta populacional, com o objetivo de pré-estabelecer parâmetros de controle de qualidade de pureza e identificação.

Foi realizada uma comparação do teor e da composição do OE das folhas frescas e das folhas secas extraídas por hidrodestilação, para analisar se o processo de secagem das folhas alterou qualitativamente e quantitativamente o OE. Os componentes voláteis *in natura* presentes nas folhas frescas foram analisados diretamente por dessorção térmica em cromatógrafo gasosos acoplado a espectrômetro de massas (DT-CG-EM) para analisar os possíveis artefatos formados durante a secagem e extração.

Os dados cromatográficos (CG-EM) referentes a composição do OE (populacional, sazonal e circadiana) foram relacionados a fatores ambientais e climáticos (temperatura, pluviometria, latitude, altitude, radiação ultravioleta, umidade relativa e tipo de solo), agrupando os espécimens por similaridade e análise dos componentes principais através de ferramentas de análises quimiométricas multivariadas, que permitiram o entendimento abrangente e sistematizado dos resultados. Foram realizadas análises estatísticas com os dados de secagem das folhas, teor de OE e com os parâmetros de qualidade.

4.2 Materiais e equipamentos

Aparelho tipo Clevenger: conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010).

Balança analítica: Marte®, modelo AY220 (Max 220g. min 0,01g; d = 0,0001g).

Balança por infravermelho: GEHAKA®, modelo IV 2000.

Banho termostatizado: Tecnal®, modelo TE – 184.

Cromatógrafo Gasoso - Espectrômetro de Massas (CG-EM): Shimadzu®, modelo GCMS QP2010Plus, injetor automático AOC-20i, programa gerenciador GCMS solution Versão 2.50 SU1.

Dessorção Térmica acoplada a Cromatografia Gasosa e Espectrômetro de Massas (DT-CG-EM): Sistema de Dessorção Térmica Shimadzu®, modelo TD-20, programa gerenciador GCMS solution Versão 2.50 SU1.

Estufa de secagem de material vegetal com circulação de ar: Fanem®, modelo 315 SE.

Estufa de secagem e esterilização: Fanem®, modelo 315 SE.

Espectrofotômetro no IV: Bruker®, modelo IV-FT– Alpha Platinum ATR, equipado com o programa OriginPro 9 SR2.

Fases estacionárias utilizadas em CCD:

a) **Placas de alumínio:** Sílica gel 60 (20 x 20 cm, 5 - 40 µm, 0,20 mm), 254 nm, Macherey-Nagel.
b) **Placas de alumínio:** Sílica gel (20 x 20 cm, 5 - 40 µm; 60 Å; 0,25 mm), 254 nm, Sigma-Aldrich®.
c) **Placas de alumínio:** Sílica gel 60 (4 x 8 cm, 5 - 40 µm, 0,25 mm), 254 nm, Macherey-Nagel.
d) **Placas de vidro:** Sílica gel 60 (20 x 20 cm, 5 - 15 µm, 0,25 mm), SorbLine.
e) **Aditivo:** $AgNO_3$ (99,9 %), J.T. Baker®.

Microscópio: Leica®, modelo DMLB AxioCam Icc1 Zeiss.

Micrótomo: Leica®, modelo RM-2125.

Moinho de facas: Tecnal®, modelo TE 148.

Padrões:

a) **óxido de cariofileno** (95,0 %), Acros Organics®.
b) ***E*-cariofileno** (98,5 %), Sigma-Aldrich®.
c) ***α*-humuleno** (96,0 %), Sigma-Aldrich®.

Paquímetro: Paquímetro Digital Inóx, modelo 6150, LEE TOOLS.

Picnômetro: 1 mL.

Polarímetro digital: modelo 341 LC digital - Perkin Elmer®.

Programas:

a) OriginPro®, versão 9.0.0 SR2 b87.
b) Mathlab® 7.10.0 (MathWorks Inc., Natick, USA).
c) Pirouette® 4.0 ver.2 (Infometrix Inc., Bothell, USA).
d) GraphPad Prism® versão 5.01.

Refratômetro Abbe: modelo G, Jena Carl-Zeiss®.

Rotaevaporador: IKA®, modelo DEST KV 05S3, acoplado ao banho de aquecimento Quimis® e banho ultratermostizado Quimis®, modelo Q214M3.

Solventes:

a) **Água ultrapura:** GEHAKA®, obtida em sistema purificador de água, modelo DG 300.
b) **Grau P.A.:** acetato de etila, tolueno, clorofórmio, diclorometano, hexano Quemis® e Synth®.
c) **Grau cromatográfico:** *n*-hexano J.T. Baker®.

Tubo para dessorção térmica: Supelco® (vidro: 0,635 x 8,89 cm).

Ultrassom: Unique®, modelo USC – 2800, 2,5 L, frequência 40 KHz.

4.3 Material vegetal

Este projeto foi desenvolvido mediante autorização da Secretaria do Meio Ambiente, Processo SMA N.º 260108 – 002.955/2016 do Instituto Florestal do Estado de São Paulo. A Certidão no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado consta sob o № de Cadastro AEFB157.

4.3.1 Coletas do material vegetal

As coletas das folhas de *C. sylvestris* foram realizadas nos seguintes locais: I) Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Araraquara-SP (var. s*ylvestris*) – FCF; II) Estação Experimental de Araraquara-SP (var. *lingua)* – EEA, o município de Araraquara encontra-se em uma área de transição entre Cerrado e Mata Atlântica, contendo as duas variedades; III) Parque Estadual “Carlos Botelho” no município de São Miguel Arcanjo-SP (Mata Atlântica, var. *sylvestris*) – CB; IV) Faculdade de Ciências Agronômicas-UNESP, Botucatu-SP (Cerrado, var. *lingua* ou formas intermediárias) – FCA.

A altitude dos locais de coleta é de 663 m (população FCF e EEA), 819 m (população FCA), 800 m (população CB) e conforme Marquete e Vaz (2007), a *C. sylvestris* habita locais com altitude variando do nível do mar até 1800 m. O clima é o Cwa (população FCF, EEA e FCA) – mesotérmico de inverno seco, com temperatura média no mês mais quente acima de 22 ºC e no mês mais frio inferior a 18 ºC. A média anual de precipitação varia de 1.100 a 1.700 mm, com umidade relativa média anual de 71 %, as chuvas são concentradas de outubro a março e os

períodos de seca entre abril a setembro. O clima Cfa (população CB) – mesotérmico úmido com verão quente, com temperatura média no mês mais quente acima de 22 ºC e no mês mais frio acima de 10 ºC. A média anual de precipitação é de 1.395 mm, com chuvas todos os meses e sem estação seca definida, conforme a classificação de Köppen.

Dados referentes às datas de coletas, horário, temperatura, pluviometria, clima, UR (umidade relativa), IUV (índice ultravioleta) e espécimens encontram-se apresentados nas Tabelas 1 a 5 do Apêndice 1.

As folhas frescas coletadas foram armazenadas em recipientes de plástico e mantidas em caixa isotérmica com gelo durante o transporte, sendo que as coletas ocorreram da seguinte forma:

a) Coletas populacionais: 100 g de material vegetal de cada espécimen, em julho e dezembro de 2016 incluindo 10 espécimens de cada população (FCF, CB, EEA e FCA).
b) Coletas sazonais: 100 g de material vegetal de cada espécimen, entre junho/16 – maio/18 incluindo 10 espécimens de cada população (FCF e EEA).
c) Coletas circadianas: 100 g de material vegetal de cada espécimen, a cada 6 h, durante um período de 24 h, em fevereiro e agosto/2017 incluindo 10 espécimens de cada população (FCF e EEA).
d) Coletas para análise do OE das folhas frescas: 30 g de material vegetal de cada espécimen, em janeiro/2017, incluindo 10 espécimens de cada população (FCF e EEA).
e) Coleta de flores: 600 g de flores, em agosto/2016, incluindo 10 espécimens da população EEA.
f) Coleta de frutos: 150 g de frutos verdes, em agosto/2016, incluindo 10 espécimens da população EEA.

4.3.2 Secagem

4.3.2.1 Determinação do tempo de secagem do material vegetal

O tempo de secagem do material vegetal foi determinado em estufa com circulação de ar à 40 ºC, até verificação de massa constante entre 2 pesagens

consecutivas de 10 espécimens separadamente, com 100 g cada (FCF 101 - 110) a cada 6 h, durante 96 h.

4.3.2.2 Perda por secagem do material vegetal

Cerca de 100 g do material vegetal individual de cada espécimen das populações (FCF, EEA, CB e FCA) foram secos em estufa com circulação de ar à 40 ºC por 72 h, pesados e o rendimento do material vegetal seco foi calculado em relação ao material vegetal fresco. Foi realizada a análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.2.3 Perda por dessecação em balança por infravermelho (INFRATEST) da droga vegetal

A droga vegetal foi fragmentada em moinho de facas e 1,0 g de droga vegetal pulverizada de cada um dos 40 espécimens (populações FCF, EEA, CB e FCA) foi submetida a aquecimento (105 ºC) através de radiação infravermelha por 1 min, estando a balança por infravermelho pré-aquecida. Os resultados foram determinados através da relação entre massa inicial e final da droga vegetal, em % (m/m) (Brasil, 2010). Foi realizada a análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4 Análises botânicas

4.4.1 Preparo das exsicatas

As amostras dos espécimens coletados contendo folhas, ramos e órgãos reprodutivos (flores e/ou frutos) foram prensadas e secas em estufa com circulação de ar, à 40 ºC por 10 dias. As exsicatas foram montadas em cartolina branca 40,6 x 27,5 cm (Oliveira e Akisue, 2009; Oliveira *et al.*, 2014) e identificadas pelo Prof. Dr. Luís Vitor Silva do Sacramento, em seguida enviadas em duplicata para herbário, com os dados de coleta (data, local, nome científico, variedade, coordenadas geográficas e descrição do habitat).

As exsicatas das populações FCF e FCA foram enviadas ao Herbário Científico do Estado “Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo” do Instituto de Botânica do Governo do Estado de São Paulo (registradas como FAC); e as exsicatas das

populações EEA e CB enviadas ao Herbário “D. Bento Pickel” (registradas como SPSF) conforme autorização de pesquisa em área de preservação. Os dados de registros e as coordenadas de GPS (Global Positioning System) são apresentados nas Tabelas 4 a 7.

Tabela 4. Códigos de registros das exsicatas FCF 101 – 110, depositadas no Herbário do Instituto Botânico do Estado de São Paulo.

Exsicatas FCF	Latitude Sul	Longitude Oeste	Variedade	Registro (FAC)
101	21º48’88’’3	48º12’12’’6	*sylvestris*	101
102	21º48’87’’1	48º12’13’’3	*sylvestris*	102
103	21º48’85’’5	48º12’09’’9	*sylvestris*	103
104	21º48’83’’3	48º12’09’’6	*sylvestris*	104
105	21º48’97’’5	48º11’90’’1	*sylvestris*	105
106	21º48’97’’2	48º11’91’’0	*sylvestris*	106
107	21º48’98’’1	48º11’90’’9	*sylvestris*	107
108	21º48’98’’5	48º11’87’’7	*sylvestris*	108
109	21º48’98’’7	48º11’86’’7	*sylvestris*	109
110	21º48’98’’9	48º11’86’’1	*sylvestris*	110

Tabela 5. Códigos de registros das exsicatas EEA 201 – 210, depositadas no Herbário Dom Bento Pickel.

Exsicatas EEA	Latitude Sul	Longitude Oeste	Variedade	Registro (SPSF)
201	21º44’45’’3	48º10’40’’1	*lingua*	51.212
202	21º44’16’’0	48º10’55’’8	*lingua*	51.213
203	21º44’16’’6	48º10’56’’7	*lingua*	51.214
204	21º44’16’’9	48º10’56’’2	*lingua*	51.215
205	21º44’61’’6	48º10’44’’0	*lingua*	51.818
206	21º44’63’’4	48º10’51’’7	*lingua*	51.211
207	21º44’63’’3	48º10’55’’9	*lingua*	51.210
208	21º44’26’’5	48º10’77’’1	*lingua*	51.209
209	21º44’14’’6	48º10’81’’3	*lingua*	51.207
210	21º44’16’’3	48º10’80’’4	*lingua*	51.208

Tabela 6. Códigos de registros das exsicatas FCA 301 – 310, depositadas no Herbário do Instituto Botânico do Estado de São Paulo.

Código FCA	Latitude Sul	Longitude Oeste	Variedade*	Registro (FAC)
301	22º50'91''4	48º25'51''4	*sylvestris*	301
302	22º50'93''7	48º25'51''2	*sylvestris*	302
303	22º50'93''9	48º25'50''6	*sylvestris*	303
304	22º50'93''7	48º25'51''8	*sylvestris*	304
305	22º50'22''5	48º25'93''7	*sylvestris*	305
306	22º50'92''4	48º25'82''2	*sylvestris*	306
307	22º50'94''6	48º25'83''8	*sylvestris*	307
308	22º50'94''8	48º25'84''6	*sylvestris*	308
309	22º50'93''0	48º25'84''7	*sylvestris*	309
310	22º50'92''2	48º25'85''8	*sylvestris*	310

*apresentam características morfológicas externas que podem ser atribuídas a formas intermediárias entre as duas variedades

Tabela 7. Códigos de registros das exsicatas CB 401 – 410, depositadas no Herbário Dom Bento Pickel.

Código CB	Latitude Sul	Longitude Oeste	Variedade	Registro (SPSF)
401	24º3'46''8	47º59'58''8	*sylvestris*	51.816
402	24º3'58''4	47º59'45''4	*sylvestris*	51.817
403	24º3'59''6	47º59'46''3	*sylvestris*	51.819
404	24º3'58''8	47º59'46''3	*sylvestris*	51.820
405	24º3'42''8	47º59'80''5	*sylvestris*	51.821
406	24º3'69''9	47º59'57''4	*sylvestris*	51.822
407	24º3'71''3	47º59'51''5	*sylvestris*	51.823
408	24º3'72''8	47º59'51''3	*sylvestris*	51.824
409	24º3'77''2	47º59'46''4	*sylvestris*	51;825
410	24º3'84''0	47º59'52''1	*sylvestris*	51.826

4.4.2 Análise macroscópica

Os espécimens de *C. sylvestris* (populações FCF, EEA, CB e FCA) foram analisados quanto as seguintes características: comprimento x largura das folhas (duplicata) no terço médio utilizando paquímetro digital, altura (estimada), diâmetro do caule na altura do peito (DAP) e a forma do tronco (Evans, 2002; Raven *et al.*, 2014). Foram realizadas análises estatísticas através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4.3 Análises anatômicas das folhas

As folhas do terço médio (3º, 4º e 5º nós) dos espécimens FCF 101, 102 e 107; EEA 201, 206 e 209; FCA 302, 305 e 310; CB 403, 406 e 407 foram coletadas e armazenadas no fixador Trump por 48 h e em seguida em solução hidroetanólica 50 %.

4.4.3.1 Análise anatômica dos cortes paradérmicos

As análises microscópicas dos cortes paradérmicos para visualização da camada de paliçada foram realizadas com auxílio de uma lâmina de aço realizando cortes da epiderme superior (adaxial). Os cortes adaxiais foram transferidos para um vidro de relógio contendo água desionizada, depois para outro vidro de relógio com hipoclorito de sódio (clarificação), por 5 min, seguido de lavagem com água desionizada. Foram preparadas lâminas com cortes sem clarificação para comparação.

Os cortes paradérmicos da epiderme adaxial para verificação da camada paliçádica foram corados em vidro de relógio contendo solução de azul de astra, por 5 min, lavados com água deionizada em outro vidro de relógio e transferidos para a lâmina de vidro.

a) Índice de paliçada

O número médio de células paliçádicas de cada espécimen foi determinado através da contagem de 5 grupos de células epidérmicas, sendo que cada grupo contém 4 células epidérmicas, utilizando Microscópio Zeiss® com aumento de 40 x. Foram incluídas na contagem somente as células paliçádicas com mais da metade cobertas pelas células epidérmicas (Costa, 2001; Evans, 2002).

b) Análise de estômatos

Os estômatos das superfícies adaxial e abaxial de cada espécimen foram analisados em Microscópio Zeiss® com aumento de 40 x (Costa, 2001; Evans, 2002).

4.5 Análises de solos

Foram coletados 500 g de solo entre 10 a 20 cm abaixo da superfície, de cada espécimen coletado das populações FCF, EEA, CB e EEA, conforme Freitas *et al.* (2014). As amostras de solo de cada população foram homogeneizadas e realizaram-se as seguintes análises químicas: determinação do pH, matéria orgânica (MO), fósforo (P) resina, potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), H + Al (acidez potencial), SB (soma das bases), CTC (capacidade de troca de cátions), V % (saturação por bases), enxofre (S SO^{2-}_4), alumínio (Al^{3+}) e sódio (Na^+); e análises granulométricas: argila, silte (limo), areia fina e areia grossa, conforme Embrapa (2013).

4.6 Extração e determinação do teor de óleo essencial

Os OE foram extraídos por hidrodestilação por 4 h em aparelho tipo Clevenger farmacopeico (Brasil, 2010) acoplado ao condensador com circulação de água resfriada, utilizando 30 g (análises de variabilidade química) de folhas secas, em balão de fundo redondo de 1,0 L contendo 0,5 L de água ultrapura. Foram efetuadas extrações de OE utilizando 30 g de folhas frescas das populações FCF e EEA, com a finalidade de comparar com o teor e a composição química do OE das folhas secas. Realizaram extrações de OE utilizando 600 g de flores e 150 g de frutos da população EEA. O rendimento de OE foi calculado em % de volume de OE por massa de folhas secas (ou frescas), equação 1.

Equação 1

$$\%\ \mathrm{OE} = \frac{\text{Volume de OE}}{\text{massa DV}}\ \mathrm{X}\ 100$$

% OE: teor de OE

V: volume de OE (mL)

massa: massa da droga vegetal (g)

As folhas frescas foram coletadas no mesmo dia em que foram coletadas as folhas para extração do material seco. As extrações de OE das folhas frescas foram realizadas nos mesmos dias das coletas. Foram realizadas análises estatísticas do teor do OE através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.7 Determinação dos parâmetros físicos do óleo essencial

Foram realizadas análises estatísticas dos dados de índice de refração, rotação óptica específica e densidade relativa através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.7.1 Índice de refração

A determinação do valor foi efetuada utilizando refratômetro Abbe (Carl-Zeiss®, Jena Modelo G) previamente calibrado com água destilada, à 25 ± 0,5 Cº, com luz de sódio em λ 589,3 nm (raia D). Os ensaios (triplicata) foram realizados com 20 µL de OE. Os resultados de índice de refração foram expressos como $n_{589,3}^{25}$ (Brasil, 2010).

4.7.2 Rotação óptica específica

Os valores foram determinados utilizando polarímetro digital (modelo 341 LC digital - Perkin Elmer®), com raia D de sódio em λ 589 nm, caminho óptico de 1 dm, cubeta de 1,0 mL, temperatura de 34,2 ± 0,1 °C (Brasil, 2010). As amostras de OE foram diluídas em hexano (grau HPLC) na concentração de 1,0 mg/mL (triplicata). Como branco foi utilizado o hexano grau HPLC. A rotação óptica específica foi calculada conforme a equação 2.

Equação 2

$$[\alpha]_{\lambda}^{\mathrm{T}} = \frac{\alpha}{\mathrm{c} \cdot \mathrm{l}}$$

[α]: rotação óptica específica
α: rotação óptica observada
l: caminho óptico 1 dm (10 cm)
c: 1 mg/mL (0,001 g/mL)

4.7.3 Densidade relativa

A densidade relativa foi determinada utilizando um picnômetro previamente verificado com água ultrapura, à 20 ºC, sendo os resultados expressos como d_{20}^{20}. As amostras de OE (triplicata) foram inseridas no picnômetro (1 mL) e pesadas. O

resultado foi calculado através da razão entre a massa das amostras de OE, pela massa de igual volume da água (Brasil, 2010).

4.8 Análises cromatográficas e espectroscópicas do óleo essencial

4.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O OE das populações FCF, EEA, CB e FCA coletadas em Jul e Dez/16 (40 µg/mL, hexano) foram analisadas por CCD utilizando como padrões o *α*-humuleno, *E*-cariofileno e óxido de cariofileno (10 µg/mL, hexano). O método foi desenvolvido em placas de alumínio cobertas com sílica gel 60 Macherey-Nagel® (20 x 20 cm, 5-40 µm; 0,20 mm) com indicador de fluorescência 254 nm, com as seguintes condições cromatográficas: FM 1: hex: AcOEt 85:15 (v/v), aplicando 12 µL (amostras) e 6 µL (padrões); FM 2: hex, aplicando 4 µL (amostras e padrões). Distância de eluição (D): 19 cm. O revelador utilizado foi o ácido sulfúrico 10 % (110 ºC, 10 min). As amostras de OE também foram analisadas em placas de vidro cobertas com sílica gel 60 SorbLine® (20 x 20 cm, 5-15 µm, 0,25 mm) contendo 2,5 e 7,5 % de $AgNO_3$.

O perfil cromatográfico foi representado pelo número e cores das bandas cromatográficas e os valores dos fatores de retenção ($R_{f,}$), equação 3.

Equação 3

$$\mathrm{Rf} = \frac{\mathrm{ds}}{\mathrm{dfm}}$$

R_f: fator de retenção

d_s: distância percorrida pela substância ou padrão

d_{fm}: distância percorrida pela fase móvel desde o ponto de aplicação

4.8.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

As análises das amostras dos OE foram realizadas em um sistema Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu® Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i e com fonte de ionização por elétrons operando em 70 eV. A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica

fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de filme; 5 % de difenilsiloxano e 95 % de dimetilpolisiloxano). Foi utilizado gás Hélio (99,999 %) como gás de arraste, a um fluxo de 1,03 mL/min. A temperatura do injetor e da fonte de íons foi de 250 ºC. As amostras foram preparadas em *n*-hexano grau cromatográfico (J.T. Baker®), na concentração de 3,0 µL/mL, e o volume de injeção da amostra foi de 1,0 µL, modo split (1:10). A temperatura do forno foi programada de 60 ºC à 250 ºC a uma velocidade de 3 ºC/min, por 80 min. Os espectros de massas foram registrados em um intervalo de varredura de 0,5 s na faixa de massas de 40 a 600 Da (Adams, 2007).

Os componentes presentes nas amostras dos OE foram identificados com base em seus índices de retenção relativos a uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C40, Sigma Aldrich®), nas mesmas condições das amostras dos OE. Em seguida, determinou-se o índice de retenção (IR) de cada componente químico como descrito na literatura (Van Den Dool e Kratz, 1963), realizou a identificação através dos espectros de massas e a quantificação foi obtida por normalização da área. Os espectros e a fragmentação dos componentes do OE foram comparados com os espectros existentes nas bibliotecas espectrais Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1,2 do sistema de dados do CG-EM, bem como os seus padrões de fragmentação, os quais foram comparados com os dados da literatura (Wiley 7, NIST 08 e FFNSC).

4.8.3 Dessorção térmica acoplada a cromatografia gasosa e espectrômetro de massas (DT-CG-EM)

As folhas dos espécimens das populações FCF e EEA foram embaladas isoladamente em plástico laminado, identificadas e armazenadas em gelo imediatamente após a coleta e armazenadas em refrigerador até realização das análises. Amostras das folhas de *C. sylvestris* (0,5 mm^2) foram colocadas em tubo (0,63 x 8,89 cm, Supelco®) e foi inserida lã de vidro nas extremidades.

Os componentes voláteis foram concentrados por 5 min, 250 ºC, com fluxo de He (20 mL/min) em um Sistema de Dessorção Térmica Shimadzu® (modelo TD-20), acoplado ao sistema GC Shimadzu® (modelo QP2010) seguindo os parâmetros citados no item 4.8.2. Foi injetado uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C40, Sigma Aldrich®) nas mesmas condições das amostras, identificando as estruturas químicas conforme item 4.8.2. Foram cortados 10 cm de cada lado da coluna cromatográfica.

4.8.4 Espectroscopia no IV-FT

Os espectros de IV-FT foram obtidos no modo de reflexão atenuada (ATR), na faixa de 4000-500 cm^{-1}, com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} em espectrofotômetro Alpha Platinum ATR Brucker®, com 20 µL do OE (populacional) utilizando o programa OriginPro 9 SR2 para o tratamento dos dados.

4.9 Análises quimiométricas

Os dados gerados na cromatografia gasosa foram organizados em matrizes XIxJ, onde, I são as linhas (variáveis) e J as colunas (amostras). As matrizes foram formadas pelos dados cromatográficos: variáveis t_R (80 min) e amostras intensidade absoluta (mAU), totalizando 9120 variáveis e o número de colunas variou de acordo com as análises, totalizando 80, 480 e 160 colunas, respectivamente para as amostras das análises populacional, sazonal e circadiana, sendo exportadas no formato ASCII, organizados em planilhas no Microsoft® Excel® 97-2003 (Microsoft®, USA) e compilados em planilhas no OriginPro 8.5 (OriginLab, EUA). O pré-tratamento dos dados consistiu em normalizar, centrar na média e auto escalar os dados e análise de componentes principais (PCA) foi realizada no software Pirouette® 4.0 ver.2 (Infometrix Inc., Bothell, USA).

4.9.1 Alinhamento cromatográfico

O processamento dos dados consistiu no alinhamento dos picos cromatográficos do cromatograma completo, utilizando o algoritmo COW – Correlation Otimized Warning –*(*http://www.models.kvl.dk/users/rasmus/*)*, através do software Mathlab® 7.10.0 (MathWorks Inc., Natick, USA), alinhando os dados cromatográficos (Nielsen *et al.*, 1998; Tomasi *et al.*, 2004),.

4.9.2 Análise quimiométrica populacional

As análises multivariadas dos componentes principais (PCA) populacional (populações FCF, EEA, CB e FCA) foram realizadas utilizando matrizes (179 x 80) representadas por 179 variáveis e 80 amostras com o processamento dos dados centrado na média.

4.9.3 Análise quimiométrica sazonal

As PCA sazonais foram realizadas utilizando matrizes (187 x 478) representadas por 187 variáveis e 478 amostras com o processamento dos dados auto escalado. As PCA individuais das populações FCF e EEA foram realizadas com 240 amostras cada, entretanto, foram subtraídas 2 amostras da população EEA devido os cromatogramas não apresentarem picos das amostras.

4.9.4 Análise quimiométrica circadiana

Cada uma das PCA circadianas (FCF: Fev e Ago; EEA: Fev e Ago) foram realizadas utilizando matrizes (165 x 40) representadas por 165 variáveis e 40 amostras cada com o processamento dos dados auto escalado, contudo, na PCA da população FCF Ago 2 amostras foram subtraídas devido os cromatogramas não apresentarem picos das amostras.

C. sylvestris var. *sylvestris*, Cerrado – Araraquara-SP. Fonte: O Autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coletas e secagem do material vegetal

5.1.1 Dados das coletas

O período de floração variou entre maio a setembro para a população FCF e de julho a outubro para a população EEA, enquanto a época de frutificação foi de agosto a outubro nas populações FCF e EEA (Tabelas 1 e 2, Apêndice 1). Os períodos de floração e frutificação estão dentro dos períodos descritos na literatura (Absy e Scavone, 1973; Klein e Sleumer, 1984; Torres e Yamamoto, 1986; Backes e Irgang, 2002; Lorenzi, 2002; Marquete e Vaz, 2007; Imatomi *et al.*, 2009).

Algumas observações de campo durante as coletas foram: o espécimen FCF 102 apresentou ferrugem nas folhas, enquanto os espécimens FCF 104 e 108 sofreram ataques de herbívoros. Devido a queimadas o espécimen EEA 204 ficou com folhas secas em agosto e sem folhas em setembro/2017. Estes eventos podem interferir na composição química do OE.

5.1.2 Determinação do tempo de secagem do material vegetal

A determinação do tempo de secagem com os espécimens FCF 101 - 110 demonstrou que 72 h de secagem foram suficientes, pois não apresentou variação na massa das folhas de *C. sylvestris* até o final das 96 h de aferição.

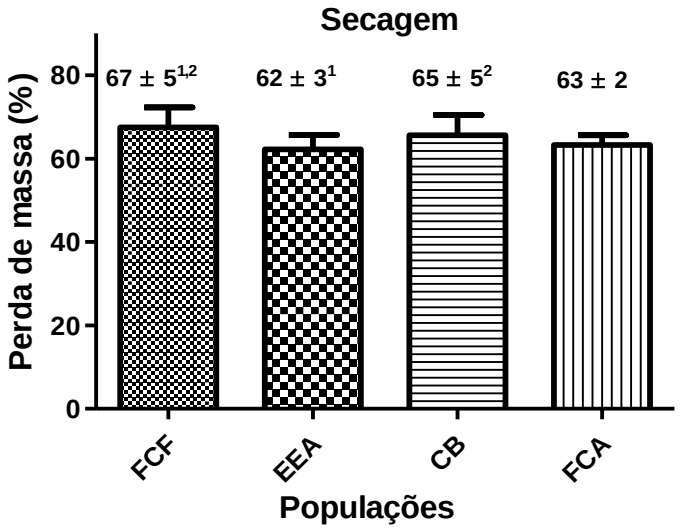
A secagem reduz o peso e volume do material vegetal eliminando a água, evitando o crescimento microbiano (fungos e bactérias) e reações de degradação (hidrólise). Geralmente a secagem é realizada em temperaturas abaixo de 60 ºC, por 5 - 7 dias (Simões *et al.*, 2017), entretanto, os resultados do ensaio por perda por secagem mostraram massa constante após 3 dias de secagem em estufa com circulação de ar, à 40 ºC. Portando, optou-se por secar o material vegetal por 72 h.

5.1.3 Perda por secagem do material vegetal

A perda de massa após 72 h de secagem das populações FCF, EEA, CB e FCA variou entre 62,2 a 67,4 % (m/m) para as 4 populações (Figura 11). De acordo com Oliveira *et al.* (2014), o teor de umidade para folhas frescas em

geral varia entre 60 – 98 %, portanto a perda por dessecação não representa a umidade total das folhas, pois ainda há umidade residual após a secagem. Por outro lado, Bueno (2015) observou que a perda por secagem entre Ago/12 a Jul/13 variou de 47,5 a 60,0 % na *C. sylvestris* var. *sylvestris* e de 47,5 a 60,7 % na var. *lingua*. Além do mais, a var. *sylvestris* apresentou maior teor de água em 9 dos 12 meses avaliados por Bueno (2015), assim como os espécimens da var. *sylvestris* (populações FCF e CB), os quais apresentaram maior teor de umidade que a var. *lingua* (população EEA), demonstrando que a var. *sylvestris* possui teor de umidade mais elevado. Os valores de perda por secagem deste estudo foram maiores do que os obtidos por Bueno (2015), portanto, o método de secagem à 55 ºC por 24 h pode não ser tão eficiente quanto o método utilizado (40 ºC, 72 h).

Figura 11. Perda de massa (%) na secagem em estufa de folhas de *C. sylvestris*. [1]FCF e EEA são estatisticamente diferentes, $p < 0,05$; [2]FCF e CB são estatisticamente iguais, $p < 0,05$.

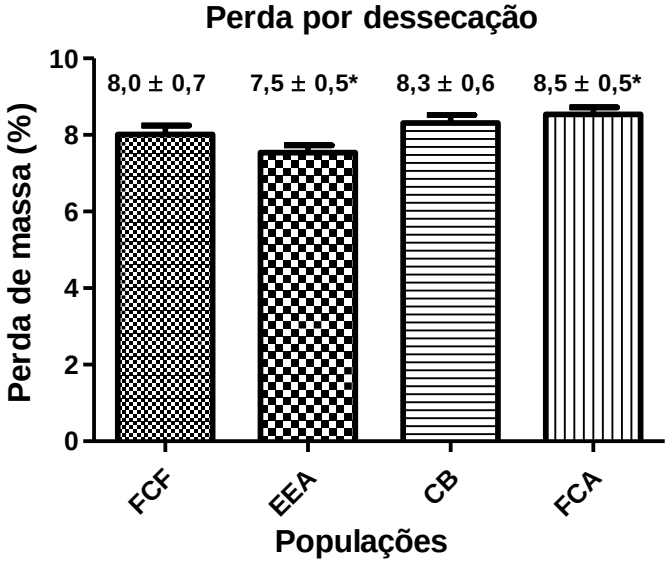


5.1.4 Perda por dessecação em balança por infravermelho (INFRATEST) da droga vegetal

A secagem em estufa eliminou parcialmente a umidade, portanto, o teor de água residual foi determinado visando a conservação da droga vegetal durante a armazenagem. O teor de umidade médio da DV das populações (FCF, EEA, CB e FCA) variou entre 7,5 a 8,5 % (m/m) (Figura 12), semelhante aos encontrados por Pierri (2013) e Carvalho (2015) de 9,5 e 6,3 %,

respectivamente. Os valores obtidos estão em conformidade com Simões *et al.* (2017), que menciona o valor máximo de 14 % de umidade para que os componentes presentes nas drogas vegetais não degradem ou apresentem contaminação biológica, degradação enzimática e/ou químicas durante o armazenamento.

Figura 12. Perda por dessecação (%) da DV em balança por infravermelho de folhas de *C. sylvestris*. *EEA e FCA são estatisticamente diferentes, $p < 0,05$.



5.2 Análises Botânicas

5.2.1 Preparo das exsicatas

As folhas das populações FCF e CB (var. *sylvestris*) são semelhantes (Figura 13A e B), contudo, elas diferem das folhas das população EEA e a população FCA (var. *lingua*) apresentou folhas com características das var. *sylvestris* e var. *lingua* os quais são análogas (Figura 13C e D). A Figura 14 apresenta as exsicatas dos espécimens representativos de cada população.

Figura 13. Amostras de folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (A: FCF 103 e B: CB 401) e *C. sylvestris* var. *lingua* (C: EEA 201 e D: FCA 304). Fonte: O Autor.

Figura 14. Exsicatas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (A: FCF 105 e B: CB 407) e *C. sylvestris* var. *lingua* (C: EEA 207 e D: FCA 310). Fonte: O Autor.

5.2.2 Análise macroscópica

As folhas de *C. sylvestris* apresentaram margem serreada com dimensões máximas na população FCF (13,5 x 3,5 cm), seguido das

populações CB (11,8 x 3,0 cm) e FCA (11,5 x 3,2 cm), enquanto, que a população EEA apresentou os menores valores (8,3 x 2,4 cm). De acordo com Torres e Yamamoto (1986) e Marquete (2001), o tamanho médio das folhas de *C. sylvestris* é cerca de (4,0-)5,0-12,0(-14,0) x (1,0-)2,0-3,5(-4,0) cm, sendo que os valores de dimensões observados estão dentro destas faixas de comprimento e largura.

Klein e Sleumer (1984) classificaram as folhas da var. *sylvestris* como folhas geralmente oblongas, o que corresponde as folhas das populações FCF e CB, enquanto as folhas var. *lingua* são classificadas como folhas mais ou menos ovadas a oblongo-ovadas, correspondendo as folhas da população EEA. As folhas da população FCA apresentam as duas formas, podendo ser classificadas como uma população com espécimens intermediários, conforme definição de Sleumer (1980).

As folhas da população CB estavam com fungos em ambas as coletas populacionais, que pode ser devido ao clima mais úmido e à maior pluviosidade, enquanto nas demais populações não foram observadas folhas com fungos. As análises estatísticas indicaram que o comprimento das folhas das populações FCF, CB, EEA e FCA são estatisticamente semelhantes $p < 0,05$, entretanto a largura das folhas das populações FCF, CB e FCA são estatisticamente diferentes das folhas da população EEA, $p > 0,05$. Os valores médios (duplicata) de comprimento x largura (cm) das folhas foram de 9,0 ± 1,7 x 2,8 ± 0,4 para a população FCF; 8,7 ± 1,4 x 2,8 ± 0,3 para a população CB; 7,1 ± 0,7 x 2,3 ± 0,3 para a população EEA e 9,6 ± 1,2 x 2,7 ± 0,5 para a população FCA, porém foram observadas variações nas dimensões das folhas de um mesmo espécimen tanto nas populações EEA e CB. O valor médio (comprimento x largura) das folhas de *C. sylvestris* tende a diminuir entre idade jovem e a adulta, sendo que segundo a literatura espécimens jovens apresentaram valores médios de 9,9 ± 0,9 x 3,9 ± 0,3 cm e espécimens adultos com 8,4 ± 1,1 x 2,7 ± 0,3 cm (Vieira *et al.*, 2014).

A variação no comprimento entre as menores e as maiores folhas foi maior nas populações FCA, CB e FCF (4,0 a 6,5 cm), enquanto na população EEA a diferença foi de 2,3 cm. Em relação a largura, a diferença foi próxima entre todas as populações.

Os espécimens de *C. sylvestris* são árvores com alturas máximas estimadas de 8,0 m na população FCF, seguido da população CB com 6,0 m, enquanto as populações EEA e FCA atingiram no máximo 5,0 m. A população FCF é formada por espécimens mais altos, entretanto, a população CB com 4,5 m tem a maior média de altura, seguida pelas populações FCF com 4,0 m, FCA com 3,6 m e EEA com 3,4 m. os espécimens de *C. sylvestris* podem ser encontrados como subarbusto a árvore com alturas variando de 1,5-15,0(-18,0) m (Klein e Sleumer, 1984; Torres e Yamamoto, 1986). A altura varia conforme a idade da planta e conforme Vieira *et al.* (2014), espécimens jovens apresentaram altura média de 1,3 ± 0,2 m e espécimens adultos com altura média de 10,3 ± 0,6 m.

Na população EEA foram encontrados os troncos com maior diâmetro (51,0 cm), seguido da população FCA (45,0 cm), FCF e CB com 40,0 cm. O DAP médio das populações CB (30,2 ± 7,5 m), EEA (29,0 ± 13,6 m) e FCA (21,1 ± 9,3 m) são estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$), enquanto que a população FCF (16,8 ± 9,3 m) apresentou valores de DAP estatisticamente diferentes das populações CB e EEA $p > 0,05$, porém, semelhantes a população FCA $p < 0,05$. De acordo com Vieira *et al.* (2014), o valor médio do DAP de espécimens de *C. sylvestris* é de 1,3 ± 0,2 cm (estágio jovem) e acima de 12,9 ± 2,0 cm (estágio adulto).

Os troncos de *C. sylvestris* são retos ou tortuosos e nos espécimens da população EEA foi possível observar troncos com cascas cinzas, profundamente fissuradas, ± 5,0 cm (Figura 15 A e B), diferentemente dos troncos das populações FCF, CB e FCA com cascas cinzas, finas ou pouco fissuradas, ± 0,5 cm (Figura 15 C e D). A var. *lingua* é mais comum no Cerrado (Sleumer, 1980; Klein e Sleumer, 1984; Claudino *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2016) e os troncos com cascas mais espessas podem ser uma forma de resistência contra as queimadas típicas das regiões de Cerrado.

Figura 15. Troncos dos espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua* (A: EEA 202 e B: EEA 209) com cascas profundamente sulcadas e *C. sylvestris* var. *sylvestris* com troncos lisos (C: FCF 105 e D: FCF 107). Fonte: O Autor.

A população FCF (var. *sylvestris*) é composta por espécimes com maiores alturas e tamanho de folhas, enquanto a população EEA (var. *lingua*) demonstrou ter folhas menores, troncos mais espessos e rugosos e menores

alturas (Tabelas 1 a 4 Apêndice 2). Como não foi possível estabelecer as idades dos espécimens, não é possível afirmar que os espécimens da var. *sylvestris* são mais altos e têm folhas maiores e que os espécimens da var. *lingua* têm as folhas menores, porém, através da análise visual dos troncos foi possível diferenciar as variedades. Ao comparar com Vieira *et al.* (2014), é possível afirmar que os espécimens de *C. sylvestris* avaliados estão no estágio adulto, conforme os valores médios de altura e DAP.

A morfologia do tronco permitiu classificar a maioria dos espécimens da população EEA (exceto 4 e 8) como var. *lingua*, enquanto os espécimens das populações FCF (exceto 4, 8 e 9) podem ser classificados como var. *sylvestris*. Os espécimens da população FCA podem ser classificados como var *sylvestris* conforme a morfologia dos troncos, entretanto os espécimens 2, 3 e 4 (assim como o 4 e 8 da população EEA) apresentaram folhas com ampla variação nas dimensões, que poderiam ser classificadas como var. *sylvestris* ou var. *lingua*, contudo, como as dimensões das folhas não apresentaram diferenças estatísticas não se pode usar o tamanho das folhas como parâmetro para determinar a variedade, porém, sugere-se que espécimens que não puderem ter a variedade classificada pela morfologia do tronco e apresente folhas com características de ambas as variedades, sejam classificadas com uma variedade intermediaria de *C. sylvestris*.

5.2.3 Análises anatômicas das folhas

5.2.3.1 Índice de paliçada e Análise de estômatos

Nestas análises foram utilizados 3 espécimens de cada população. O índice de paliçada das populações FCF, CB e FCA foram de 4,1, 4,2 e 3,9 respectivamente e as células apresentam formato retilíneo, enquanto o valor da população EEA foi de 2,9 (Tabela 8) e as células apresentam formato curvilíneo. Os resultados das populações FCF, CB e FCA foram semelhantes aos da *C. sylvestris* var. *sylvestris* (3,9 ± 0,2) e da população EEA coincidiu com a *C. sylvestris* var. *lingua* (2,8 ± 0,3), segundo os dados de Claudino *et al.* (2013). Os resultados indicam que os espécimens analisados das populações FCF, CB e FCA são *C. sylvestris* var. *sylvestris* e da população EEA são *C. sylvestris* var. *lingua*.

Tabela 8. Índice de paliçada de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA. *EEA apresentou diferença estatística para as demais populações $p < 0,05$.

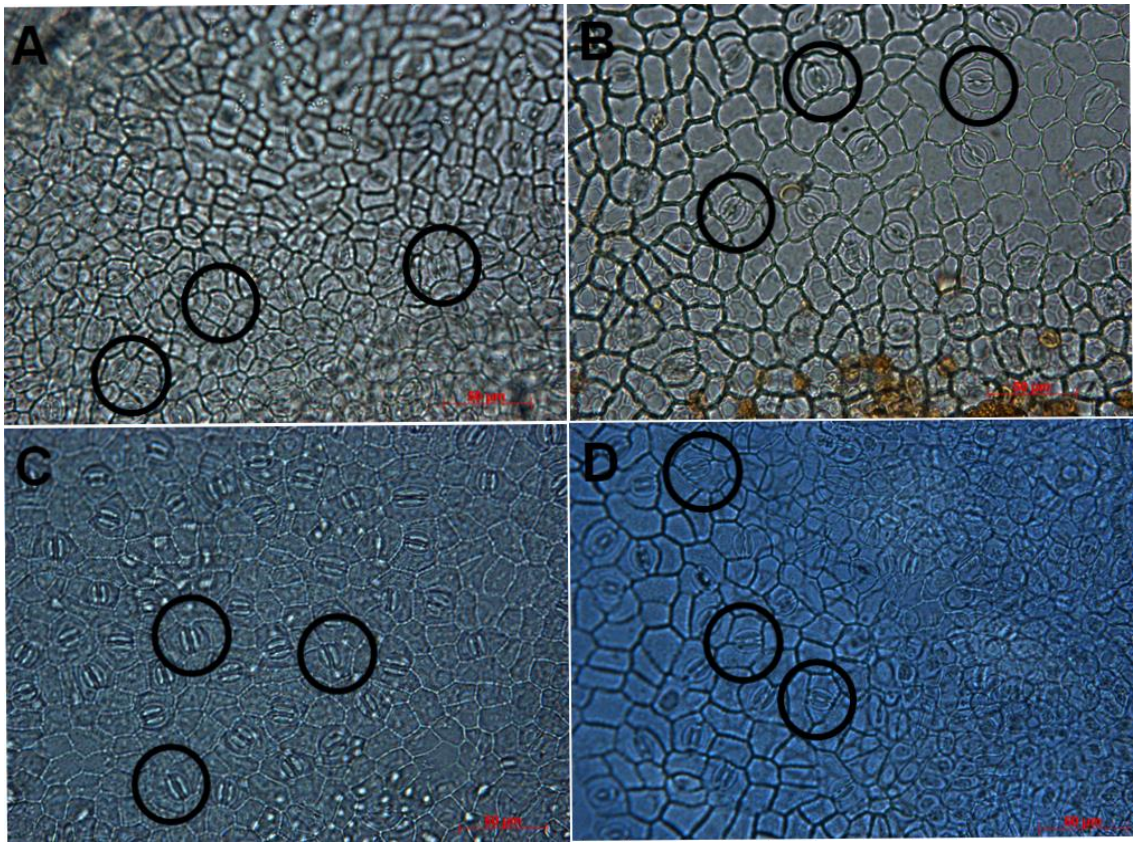
População	Média (±)[1]
FCF	4,3 ± 0,5
EEA*	2,9 ± 0,4
CB	4,2 ± 0,4
FCA	3,9 ± 0,5

[1]Contagem de células paliçádicas de 5 grupos de células epidérmicas (cada grupo representado por 4 células epidérmicas), para cada espécimen.

Não foi possível observar diferenças significativas no índice de estômatos entre as superfícies abaxiais nos espécimens de *C. sylvestris* da var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*, porém, entre as superfícies adaxiais foi possível diferenciar as variedades através da presença de estômatos na var. *lingua* e ausência na var. *sylvestris*, pois de acordo com Claudino *et al.* (2013), índice de estômatos não é relevante para diferenciar as var. de *C. sylvestris*, portanto, a presença ou ausência de estômatos na superfície adaxial.

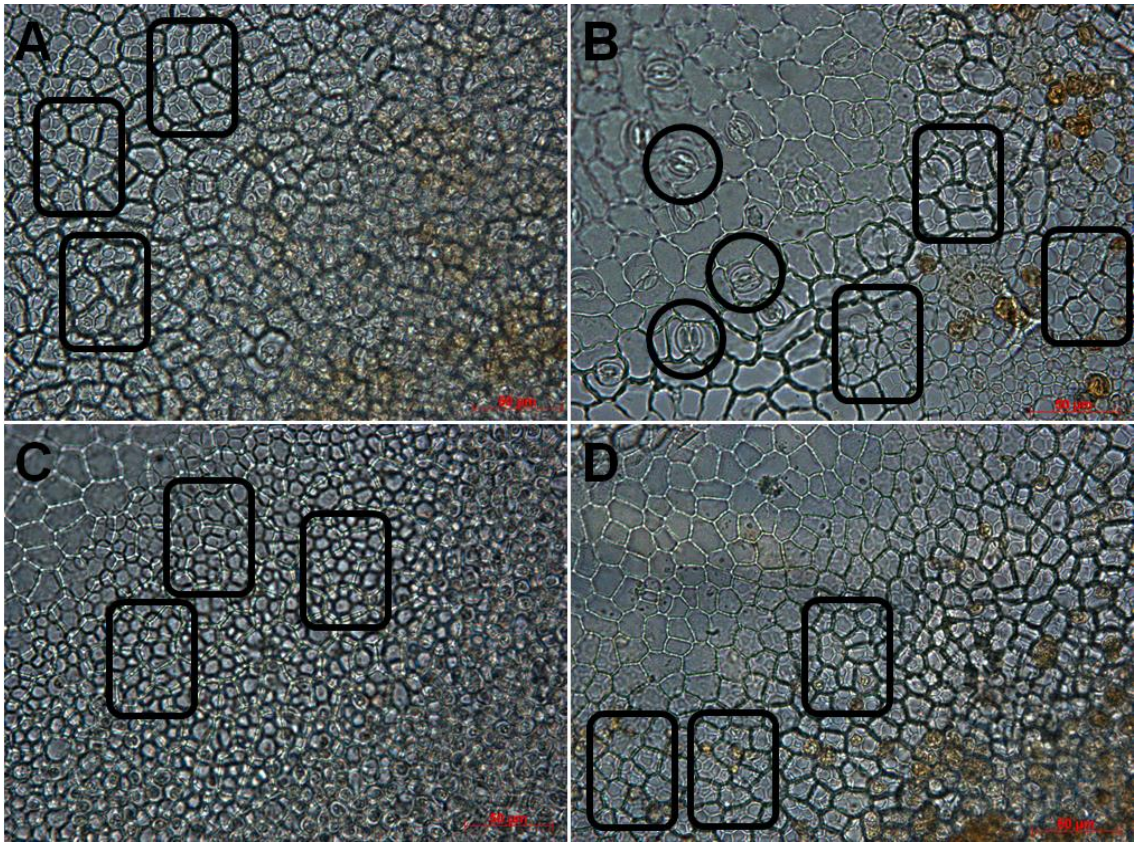
Na superfície das folhas de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA (Figura 16) foram observados estômatos e como a diferença no índice de estômatos é pequena, não foi possível diferenciar as variedades.

Figura 16. Superfície abaxial das folhas de *C. sylvestris*. São destacados nos círculos os estômatos do tipo paracítico dos espécimens das populações; A) FCF, B) EEA, C) CB e D) FCA.



Na superfície adaxial foram observadas células estomáticas nas folhas da *C. sylvestris* da população EEA, enquanto nas folhas das populações FCF, CB e FCA não foram observadas células estomáticas (Figura 17), indicando que nos espécimens da var. *lingua* (população EEA) as folhas são anfiestomáticas e na var. *sylvestris* (populações FCF, CB e FCA) as folhas são hipoestomáticas. Foi observado que nas populações FCF, CB e FCA a quantidade de células paliçádicas foi maior que na população EEA, conforme o índice de paliçada.

Figura 17. Superfície adaxial das folhas de *C. sylvestris*. São destacados nos círculos os estômatos e nos retângulos as células epidérmicas e paliçádicas dos espécimens das populações; A) FCF, B) EEA, C) CB e D) FCA.



O índice de paliçada e análise de estômatos apresentaram resultados coerentes com Claudino *et al.* (2013), indicando que podem ser utilizados para diferenciar as variedades de *C. sylvestris*.

Não foram realizadas análises dos cortes transversais devido os dados de Claudino *et al.* (2013) descreverem que não há diferenças entre as variedades de *C. sylvestris*.

5.3 Análises de solos

As populações FCF e EEA estão localizados no mesmo município, entretanto, os solos apresentaram diferenças na textura, assim como os demais solos analisados, CB e FCA, o que pode influenciar de maneira qualitativa e quantitativa na produção dos metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Os solos das populações FCF, EEA e CB são definidos como latossolo vermelho-amarelo e o solo da população FCA como latossolo

vermelho distrófico típico, conforme o Sistema Brasileiro de Classificação de solos (Embrapa, 2013).

A análise da textura classifica o solo através da granulometria, utilizando o triângulo dos solos como parâmetro de classificação. Dessa maneira, os solos das populações EEA, CB e FCA foram definidos como franco arenoso e o solo da população FCF foi definido como franco argiloso arenosos. Solos arenosos, como as populações EEA, CB e FCA, são ácidos e com baixas quantidades de matéria orgânica (Silva *et al.*, 2011). Os solos argilosos contêm elementos químicos essenciais ao desenvolvimento das plantas (Burle *et al.*, 1997). A *C. sylvestris* se adapta em vários tipos de solos, de baixa a alta fertilidade, secos ou úmidos e com textura variando de arenosa a argilosa, portanto, os solos das populações avaliadas proporcionam condições para seu o desenvolvimento, principalmente os solos com maior drenagem e com textura argilosa a areno-argilosa (Carvalho, 2007b).

Solos com maiores teores de argila, apresentam maior capacidade de troca de cátions (CTC) (Bayer e Mielniczuk, 1997) e retém maiores quantidades nutrientes como Al, Ca, Mg, K e matéria orgânica (Freitas *et al.*, 2014) (Tabela 9). Os maiores teores de matéria orgânica estão relacionados às maiores quantidades de argila nos solos (Genu *et al.*, 2013), assim como os solos das populações FCF e CB, visto a matéria orgânica reter nutrientes como Ca, Mg e K, aumentando a CTC do solo. As populações FCF e CB contém os maiores índices de matéria orgânica e são as populações com maiores teores de OE (item 5.4.1). O solo da população EEA (Cerrado) apresenta menores teores de matéria orgânica, P, H + Al e Ca, em relação a população CB (Floresta Atlântica), corroborando dados da literatura que mencionam que solos do Cerrado são mais deficitários em nutrientes (Batista *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006).

Em relação aos nutrientes, o nível de P no solo da população EEA (2,00 mg/dm^3) é considerado muito baixo (≤ 6,0 mm/dm^3) e da população CB (8,00 mg/dm^3) é considerado baixo (7 a 15 mg/dm^3), podendo a deficiência de P e Mg atrasarem o florescimento e a fase reprodutiva (Raij *et al.*, 1996; Taiz e Zeiger, 2013; Viecelli, 2017). O que explicaria o florescimento dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA (julho a outubro) iniciaram e terminaram com atraso, em relação aos espécimens da população FCF (maio a setembro).

O teor de P no solo provavelmente não influenciou no aumento do teor de OE, pois as populações FCF e CB apresentaram os maiores teores de OE, enquanto a população FCA, que contém maior quantidade de P com 32,00 mg/dm^3, não apresentou os maiores teores de OE (conforme item 5.4.1). Como exemplo, podemos citar o teor de OE em *Hyptis suaveolens* e *Mentha x piperita*, os quais foram maiores em solos deficientes em N, P e K (Piccaglia *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2006; David *et al.*, 2007).

Solos com níveis de K < 1,5 mmol$_c$/dm^3 são considerados com nível baixo de K, nesse caso, recomenda-se a correção (Prado, 2008), como é o caso do solo da população EEA (0,90 mmol$_c$/dm^3). Umas das características da deficiência de K e Mg nas plantas são as folhas se curvarem para cima (curvatura adaxial), os caules secarem, se tornarem fracos e quebradiços (Viecelli, 2017), características marcantes na população EEA (Figura 18), onde predominam espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua*, diferentemente das demais populações analisadas, onde não foi observada esta curvatura nas folhas. A população EEA está localizada em um local de maior exposição solar, aumentando a perda de água e superaquecimento nas folhas, sendo fator que pode também contribuir para a curvatura adaxial nas folhas de *C. sylvestris* var. *lingua* (Larcher, 2000) e menor teor de OE umidade nas folhas (item 5.1.3).

Tabela 9. Caracterizações química e granulométrica dos solos das populações FCF, EEA, CB e FCA.

Análises Químicas do Solo				
Solo	**FCF**	**EEA**	**CB**	**FCA**
pH	5,1	3,8	3,8	5,0
MO[1] (g/kg)	40,0	15,0	36,0	21,0
P (resina) (mg/dm^3)	10,0	2,0	8,0	32,0
K ($mmol_c/dm^3$)	2,7	0,9	1,2	1,7
Ca ($mmol_c/dm^3$)	42,0	9,0	15,0	24,0
Mg ($mmol_c/dm^3$)	10,0	2,0	3,0	6,0
H + Al[2] ($mmol_c/dm^3$)	20,0	22,0	42,0	18,0
SB[3] ($mmol_c/dm^3$)	54,9	12,0	19,6	31,9
CTC[4] ($mmol_c/dm^3$)	74,9	34,0	61,6	49,9
V[5] (%)	73,3	35,3	31,8	63,9
S SO^{2-}_4 (mg/dm^3)	6,5	6,5	4,3	5,0
Al^{3+} ($mmol_c/dm^3$)	1,9	13,0	20,4	1,2
Na^+ ($mmol_c/dm^3$)	0,2	0,1	0,4	0,2
Análises Granulométricas do Solo (% m/m)				
Argila	34,0	20,0	20,0	25,0
Silte (limo)	15,0	4,0	10,0	9,0
Areia fina	35,0	38,0	43,0	21,0
Areia grossa	16,0	38,0	27,0	4500

[1]Matéria Orgânica, [2]Acidez Potencial, [3]Soma das Bases, [4]Capacidade de Troca de Cátions, [5]Saturação por Bases.

Figura 18. Folhas dos espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua*, da população EEA (A: EEA 201, B: EEA 205, C: EEA 209 e D: EEA 207). As folhas apresentaram curvatura para cima. Fonte: O Autor.

O maior valor encontrado de H + Al na população CB pode ser devido a maior lixiviação, por conta do maior regime hídrico (55,7 e 250,2 mm nos meses de julho e dezembro) nesta população em comparação as outras (Tabela 3, Apêndice 1) e também devido a maior drenagem (Campos *et al.*, 2012). Outro fator relacionado a H + Al é a decomposição de matéria orgânica, que libera compostos orgânicos hidrossolúveis no solo (Miyazawa *et al.*, 1993). As substâncias presentes na matéria orgânica contêm os grupos funcionais carboxílicos e fenólicos, podem liberar H^+ aumentando a CTC (Rangel e Silva, 2007).

Os solos das populações CB e FCF têm maiores teores de matéria orgânica, sendo solos mais férteis (Morais *et al.*, 2012), o que poderia explicar os espécimens de *C. sylvestris* com maiores alturas. A população EEA tem o menor teor de matéria orgânica, devido ser uma área de recuperação (Freitas *et al.*, 2015). A população FCF apresenta os maiores valores de pH, Ca, Mg, K e SB devido as aplicações de insumos e calcário, conforme Freitas *et al.* (2015).

Os solos da população FCF caracterizam-se por ser mais argiloso, sendo capaz de reter maior quantidade de matéria orgânica e micronutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, enquanto os solos das populações EEA, CB e FCA caracterizam-se por serem mais arenosos; entretanto os solos da população CB apresentaram quantidade de matéria orgânica semelhante a população FCF.

5.4 Determinação do teor de óleo essencial

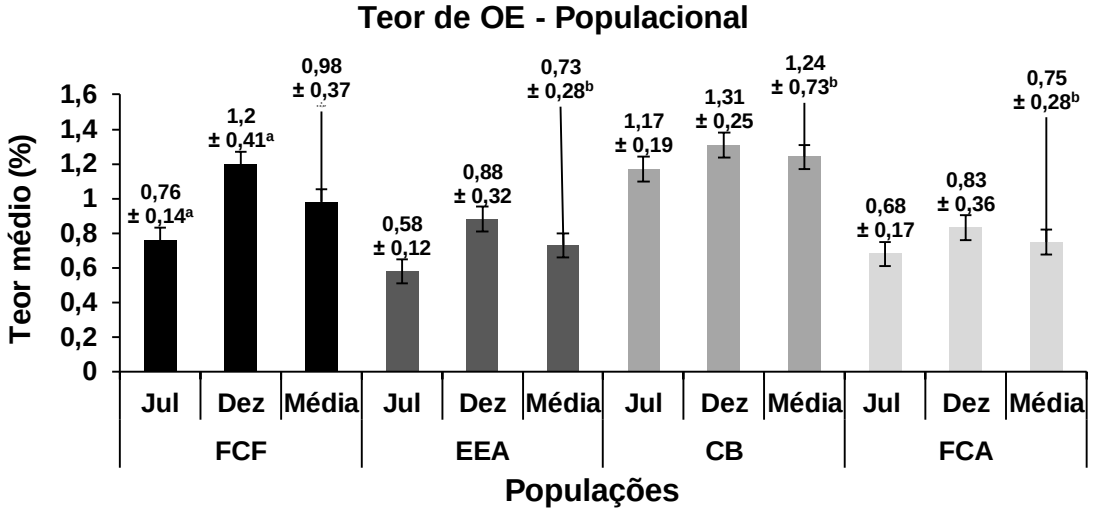
O teor de OE das folhas de *C. sylvestris* variou de 0,3 a 1,4 %, e foi maior que os teores de OE das flores com 0,2 % e os frutos verdes com 0,1 %. Conforme Castellani *et al.* (2006a), as folhas são o órgão com maior teor de OE na *C. sylvestris*, em comparação com os ramos. Em relação a cor do OE, esta variou de amarelo a incolor, semelhantes aos resultados mencionados por Oliveira *et al.* (2007).

5.4.1 Determinação do teor de OE populacional (FCF, EEA, CB e FCA)

A população FCF apresentou teor médio de OE entre as 2 coletas de 0,9 ± 0,3 % com diferença estatística significativa no teor de OE entre as coletas de Jul (0,7 %) e Dez (1,2 %), apresentando maior rendimento na coleta de Dez, enquanto as populações EEA, CB e FCA não apresentaram diferença estatística significativa entre Jul/Dez. A população CB apresentou teor médio de OE entre ambas as coletas de 1,2 ± 0,7 %, com diferença estatística significativa em relação ao teor médio do OE das 2 coletas das populações EEA (0,7 ± 0,2 %) e FCA (0,7 ± 0,2 %), conforme a Figura 19, demonstrando que a var. *sylvestris* (populações CB e FCF) produz mais OE do que a var. *lingua* (populações EEA e FCA). A população CB apresentou teor médio de OE estatisticamente semelhante a população FCF. As plantas originárias de sementes, como a *C. sylvestris*, demonstram grande variabilidade genética e consequentemente morfológica e quali/quantitativa dos seus metabólitos secundários (Pereira *et al.*, 2006).

O rendimento médio de OE da variedade *sylvestris* foi de 0,9 % (FCF) e 1,2 % (CB) e para a variedade *lingua* foi 0,81 % (EEA), enquanto a população FCA (que apresenta espécimens com características de uma forma intermediária) foi de 0,7 %). Os resultados estão entre os valores mencionados na literatura, que foram de 0,2 – 2,5 % (Silva e Bauer, 1970; Scavone *et al.*, 1979; Silva, 2003b; Esteves *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2006; Tininis *et al.*, 2006; Castellani *et al.*, 2006a; Sousa *et al.*, 2007; Santos, 2008; Silva, S. L. *et al.*, 2008; Spandre, 2010; Bou *et al.*, 2013; Pezzi, 2014; Amaral *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017b; Moreira *et al.*, 2019; Spósito *et al.*, 2019).

Figura 19. Teor médio de OE % (v/m) de 10 espécimens de cada coleta populacional de *C. sylvestris*. [a]População FCF estatisticamente diferente entre Jul/Dez $p < 0,05$; [b]População CB apresentou valor médio estatisticamente diferente das populações EEA e FCA, $p < 0,05$.



A população FCF apresentou maior teor de OE em Dez, isto pode ser devido a presença de frutos verdes, o que está relacionado a fenofase aumentando a produção de OE (Castellani *et al.*, 2006a). A altitude é um fator climático que pode interferir quantitativamente nos metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007), o que poderia explicar maior teor de OE da população CB (800 m) em relação a população EEA (663 m), contudo, a população FCA (819 m) apresentou maior altitude e não teve o maior teor de OE, sugerindo que a altitude não influenciou no rendimento de OE das folhas de *C. sylvestris*.

A *C. sylvestris* var. *sylvestris* localizada em região típica de Mata Atlântica (população CB) apresentou maior teor de OE que a var. *lingua* (populações EEA) e a forma intermediária (população FCA). Quando localizada em região de transição entre Cerrado e Mata Atlântica, a var *sylvestris* (população FCF) apresentou teor de OE estatisticamente semelhante a população CB.

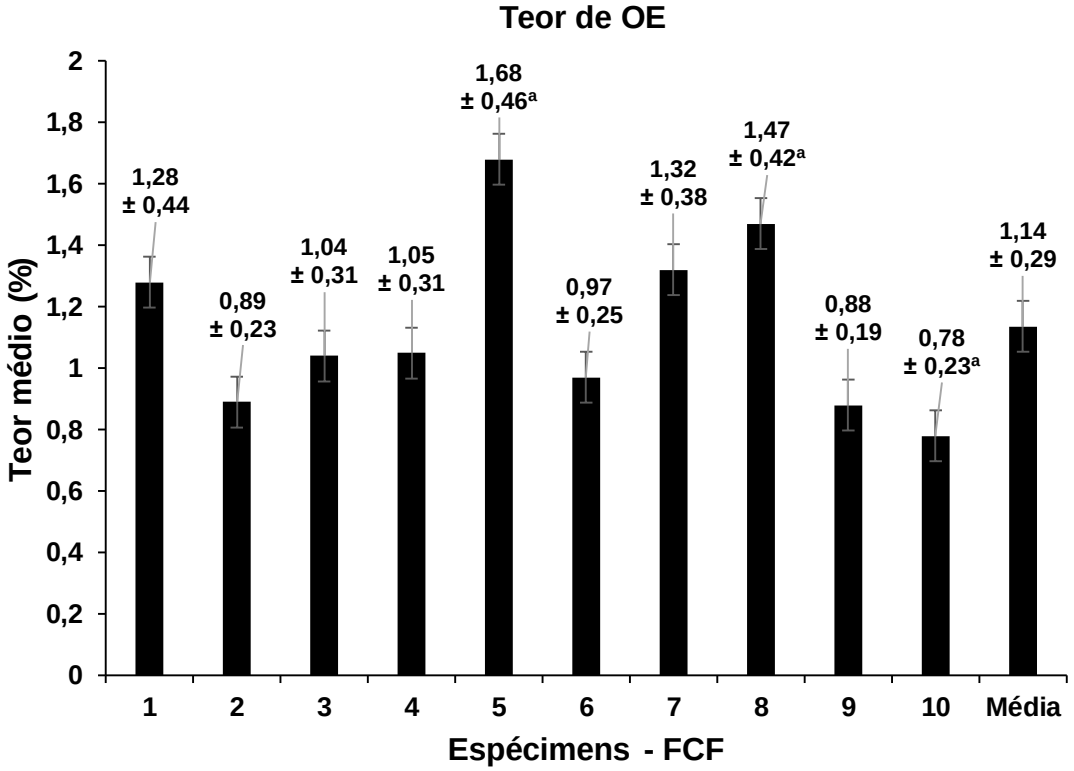
5.4.1.1 Determinação do teor de OE por espécimens (FCF e EEA)

O teor médio de OE das folhas de cada espécimen de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA durante as coletas sazonais foi de 1,1 ± 0,2 %

população FCF (Figura 20) e 0,8 ± 0,3 % população EEA (Figura 21). Contudo, esta diferença não é estatisticamente significativa, indicando que os espécimens da população FCF produzem quantidade de OE semelhante a população EEA.

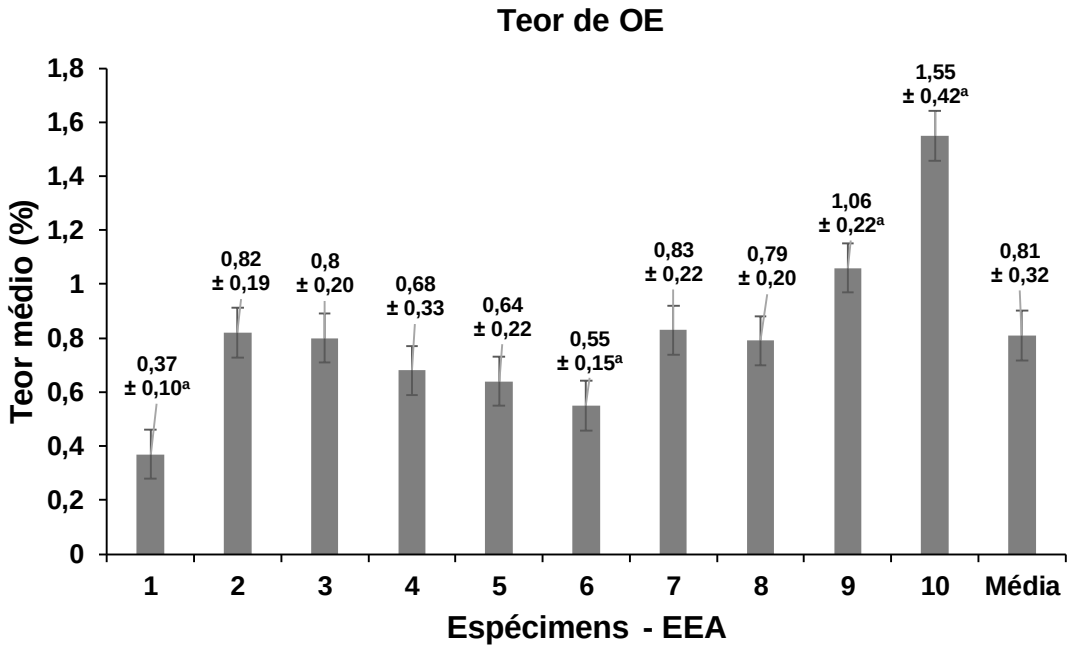
O teor de OE nos espécimens da população FCF variou de 0,7 a 1,6 % e na população EEA variou de 0,3 a 1,5 %. Na população FCF o menor teor de OE foi no espécimen 10 e os maiores teores foram nos espécimens 5 e 8. Na população EEA os menores teores de OE foram nos espécimens 1 e 6 e os maiores teores foram nos espécimens 9 e 10.

Figura 20. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF. [a]Espécimens estatisticamente diferentes da média $p < 0,05$.



Como as lesões mecânicas podem alterar a quantidade dos metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007), eram esperadas alterações no teor de OE dos espécimens FCF 2 (ferrugem) e EEA 4 (ataque herbívoro), durante a maior período das coletas (Tabelas 1 e 2, Apêndice 1), contudo estes espécimens não apresentaram alterações no teor médio de OE, sugerindo que o ataque herbívoro e a ferrugem não influenciaram no rendimento de OE.

Figura 21. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA. [a]Espécimens estatisticamente diferentes da média $p < 0,05$.



A variabilidade intrapopulacional no teor de OE pode ser relacionada a diferentes fatores, como crescimento e desenvolvimento da planta, considerando que as plantas analisadas são de espécimens de diferentes idades e fatores genéticos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

5.4.2 Determinação do teor de OE sazonal (FCF e EEA)

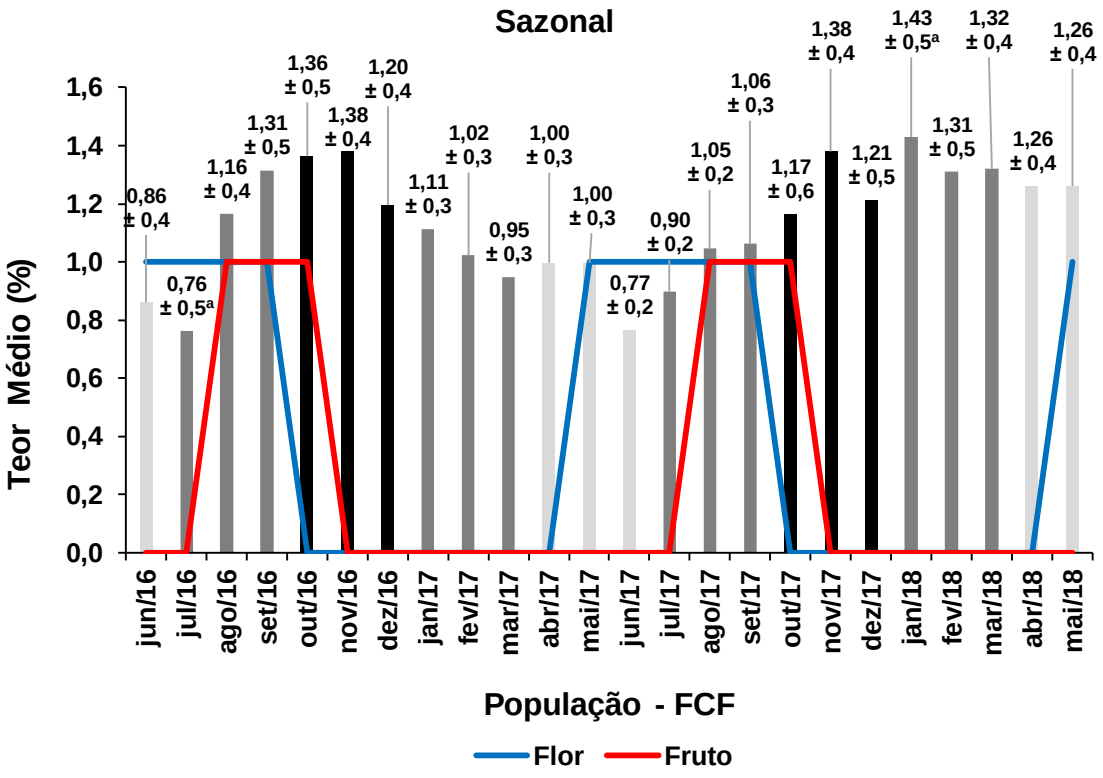
O teor de OE na população FCF variou de 0,7 % em Jul/16 a 1,4 % em Jan/18 (Figura 22), enquanto na população EEA oscilou entre 0,5 % em Jul/16 a 1,0 % em Nov/16 e Mai/18 (Figura 23). O teor médio das populações foi de: 1,1 ± 0,2 % FCF e 0,8 ± 0,3 % EEA e não houve diferença estatística significativa, contudo, o teor de OE da var. *lingua* tende a ser menor.

Spandre (2010), avaliou o teor de OE nas folhas de *C. sylvestris* (Curitiba-PR) em janeiro, maio, julho, setembro e novembro (0,1 a 0,4 %), verificando que houve variação sazonal significativa, com maior rendimento de OE em maio (0,4 %). Contudo, não há informação de qual a variedade de *C. sylvestris* utilizada, porém pode-se sugerir que seja a var. *sylvestris* por tratar-se de região de Mata Atlântica. Dentre as 3 populações de *C.*

sylvestris analisadas por Pezzi (2014) entre Mar/12 a Dez/13, apenas a população de Eldorado do Sul-RS (8 espécimens) apresentou variabilidade sazonal no teor de OE (variou de 0,3 % no outono a 0,8 % na primavera), enquanto que as 2 populações de Porto Alegre-RS (uma com 5 espécimens e outra com 6 espécimens) não apresentaram variabilidade sazonal no teor de OE (variou de 0,4 % no inverno a 0,6 % no verão e de 0,4 % na primavera a 0,7 % no verão). A variedade de *C. sylvestris* não foi relatada mas, como as coletas foram realizadas em Porto Alegre e Eldorado do Sul, sugere-se que são da *var. lingua*, segundo Bueno (2015). Conforme Pezzi (2014) as diferenças no teor de OE da *C. sylvestris* entre as populações pode ser devido a variabilidade genética, sendo que a diminuição do teor de OE é devido a diminuição na temperatura e pluviometria.

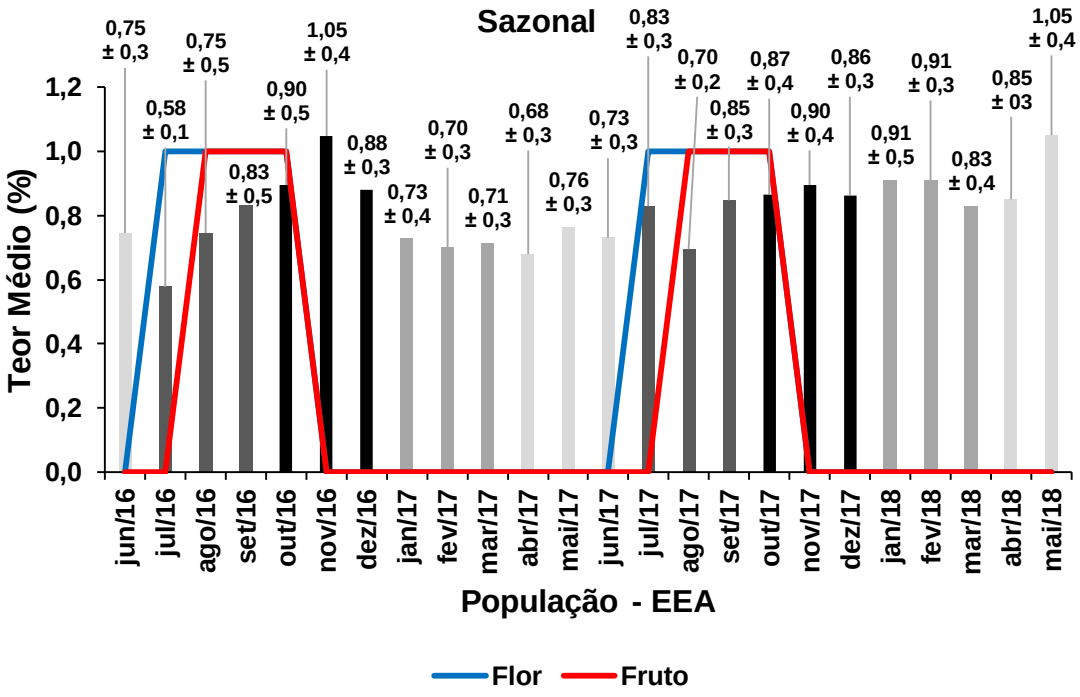
Como os resultados apresentaram variabilidade significativa no teor de OE, foi possível afirmar que há diferenças estatísticas significativas entre o teor de OE da *C. sylvestris* var. *sylvestris* e var. *lingua*.

Figura 22. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF. [a]Períodos que apresentaram diferença estatística Jul/16 e Jan/18 $p < 0,05$.



A diferença estatística significativa no teor de OE na população FCF entre os meses Jul/16 e Jan/18 pode ser relacionada aos índices pluviométricos, sendo que em Jul/16 houve precipitação pluviométrica de 25,8 mm e Jan/18 de 319,3 mm, contudo nos meses de Jan/17 e Jul/17 as diferenças pluviométricas (Tabela 1, Apêndice 1) se repetiram e não houve diferença estatística no teor de OE, apesar do menor teor observado em Jul/17. Neste caso, não há como sugerir que o índice pluviométrico foi o responsável pela diferença de teor em Jul/16 e Jan/17. Ainda sobre os meses de Jul/16 e Jan/18 (FCF), os fatores climáticos que apresentaram diferenças foram o IUV, Jul/16 foi de 6 e Jan/18 foi de 1, a UR, Jul/16 foi de 68 % e Jan/18 foi de 89 % e a temperatura que foi 18,1 ºC em Jul/16 e de 26,0 ºC em Jan/18, indicando que estes fatores climáticos influenciaram no teor de OE (Tabela 1, Apêndice 1). Os maiores índices de radiação ultravioleta, UR, pluviometria e temperatura demonstraram que influenciam no aumento teor de metabólitos secundários (Blank *et al.*, 2005; Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008).

Figura 23. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA.



Na população EEA não houve diferença estatística significativa no teor de OE, sugerindo que os fatores climáticos, pluviometria, temperatura, UR e

IUV não influenciaram no rendimento de OE, podendo sugerir que a produção de metabólitos secundários se manteve estabilizada.

Na Figura 24 é possível verificar que a população FCF apresenta aumento no teor de OE no início da primavera (2016 e 2017) e com diminuição no teor de OE no início do verão (exceção em Jan/18). A população EEA segue a tendência da produção de OE, com aumento na primavera e diminuição no verão (2016), entretanto, no segundo ano de coleta (2017) há uma tendência na estabilização do teor de OE. Contudo, as diferenças mencionadas não apresentaram significância estatística, indicando que o teor de OE é semelhante sazonalmente e entre as populações FCF e EEA. Os resultados estão em conformidade com Pezzi (2014), mas diferem de Spandre (2010), pois as diferentes regiões de coletas apresentaram altitudes e climas diferentes, embora, a altitude não influenciou no teor de OE das populações analisadas.

As exceções foram em relação aos meses de Jan/18 da população FCF com maior teor de OE que os meses de Jul/16, Fev, Abr e Ago/17; o mês de Jul/16 da população EEA apresentou menor teor de OE que os meses de Set, Out e Nov/16, Jan, Fev e Mar/18 da população FCF. Esta tendência não se repete entre os 2 anos de análises, por isso não se pode afirmar que Jul é o mês de menor teor de OE em ambas as populações.

O teor de OE aumentou no período reprodutivo (final da floração e início da frutificação), diferentemente de Spandre (2010), onde o maior teor de OE foi na fase vegetativa.

Em relação aos fatores climáticos (Figuras 25 e 26), o teor de OE das populações FCF e EEA aumentam na primavera e verão e diminuem ou mantém-se relativamente estável nas demais estações, seguindo a tendência de aumento de teor conforme o aumento da temperatura e pluviometria, enquanto a UR e IUV não apresentaram correlação com os teores de OE, indicando que temperatura e/ou pluviometria influenciaram no teor de OE. Os menores teores de OE no outono/inverno podem estar associados a diminuição da taxa de crescimento das plantas no inverno, diminuindo a produção dos metabólitos secundários, enquanto as altas temperaturas, acompanhada de alta UR e altos índices pluviométricos favorecem a produção de OE (Martins *et al.*, 2003).

De acordo com Spandre (2010), Becker (2009) e Castellani *et al.* (2006a), o período de maior teor de OE em *C. sylvestris* foi no outono com baixa pluviometria e temperaturas, com exceção de Spandre (2010) que relatou pluviometria elevada no outono. Pezzi (2014) mencionou que a pluviometria influenciou no aumento do teor de OE, pois nos meses com maiores índices pluviométricos o rendimento dos OE foram maiores. O maior teor de OE das populações FCF e EEA nos períodos de maior temperatura/pluviometria, embora não apresentaram diferença estatística significativa, seguem a tendência de aumentar o teor de OE conforme o aumento da temperatura e pluviometria.

Figura 24. Teor médio de OE % (v/m) de 24 coletas das folhas dos espécimens de *C. sylvestris*, das populações FCF e EEA. [a]Valores são estatísticamente diferentes de FCF Jan/18 $p < 0,05$, [b]Valores estatisticamente diferentes de EEA Jul/16 $p < 0,05$.

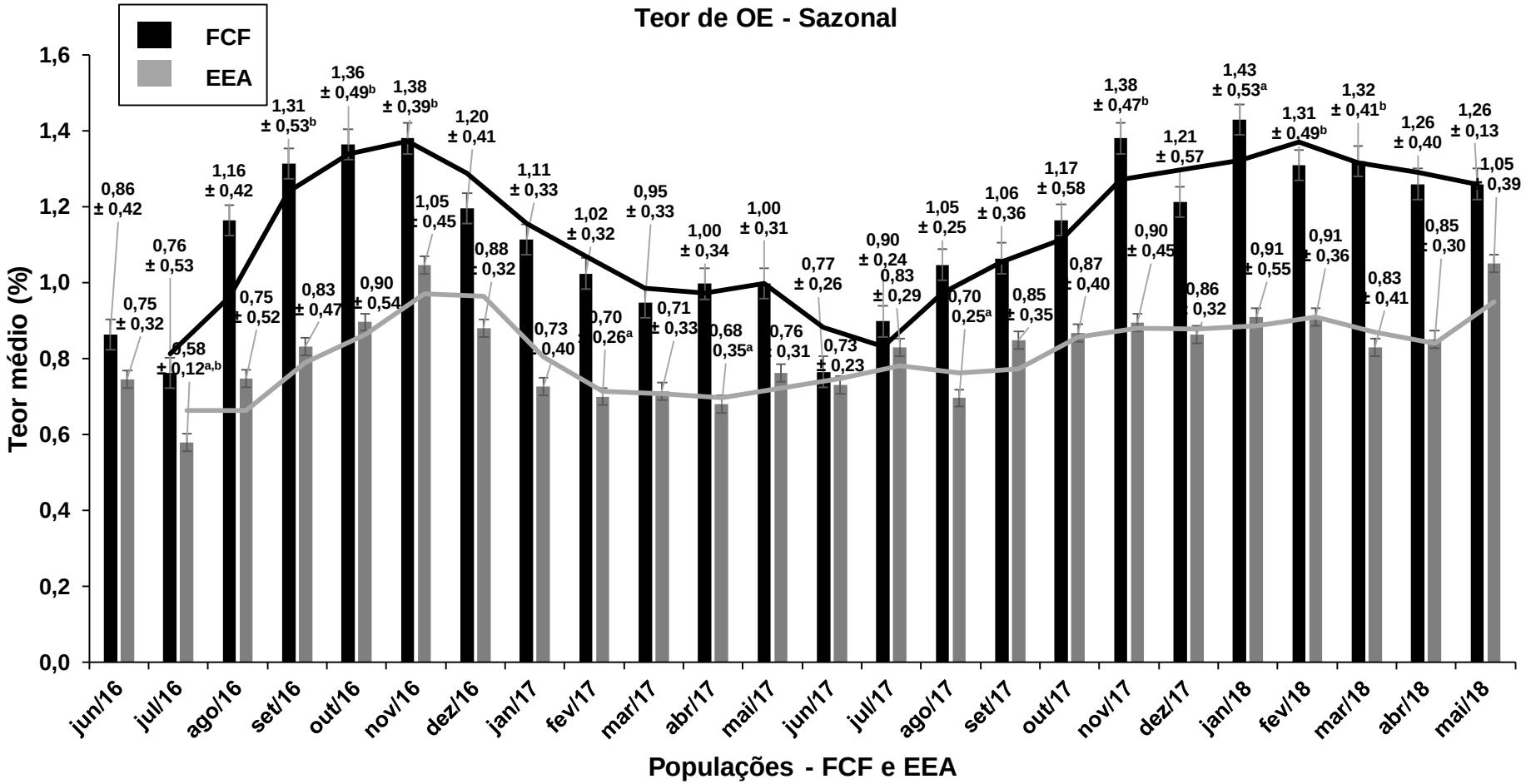


Figura 25. Correlação entre teor de OE da população FCF com os fatores climáticos temperatura e pluviometria (média mensal), UR e IUV.

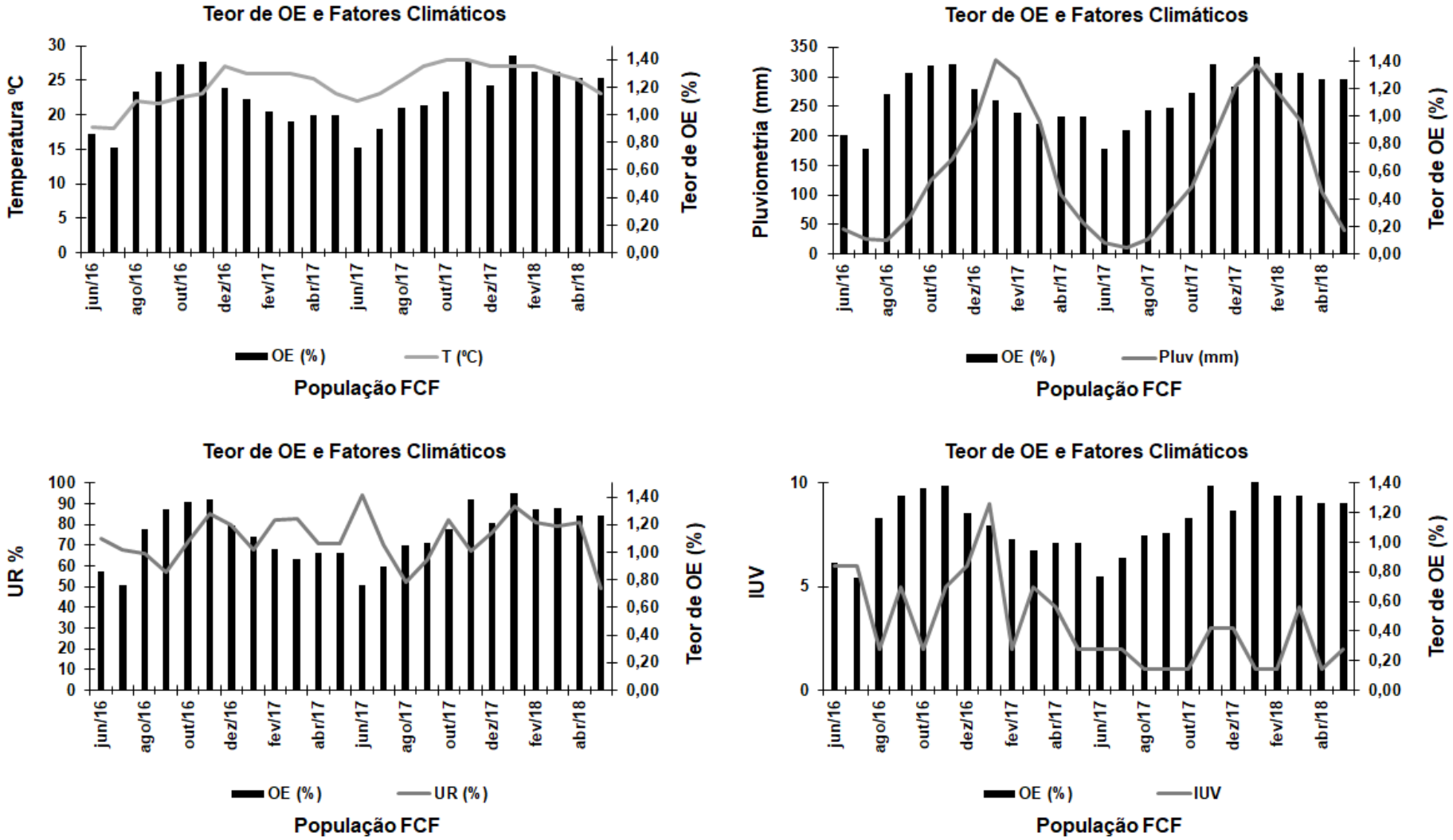
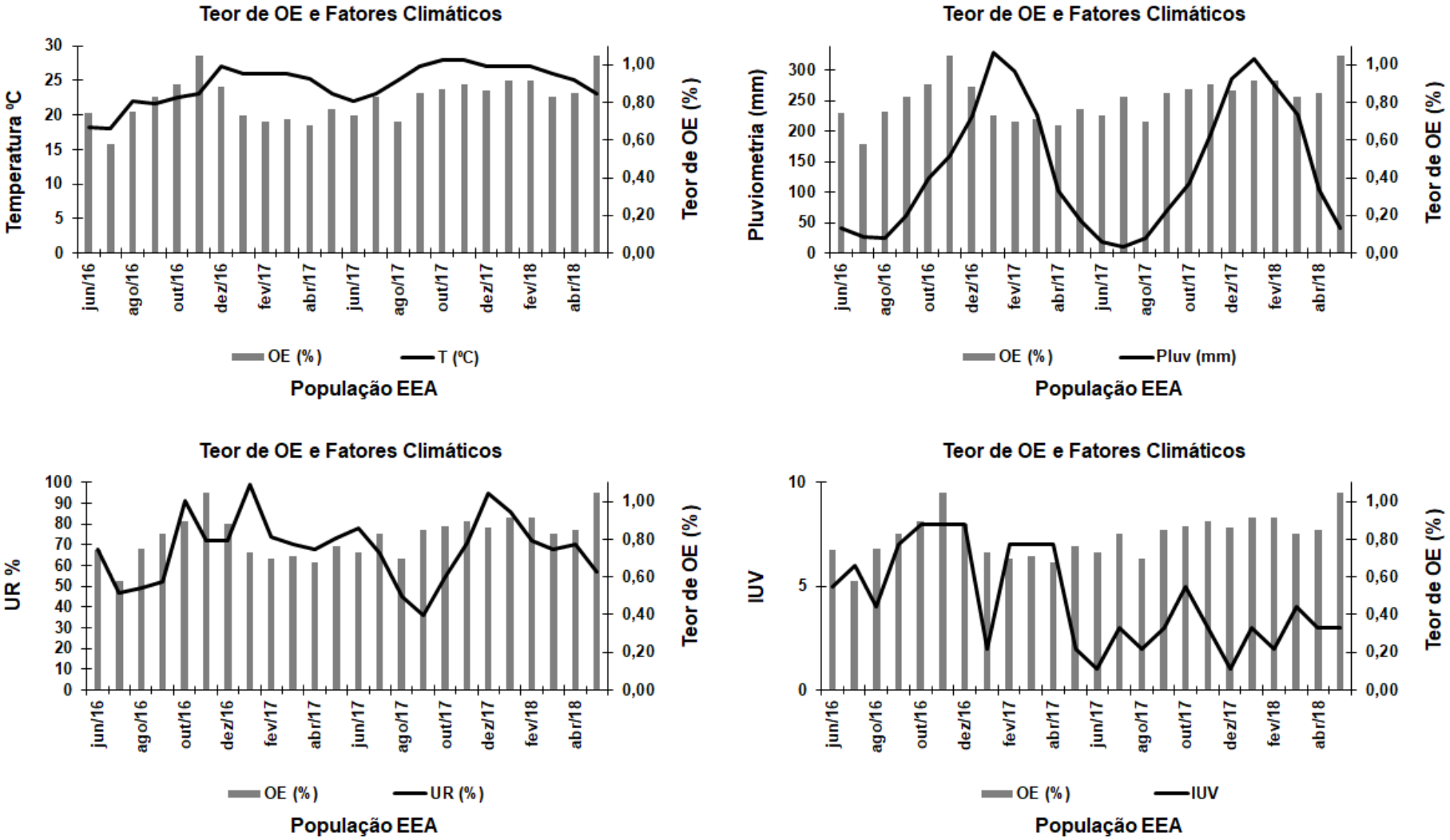


Figura 26. Correlação entre teor de OE da população EEA com os fatores climáticos temperatura e pluviometria (média mensal), UR e IUV.

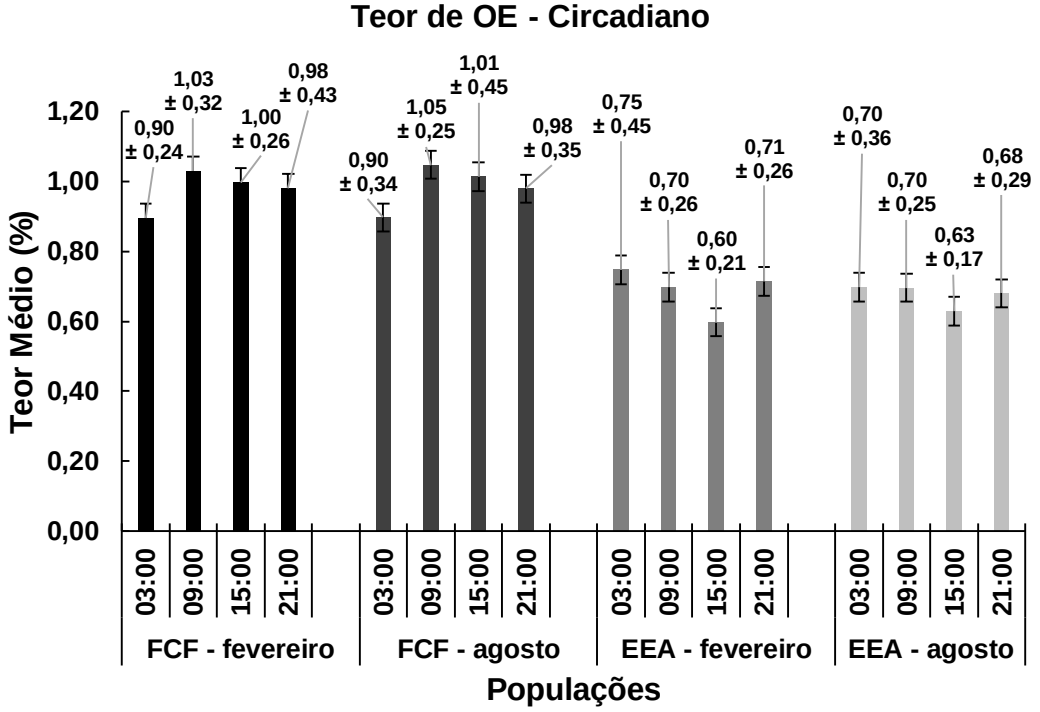


5.4.3 Determinação do teor circadiano (FCF e EEA)

Os teores de OE das amostras das coletas circadianas das populações FCF e CB variaram entre 0,6 a 1,0 % (Figura 27). O teor de OE não apresentou diferença estatística significativa entre as variedades *sylvestris* (população FCF) e *lingua* (população EEA), horários e meses coletados (2 coletas circadianas), demonstrando que nos meses e horários avaliados os teores de OE não variaram nas populações FCF e EEA. De qualquer forma, os valores dos teores de OE para a var. *lingua* foram novamente os menores.

Fatores climáticos tais como a radiação ultravioleta e umidade relativa podem influenciar no teor de metabólitos secundários (Blank *et al.*, 2005; Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008), entretanto, a variação do IUV durante os dias das coletas circadianas foram de 0 – 9 (FCF) e 0 – 14 (EEA), enquanto a UR variou entre 25 – 63 % (FCF) e 41 – 82 % (EEA) (Tabelas 4 e 5, Apêndice 1), demonstrando que o IUV e a UR não interferiram no teor de OE das folhas de *C. sylvestris*.

Figura 27. Teor médio de OE % (v/m) dos 10 espécimens de folhas de *C. sylvestris*, das populações FCF e EEA. Valores são estatisticamente semelhantes; $p < 0,05$.



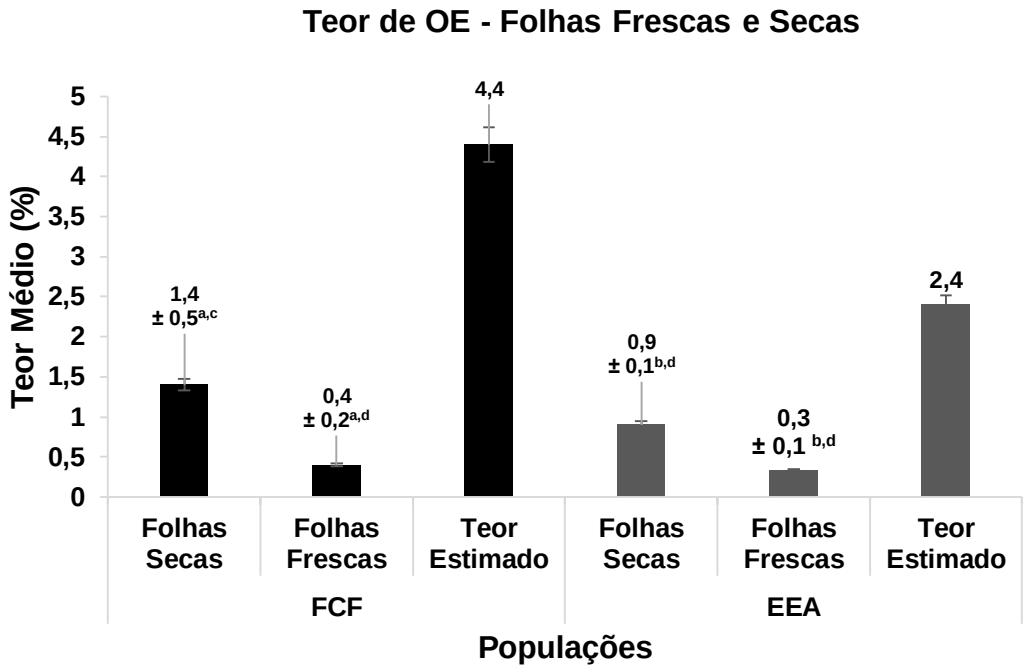
O ciclo circadiano não interferiu no teor de OE, pois não houve diferença estatística significativa no teor de OE para ambas as populações (FCF e EEA), indicando que o teor OE das folhas de *C. sylvestris* foi semelhante em qualquer horário de coleta.

5.4.4 Determinação do OE em folhas frescas e folhas secas (FCF e EEA)

O teor de OE das folhas secas dos 10 espécimens de cada população (FCF e EEA) foi estatisticamente maior em relação às folhas frescas das respectivas populações, enquanto o teor de OE das folhas frescas das populações FCF e EEA foram estatisticamente semelhantes, assim como teor de OE das folhas secas (Figura 28).

O maior rendimento de OE das folhas secas em relação às folhas frescas é devido o processo de secagem em estufa (40 ºC, 3 dias) que reduz o teor de umidade que foi determinado como de 67,4 % (FCF) e 62,2 % (EEA) no ensaio de perda por secagem (item 5.1.3). Ao considerar o teor de umidade das folhas frescas, as massas de folhas frescas equivalentes às folhas secas (30 g) foram de 9,7 e 11,3 g para as populações FCF e EEA, respectivamente e os rendimentos estimados de OE de folhas frescas seria por volta de 4,4 e 2,4 % para as populações FCF e EEA, respectivamente. Já os rendimentos para folhas secas foram de 1,4 e 0,9 % nas populações FCF e EEA, respectivamente. Estes dados sugerem a perda de componentes voláteis durante a secagem.

Figura 28. Teor médio de OE % (v/m) dos 10 espécimens das folhas frescas e folhas secas de *C. sylvestris*. [a,b]Valores das folhas secas e frescas entre as populações FCF e EEA são estatisticamente diferentes $p < 0,05$; [c]Valores das folhas secas entre populações FCF e EEA são estatisticamente diferentes $p < 0,05$; [d]Valores das folhas frescas entre populações FCF e EEA são estatisticamente semelhantes $p < 0,05$.



O teor de OE das folhas frescas nas populações FCF e EEA foi de 0,4 e 0,33 %, respectivamente, sendo maiores que os 0,2 % encontrados por Spandre (2010) e menores que o rendimento de 1,0 % descrito por Becker (2009). Após a secagem à 40 ºC, o teor (1,4 % FCF e 0,9 % EEA) foi menor do que os 1,7 % encontrados por Spandre (2010).

Considerando apenas o teor, foi mais vantajoso extrair OE das folhas secas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (população FCF), devido o maior rendimento apresentado. Porém, o processo de secagem pode interferir na composição do OE e os dados obtidos sugerem perda de componentes voláteis. Além disso, a extração de OE das folhas secas tem vantagens em termos de sustentabilidade e Química Verde por não necessitar da etapa de secagem.

5.5 Determinação dos parâmetros físicos do óleo essencial

Foram utilizados 10 espécimens de cada umas das populações (FCF, EEA, CB e FCA), sendo que o OE populacional consiste em uma mistura do OE dos 10 espécimens da população no respectivo mês de coleta (Jul e Dez). Esta foi uma estratégia para diminuir o número de experimentos com representatividade em termos de número de espécimens das populações.

Os parâmetros físicos do OE podem ser utilizados em conjunto para verificar a autenticidade do OE das folhas de *C. sylvestris*, identificando possíveis adulterações com outros OE, etanol, óleo fixo (triglicerídeos) e óleo mineral, sendo parâmetros importantes no controle de qualidade e presentes em farmacopeias internacionais.

5.5.1 Índice de refração

Os valores de índice de refração do OE das populações FCF, EEA, CB e FCA (jul e dez) foram todos de 1,500 ± 0,001 para todas as amostras. Mesmo se tratando de amostras coletadas em diferentes locais (FCF, EEA, CB e FCA) e épocas do ano (julho e dezembro), não houve variações estatisticamente significativas, podendo utilizar este resultado como especificação na análise de pureza e identificação do OE de folhas de *C. sylvestris*, pois não há relatos na literatura.

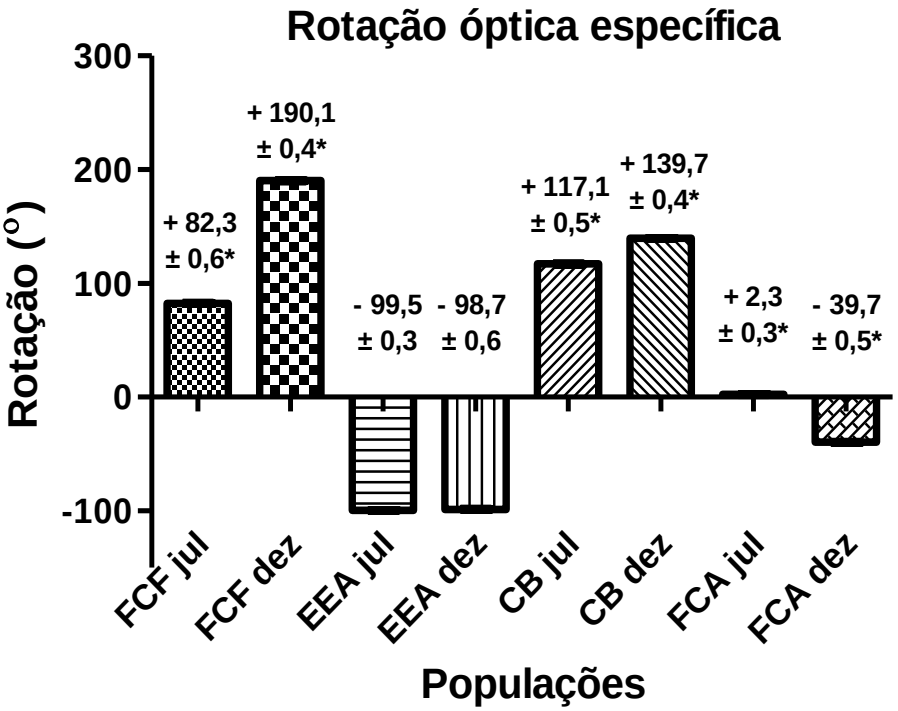
5.5.2 Rotação óptica específica

Os resultados variaram entre + 190,1º FCF Dez e – 99,5º EEA Jul (Figura 29). As populações FCF e CB são constituídas por espécimens de *C. sylvestris* var. *sylvestris* e apresentaram OE dextrogiro (+), enquanto a população EEA que é formada predominantemente por espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua* apresentou OE levogiro (-). Contudo, a população FCA apresentou OE dextrogiro (+) e levogiro (-), sendo que esta população pode ser formada espécimens de *C. sylvestris* com características intermediárias entre as var. *sylvestris* e var. *lingua*. Portanto, a rotação óptica específica pode ser utilizada para diferenciar o OE das folhas das variedades *sylvestris* e *lingua*.

As diferenças entre os valores de rotação óptica específica das populações indicam haver diferenças na constituição química do OE, quanto ao

local de coleta e em relação a composição dos metabólitos secundários das diferentes populações de *C. sylvestris*.

Figura 29. Rotação óptica específica dos OE das folhas de *C. sylvestris*. *Valores estatisticamente diferentes na respectiva população, $p < 0,05$.



Os valores de rotação óptica específica das amostras de OE das duas coletas (Jul e Dez) e as populações apresentaram diferença estatística diferente (populações FCF, CB e FCA), indicando que pode haver variações na composição do OE conforme a época e o local de coleta. A população EEA apresentou valores estatisticamente semelhantes para as duas coletas, sugerindo que época de coleta não influenciou nos resultados. Estes resultados indicam que a rotação óptica específica não pode ser utilizada como parâmetro de pureza e identidade no controle de qualidade do OE de folhas de *C. sylvestris*. De outro lado, sugere-se uma possível diferenciação da origem do OE em relação às variedades (var. *sylvestris*, *lingua* e formas intermediárias) através da determinação da rotação óptica específica, que deve ser confirmada através da análise de maior número de espécimens de diferentes populações.

As variações dos valores de rotação óptica específica podem ser atribuídas a variação dos componentes majoritários do OE entre as coletas. Os OE das populações EEA (Jul e Dez) e FCA (Dez) apresentaram valores de rotação óptica específica negativos, sendo que os componentes majoritários foram o espatulenol, biciclogermacreno, óxido de cariofileno e globulol enquanto os valores de rotação óptica específica OE das populações FCF (Jul e Dez), CB (Jul e Dez) e FCA (Jul) foram positivos e neste caso os componentes majoritários foram o biciclogermacreno, óxido de cariofileno, germacreno D, *β*-elemeno, epóxido de humuleno II, *α*-humuleno, *δ*-elemeno e espatulenol.

A população FCA Dez é um exemplo de que é complexo relacionar os valores de rotação óptica específica dos componentes majoritários do OE com o valor determinando para cada população, pois o valor determinado da rotação óptica específica da população FCA Dez foi de - 39,7º, contudo os valores de rotação óptica específica dos componentes majoritários espatulenol e biciclogermacreno são de + 8,6º e + 61,0º, respectivamente (Toyota *et al.*, 1996; Benovit *et al.*, 2015). Neste caso, os resultados indicam que os demais componentes do OE apresentam valores negativos para a rotação óptica específica. Outro exemplo é o OE da população CB Jul, pois o valor da rotação óptica específica foi de + 117,1º, enquanto os componentes majoritários germacreno D e biciclogermacreno apresentam valores de rotação óptica específica de + 305,0º e + 61,0º, respectivamente (Niwa *et al.*, 1980; Toyota *et al.*, 1996), sendo os valores obtidos para o OE e componentes majoritários mais coerentes. É preciso considerar que os OE são misturas complexas contendo dezenas de componentes em grande parte possuindo centros estereogênicos e nem todos são identificados usualmente, o que dificulta este tipo de análise e discussão.

De acordo com os resultados não foi possível correlacionar os componentes majoritários do OE de folhas de *C. sylvestris* com valores de rotação óptica específica (positivo ou negativo), pois os demais componentes do OE influenciam nos valores de rotação óptica específica.

5.5.3 Densidade relativa

Os valores de densidade relativa das amostras de OE das populações FCF, EEA, CB e FCF (Jun/Dez) foram todos de 0,922 ± 0,001 g/mL. Os OE apresentaram densidade relativa inferior à da água ficando na parte superior durante a extração por hidrodestilação. Os resultados indicam que a densidade relativa pode ser considerada como parâmetro de pureza e identificação no controle de qualidade do OE folhas de *C. sylvestris*.

Os valores para densidade relativa e índice de refração para o OE das folhas de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. (guaviduca) foram de 0,928 g/mL e 1,49º, respectivamente (Ballesteros *et al.*, 2019). O valor do índice de refração do OE das folhas de *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br foi de 1,483 (Mustarichie *et al.*, 2017). O OE das folhas de *Laurus nobilis* L. apresentou valores de densidade relativa, índice de refração e rotação óptica específica de 0,917 g/mL, 1,333 e + 0,5º, respectivamente (Karima *et al.*, 2016). A rotação óptica específica do OE das folhas de *Lepechinia heteromorfa* (Briq.) Epling. foi de -5,6º (Gilardoni *et al.*, 2019). O OE das partes aéreas (folhas e flores) de *Rosmarinus officinalis* L. apresentou valores para a densidade relativa, índice de refração e rotação óptica específica de 0,915 g/mL, 1,469 e + 2,0º, respectivamente e para a *Populus alba* L., os valores foram de 0,9 g/mL, 1,470 e + 3,0º, respectivamente (Belkhodja *et al.*, 2016).

Os dados encontrados na literatura para a densidade relativa, índice de refração e rotação óptica específica para OE foram diferentes dos valores determinados para o OE das folhas de *C. sylvestris*, sugerindo que estes resultados podem ser utilizados como parâmetros de pureza e identificação para o OE das folhas da *C. sylvestris*. À rotação óptica especifica não mostrou ser importante para determinar a origem do OE por ter variado muito entre as populações, mas pode ser útil na diferenciação das variedades da espécie.

5.6 Análises cromatográficas e espectrométricas do óleo essencial

5.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O fato de cada amostra ser uma mistura do OE de 10 espécimens de cada população tornam os resultados mais representativos, dessa maneira os métodos desenvolvidos para as análises dos OE das folhas das var. *sylvestris*

e var. *lingua* podem ser utilizados como parâmetros de análise e perfil cromatográfico (*Fingerprint*) do OE das folhas de *C. sylvestris*.

Nas cromatoplacas da Figura 30 é possível observar a separação de 6 bandas cromatográficas e que alguns componentes do OE ficaram retidos no ponto de aplicação. O óxido de cariofileno (R_f 0,50) apresentou uma coloração pouco intensa em todas as amostras de OE. Por outro lado, nas análises por CG-EM o óxido de cariofileno foi identificado somente nas amostras FCF, EEA e CB quando coletadas no mês de dezembro, então há a possibilidade de ser outro componente que apresenta o mesmo R_f.

A condição cromatográfica (FM 1) não foi ideal para separar *E*-cariofileno do *α*-humuleno, pois apresentaram bandas cromatográficas com o mesmo R_f (0,73), embora com cores diferentes. O padrão de *α*-humuleno apresentou uma segunda banda com R_f 0,50, que pode ser referente ao óxido de cariofileno como contaminante do padrão. Para que as bandas com R_f 0,25, 0,30, 0,45 e 0,50 ficassem bem nítidas foi necessário aumentar a concentração das amostras, porém as bandas com R_f 0,73 ficaram muito concentradas e com grandes dimensões.

A FM 2 (Figura 31) separou nitidamente o *E*-cariofileno (R_f 0,5) do *α*-humuleno (R_f 0,45), enquanto o óxido de cariofileno por ser mais polar ficou retido no ponto de aplicação, juntamente com os componentes oxigenados do OE. O *α*-humuleno está presente em todas as amostras e foi comprovado por CG-EM (item 5.6.2.1). O *E*-cariofileno foi verificado em todas as amostras, porém, por CG-EM não foi identificado nas amostras de FCF e FCA no mês de dezembro.

Figura 30. Cromatoplacas do OE das populações FCF, EEA, CB e EEA coletados em Jul/Dez (40 µL/mL, hexano) e os padrões *E*-cariofileno, óxido de cariofileno e *α*-humuleno (6 µL/mL, hexano), utilizando a FM 1 hex: AcOEt 85:15 (v/v). Revelador, ácido sulfúrico 10 %, 110 ºC, 10 min.

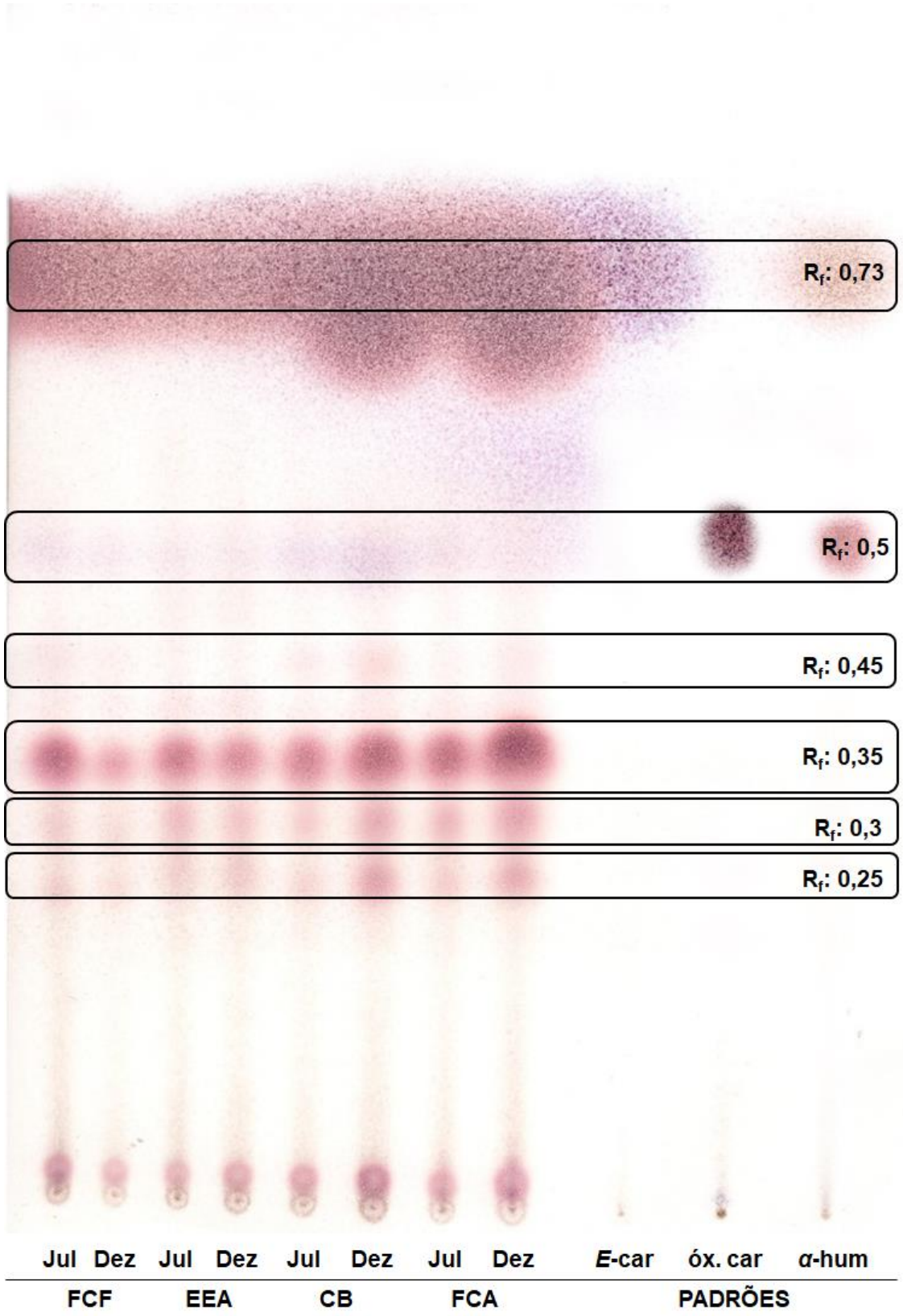
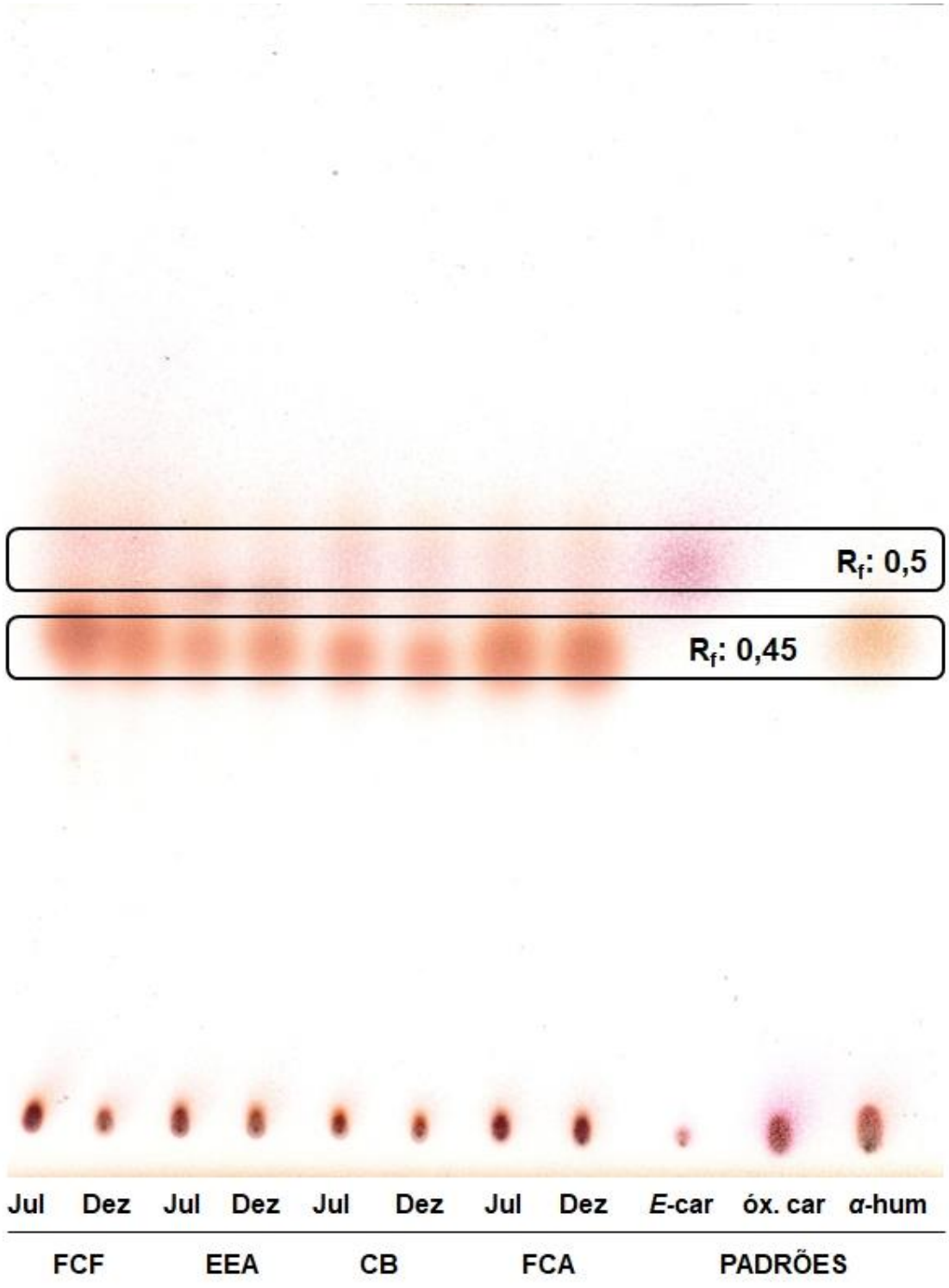


Figura 31. Cromatoplacas do OE das populações FCF, EEA, CB e EEA coletados em Jul/Dez (40 µL/mL, hexano) e os padrões *E*-cariofileno, óxido de cariofileno e *α*-humuleno (6 µL/mL, hexano), utilizando a FM 2 hex. Revelador, ácido sulfúrico 10 %, 110 ºC, 10 min.



5.6.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

5.6.2.1 Análise populacional da composição do OE (FCF, EEA, CB e FCA)

A identificação dos componentes do OE das folhas de *C. sylvestris* foi realizada por CG-EM, comparando os índices de retenção - índice de Van Den Dool e Kratz (1963) - os espectros de massas com dados da literatura e bibliotecas de espectros (NIST 08 e WILEY 7). O cálculo do índice retenção foi através dos t_R dos componentes do OE e dos t_R dos padrões de hidrocarbonetos (C-8 a C-40).

Cada população (FCF, EEA, CB e FCA) é formada por OE dos 10 espécimens (a quantidade de folhas de cada espécimen variou), com 2 coletas (Jul e Dez), totalizando 8 amostras de OE populacional. O OE das populações FCF, CB (var. *sylvestris*) e FCA apresentaram maior teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos em Jul, já em Dez os componentes com maior teor foram os sesquiterpenos oxigenados. O OE da população EEA (var. *lingua*) apresenta maior teor de sesquiterpenos oxigenados em ambas as coletas (Jul e Dez), contudo houve um aumento dos sesquiterpenos hidrocarbonetos em Dez. Conforme os dados da literatura, há o predomínio de sesquiterpenos hidrocarbonetos no OE das folhas de *C. sylvestris*, o que difere de alguns resultados que apresentaram maior teor de sesquiterpenos oxigenados, indicando que há variabilidade na composição química entre as populações de *C. sylvestris*.

A composição do OE das folhas de *C. sylvestris* variou em todas as populações (FCF, EEA, CB e FCA) e nos meses de coleta (Jul e Dez/16), Tabela 10. Na população FCF os componentes do OE variaram entre as coletas, em Jul/16 os componentes majoritários foram o biciclogermacreno (15,7 %), *α*-humuleno (12,1 %) e o *E*-cariofileno (7,4 %); enquanto em Dez/16 os componentes majoritários foram o espatulenol (24,3 %), epóxido de humuleno II (15,3 %) e óxido de cariofileno (13,8 %), indicando que a composição e o teor do OE passaram por modificações. Dados como nome dos componentes, t_R, índice de retenção calculado, índice de retenção identificado, similaridade dos espectros de massas e teor dos componentes do OE estão nas Tabelas 1 a 8, Apêndice 3.

O OE coletado em Jul/16 na população EEA apresentou como componentes majoritários o espatulenol, globulol, *α*-cadinol e epóxido de humuleno II (20,2, 10,3, 9,2 e 8,1 %, respectivamente) e em Dez/16 os componentes majoritários foram o espatulenol, epóxido de humuleno II, óxido de cariofileno e *α*-cadinol, com 14,9, 8,7, 8,7 e 7,6 %, respectivamente.

Os principais componentes do OE de folhas de *C. sylvestris* foram o espatulenol, óxido de cariofileno, biciclogermacreno, epóxido de humuleno II, *β*-elemeno e *α*-humuleno (Figura 32) e na literatura foram descritos como componentes majoritários o biciclogermacreno, espatulenol, germacreno D, *δ*-cadineno, *α*-zingibereno, *δ*-humuleno, *α*-cariofileno, o *E*-cariofileno, *β*-acoradieno e tumbergol (Esteves *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2006; Tininis *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2007; Güntzel, 2008; Silva, S.L. *et al.*, 2008; Spandre, 2010; Bou *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2017; Spósito *et al.*, 2019).

Os componentes majoritários na população CB Jul/16 foram o biciclogermacreno (15,1 %), germacreno D (10,9 %), *E*-cariofileno (10,7 %) e *β*-elemeno (8,1 %) e em Dez/16 foram o óxido de cariofileno (21,6 %), espatulenol (16,6 %) e *β*-elemeno com 12,2 %. O biciclogermacreno (19,0 %) e *δ*-elemeno (10,5 %) foram os componentes majoritários na população FCA Jul/16 e em Dez/16 os componentes majoritários foram o espatulenol, globulol e epóxido de humuleno II, com 29,9, 10,5 e 9,2 %, respectivamente.

O limoneno ($C_{10}H_{16}$), identificado no OE da população FCF (Jul/16) foi o único monoterpeno encontrado nos OE das folhas de *C. sylvestris* analisados e pode ser um contaminante. Já o curcumeno ($C_{15}H_{22}$) é um sesquiterpeno aromático (Figura 33), enquanto os demais componentes do OE são sesquiterpenos hidrocarbonetos e/ou oxigenados. A presença de monoterpenos já foi relatada no OE de folhas de *C. sylvestris*, mencionando o *α*-pineno, linalol e pulegona (Schneider *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2007; Silva, S. L. *et al.*, 2008).

Tabela 10. Composição química e teor (%) dos componentes do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA (10 espécimens de cada população, respectivamente), coletadas em julho e dezembro de 2016, identificados por CG-EM.

Componentes	FCF Jul	FCF Dez	EEA Jul	EEA Dez	CB Jul	CB Dez	FCA Jul	FCA Dez
limoneno*	0,13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
δ-elemeno	7,79	-----	-----	0,51	6,32	-----	10,53	0,24
ciclosativeno	0,56	-----	-----	0,29	0,11	-----	-----	-----
α-cubebeno	0,16	-----	-----	-----	0,10	-----	1,39	-----
isodeleno	0,24	-----	-----	-----	0,26	-----	0,11	-----
α-copaeno	3,28	0,48	0,28	1,95	1,87	0,24	1,82	0,64
β-cubebeno	0,13	-----	-----	-----	-----	-----	0,47	-----
β-bouborneno	0,48	-----	-----	0,22	-----	0,24	-----	-----
β-elemeno	4,27	1,25	1,19	3,15	8,12	12,22	5,64	1,72
α-gurjuneno	0,63	-----	-----	1,11	4,46	-----	3,61	-----
E-cariofileno	7,47	-----	0,26	1,70	10,72	0,88	3,77	-----
β-copaeno	1,22	-----	-----	0,81	0,89	-----	0,56	-----
γ-elemeno	0,44	-----	-----	0,56	2,90	-----	2,94	-----
aromadendreno	2,75	1,46	0,76	1,08	2,63	1,21	2,21	0,87
6,9-guaiadieno	0,79		-----	-----	1,19	-----	2,37	-----
alloaromadendreno	-----	-----	-----	-----	0,45	-----	-----	-----
E-muurola-3,5-dieno	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,96	-----
α-humuleno	12,15	0,45	0,66	5,66	2,97	0,19	1,63	0,73
9-*epi*-*E*-cariofileno	1,92	-----	0,38	1,35	1,28	0,19	1,11	0,24
10-*epi*-*β*-acoradieno	0,95	0,84	-----	-----	-----	-----	-----	-----
γ-gurjuneno	1,08	0,36	-----	-----	0,33	0,88	-----	-----
γ-muuroleno	0,51	-----	1,23	-----	1,20	-----	0,74	0,45
curcumeno	-----	4,37	-----	-----	-----	-----	-----	-----
germacreno D	6,31	-----	-----	1,93	10,93	-----	4,97	-----
β-selineno	2,69	2,56	0,54	-----	2,23	4,31	1,65	2,23
γ-patchouleno	-----	-----	-----	-----	-----	0,92	-----	-----
E-*β*-guaieno	7,79	1,06	-----	0,25	-----	-----	4,10	-----
valenceno	-----	-----	-----	0,31	0,82	-----	-----	-----
biciclogermacreno	15,71	-----	-----	-----	15,16	-----	19,08	-----
Z-*γ*-bisaboleno	1,34	-----	-----	-----	2,24	-----	1,60	-----
α-muuroleno	-----	-----	0,93	0,31	0,36	0,24	-----	0,33
Z-calameneno	-----	-----	-----	0,75	-----	-----	-----	4,58
α-cadineno	-----	-----	-----	0,18	0,11	-----	0,11	-----

Componentes	FCF Jul	FCF Dez	EEA Jul	EEA Dez	CB Jul	CB Dez	FCA Jul	FCA Dez
γ-cadineno	0,65	0,41	1,50	1,86	1,31	0,59	0,63	-----
δ-cadineno	5,46	-----	-----	1,92	4,92	-----	-----	-----
E-cadina-1,4-dieno	0,21	-----	-----	-----	-----	-----	1,46	-----
germacreno B	-----	1,74	-----	-----	1,21	1,73	1,30	-----
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	**86,98**	**14,98**	**7,73**	**25,9**	**85,09**	**23,84**	**78,76**	**12,03**
silfiperfol-5-en-3-ol A	-----	1,64	-----	-----	-----	2,27	-----	-----
cubebol	-----	-----	-----	-----	-----	0,31	-----	-----
maliol	0,51	-----	0,48	-----	-----	-----	0,48	-----
E-nerolidol	-----	-----	0,82	1,23	-----	-----	-----	-----
palustrol	-----	0,62	2,10	1,57	0,62	1,94	0,75	1,38
espatulenol	1,26	24,37	20,26	14,99	1,13	16,65	2,37	29,92
óxido de cariofileno	-----	13,81	-----	8,74	-----	21,61	-----	-----
globulol	1,75	-----	10,35	-----	1,64	-----	1,67	10,51
rosifoliol	-----	-----	6,81	-----	-----	-----	-----	-----
viridiflorol	1,47	4,48	-----	4,80	1,18	3,14	2,24	3,25
guaiol	-----	-----	-----	-----	1,15	------	-----	-----
ledol	-----	0,03	-----	-----	-----	0,94	-----	2,67
epóxido de humuleno II	-----	15,09	8,13	8,77	-----	3,62	-----	9,26
5-*epi*-7-*epi*-*α*-eudesmol	-----	-----	3,22	2,74	-----	-----	-----	-----
junenol	-----	-----	1,37	0,99	-----	-----	1,73	-----
Z-cadin-4-en-7-ol	-----	-----	2,30	2,57	0,11	0,62	-----	2,74
γ-eudesmol	0,82	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
cubenol	0,25	-----	4,67	1,44	-----	-----	0,97	1,41
α-muurolol	0,44	-----	1,40	5,35	0,53	0,47	-----	-----
α-cadinol	-----	1,44	9,21	7,63	0,88	-----	-----	-----
bulnesol	-----		-----	-----	0,74	4,40	-----	-----
Z-*α*-santalol	-----	-----	-----	-----	-----	2,51	-----	-----
α-eudesmol	1,38	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sesquiterpenos Oxigenados	**7,88**	**61,48**	**71,12**	**60,82**	**7,98**	**58,48**	**10,21**	**61,14**
Identificado	**95,2**	**78,2**	**78,8**	**86,7**	**93,0**	**82,3**	**88,9**	**73,1**

*monoterpeno

O 10-*epi*-*β*-acoradieno foi identificado somente na população FCF Jul (0,9 %) e FCF Dez (0,8 %), assim como o *E*-nerolidol na população EEA (Jul/Dez 16) e o bulnesol na população CB Jul (0,7 %) e CB Dez (4,4 %), enquanto o *γ*-gurjuneno foi identificado nas populações FCF Jul (1,0%), FCF Dez (0,3 %), CB Jul (0,3 %) e CB Dez (0,8 %). O bulnesol (2,2 %) e o *γ*-gurjuneno (1,5 %) foram identificados no OE das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (Tininis *et al.*, 2006; Spósito *et al.*, 2019). O *E*-nerolidol poderia ser considerado um componente do OE típico da var. *lingua*, contudo foi identificado no OE das folhas frescas e secas da var. *sylvestris* (Tabela 9). De acordo com os resultados e os dados da literatura os componentes minoritários 10-*epi*-*β*-acoradieno, bulnesol e *γ*-gurjuneno podem ser considerados componentes típicos do OE da var. *sylvestris* (Figura 34).

O *α*-copaeno, *β*-elemeno, aromadendreno, *α*-humuleno e espatulenol foram os únicos componentes do OE presentes em todas as populações (FCF, EEA, CB e FCA) em ambas as coletas (Jul e Dez/16), porém somente o *β*-elemeno e o espatulenol podem ser considerados marcadores analíticos para o OE das folhas de *C. sylvestris*.

Figura 32. Estruturas químicas dos componentes majoritários do OE de folhas de *C. sylvestris*. A: espatulenol, B: óxido de cariofileno, C: biciclogermacreno, D: epóxido de humuleno II, E: *β*-elemeno e F: *α*-humuleno.

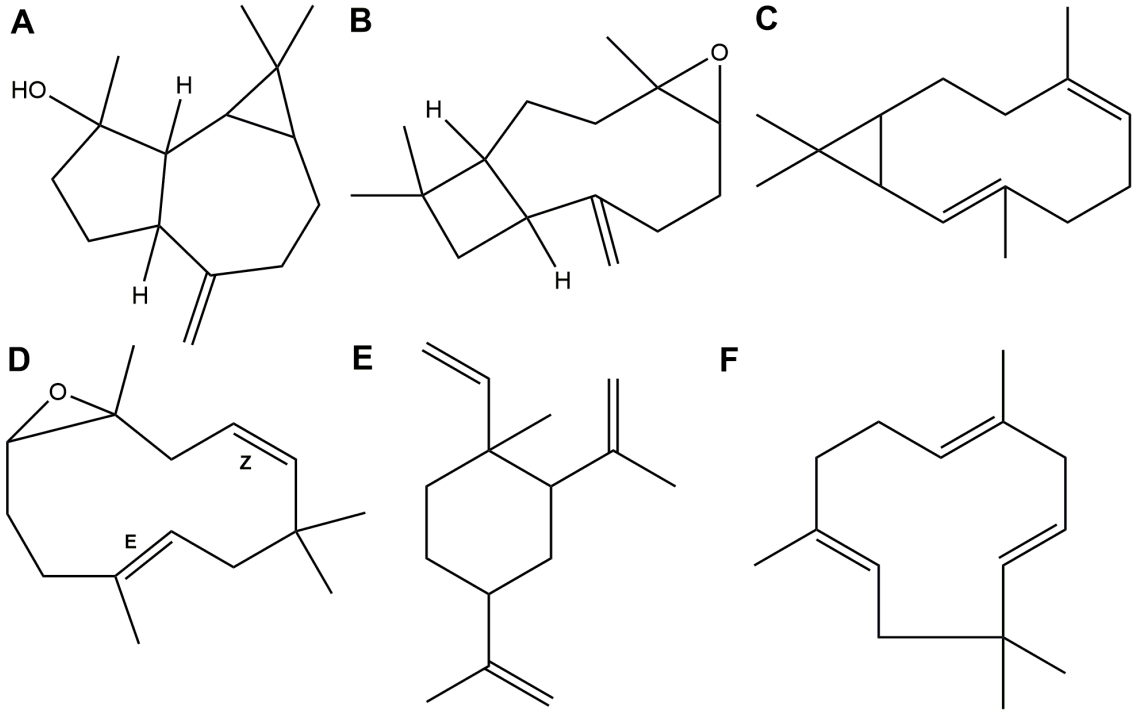


Figura 33. Estruturas químicas: A) monoterpeno limoneno e B) sesquiterpeno aromático curcumeno.

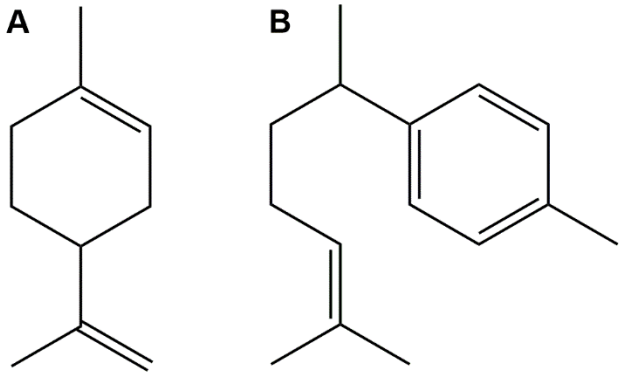
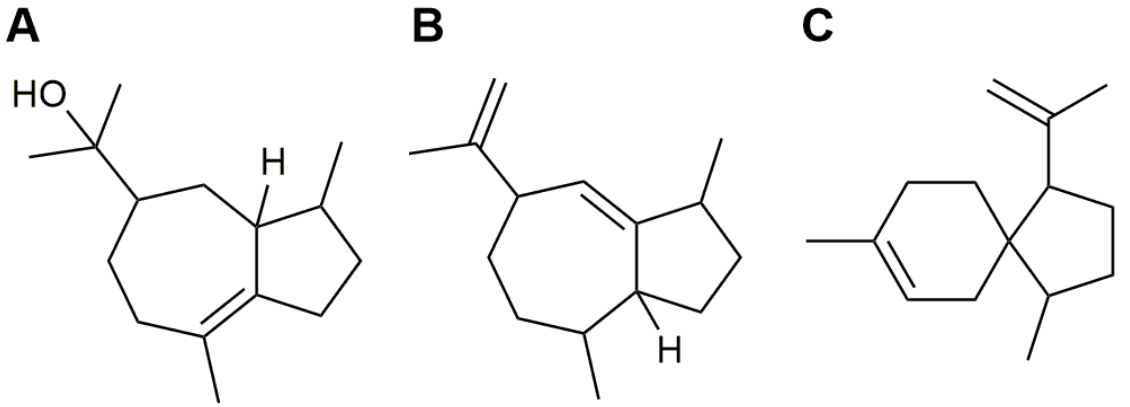


Figura 34. Componentes do OE específicos da var. *sylvestris*, A: bulnesol, B: *γ*-gurjuneno, C: 10-*epi*-*β*-acoradieno, conforme as análises populacionais e de folhas secas e folhas frescas.



Os OE analisados são compostos por sesquiterpenos e nos cromatogramas expandidos (CG-EM) que corresponde a faixa de t_R dos componentes identificados no OE das populações FCF, EEA, CB e FCA (Figuras 35 e 36) são apresentados os principais componentes do OE possibilitando verificar variação nos componentes e teor do OE entre os meses (Julho e Dez/16) e entre as populações. Nos cromatogramas completos são possíveis verificar que os componentes do OE eluíram apenas entre os t_R de 31,000 - 46,000 Figuras 1 e 2, Apêndice 4).

Figura 35. CG-EM expandidos do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA (10 espécimens de cada população, respectivamente) das coletas de Jul e Dez/2016. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).

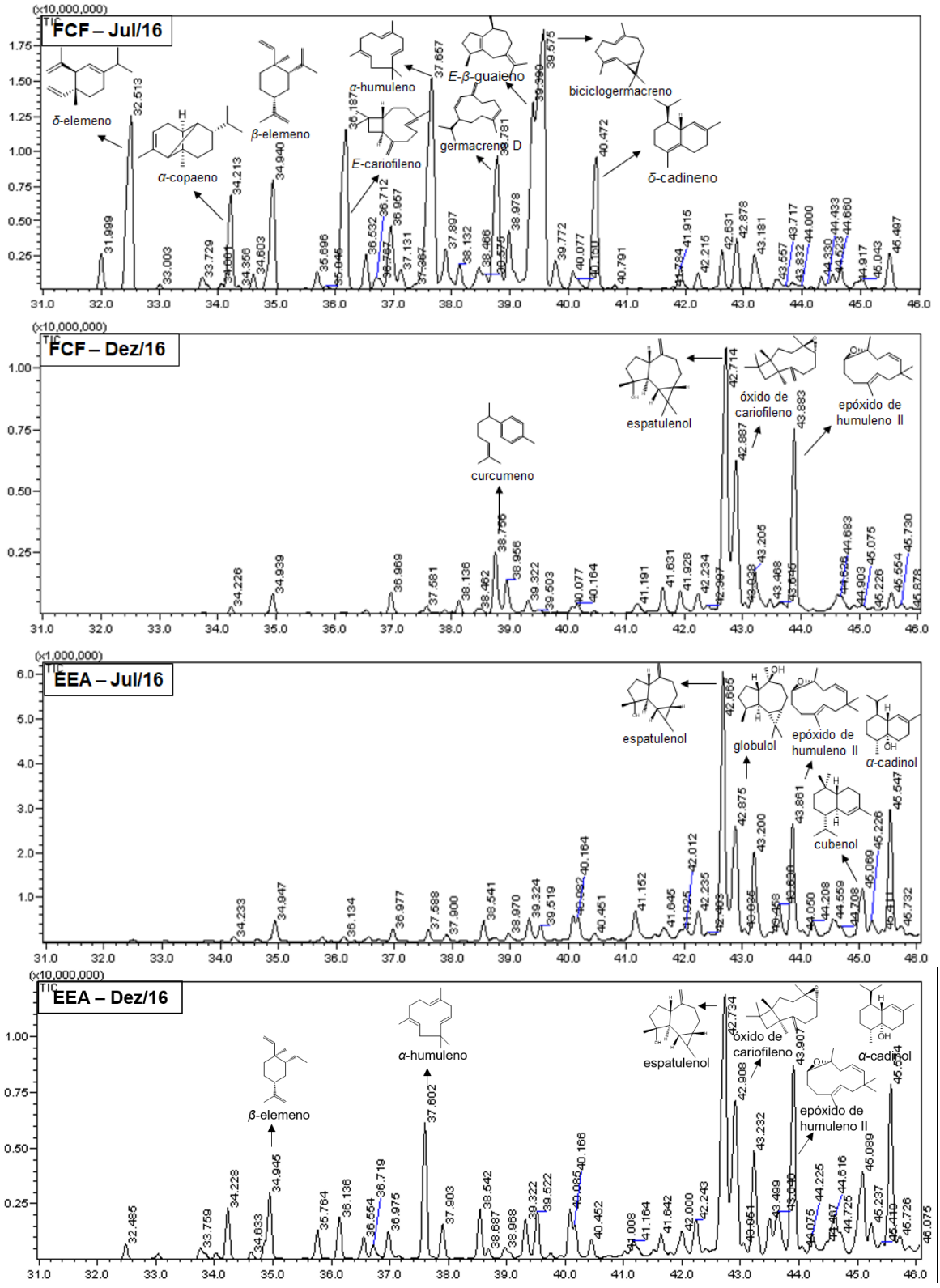
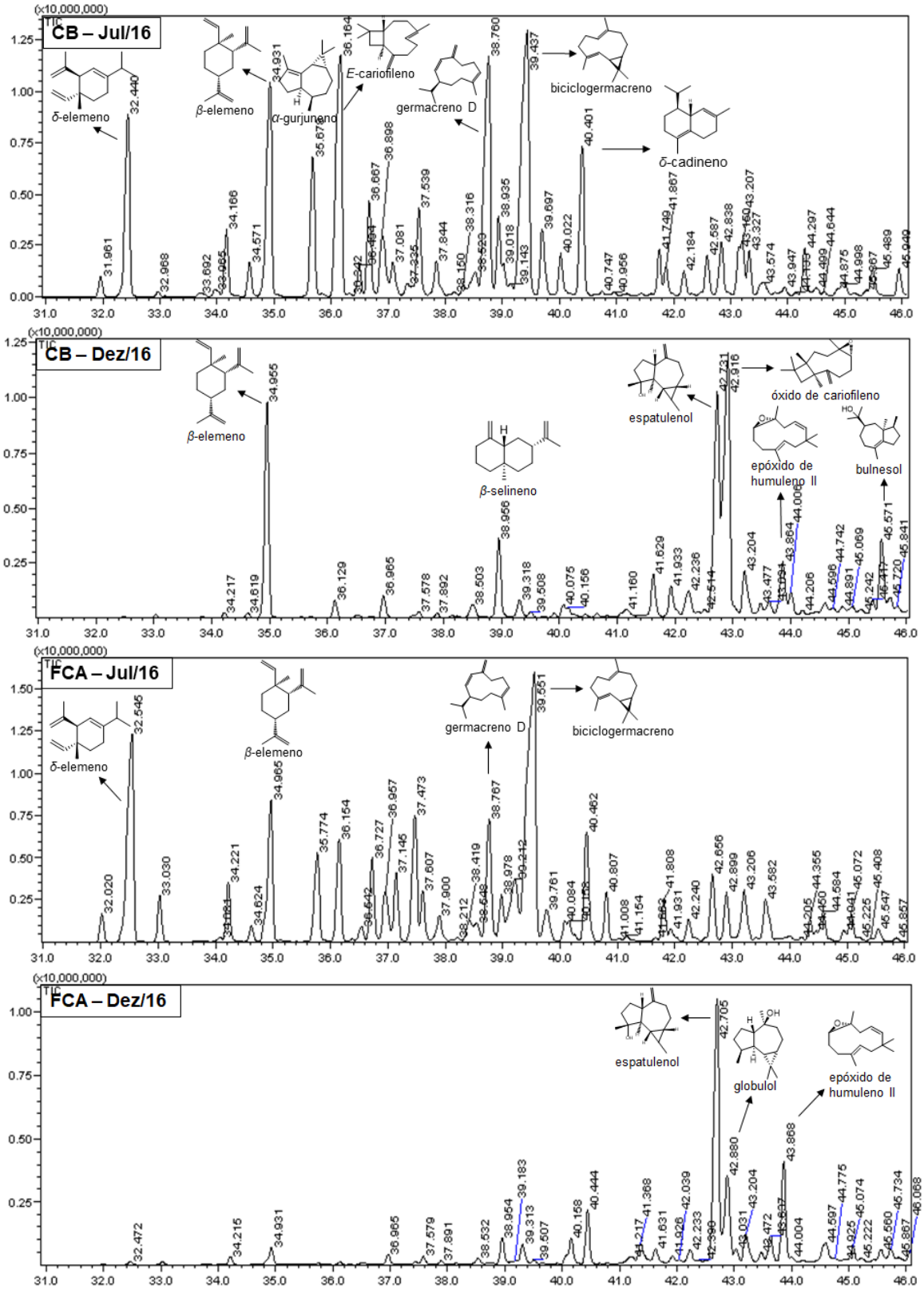


Figura 36. CG-EM expandidos do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações CB e FCA (10 espécimens de cada população, respectivamente) das coletas de Jul e Dez/2016. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).

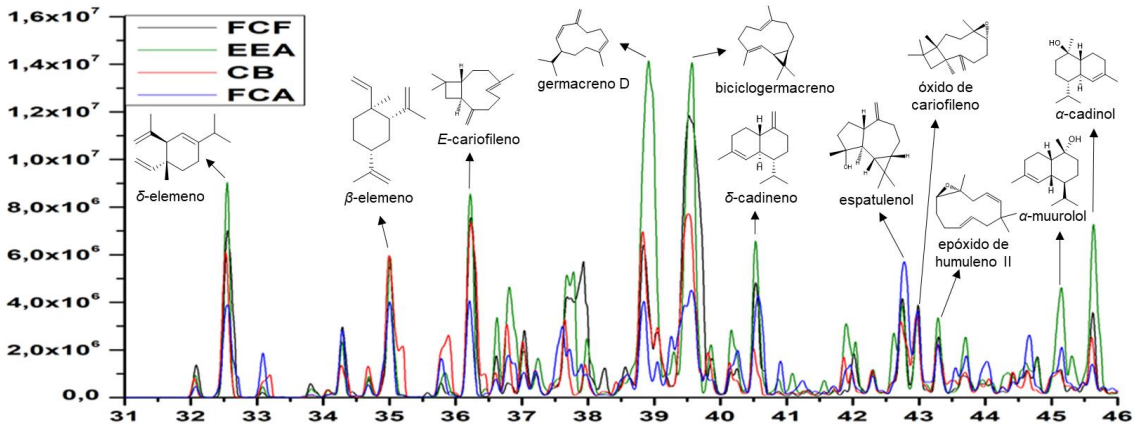


5.6.2.2 Perfil cromatográfico (*Fingerprint*) do OE de folhas de *C. sylvestris*

Os perfis cromatográfico dos OE das populações FCF, EEA, CB e FCA apresentaram os mesmos picos cromatográficos com diferenças em relação a intensidade, indicando que não há diferenças qualitativa e sim quantitativa (Figura 37). Os picos cromatográficos dos componentes do OE como o *δ*-elemeno, *β*-elemeno, *E*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, *δ*-cadineno, *α*-muurolol e *α*-cadinol apresentaram maior intensidade na população EEA, em relação as populações FCF, CB e FCA, sugerindo que na var. *sylvestris* a variação quantitativa foi menor.

O perfil cromatográfico populacional indica que o *δ*-elemeno, *E*-cariofileno, germacreno D, *α*-muurolol e *α*-cadinol apresentam maiores teores no OE das folhas na *C. sylvestris* var. *lingua* (população EEA), enquanto, que no OE das folhas das populações FCF, CB (var. *sylvestris*) e FCA (forma intermediária) o teor destes componentes foi semelhante. Cada linha do perfil cromatográfico populacional do OE é representada por 10 espécimens coletados nos meses de Jul e Dez/16, totalizando 20 amostras cada linha.

Figura 37. Perfil cromatográfico populacional do OE das folhas de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA.

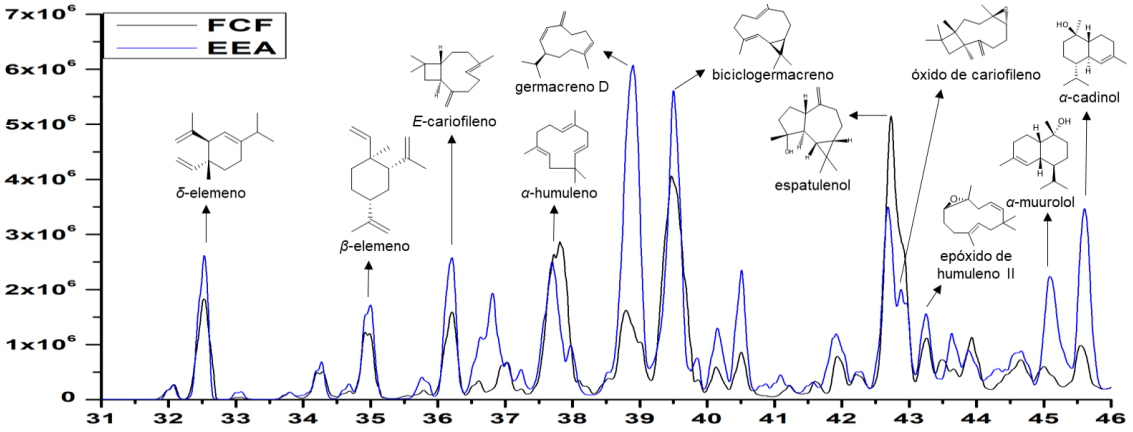


Considerando que o *fingerprint* da var. *sylvestris*/forma intermediária (populações FCF, CB e FCA) foram semelhantes, sugere-se que os fatores climáticos não interferiram na composição química do OE. Entretanto, as diferenças quantitativa na composição do OE entre a var. *sylvestris*/forma

intermediária (populações FCF, CB e FCA) e var. *lingua* (população EEA), sugerem-se que os fatores genéticos influenciaram na composição química do OE das folhas das variedades de *C. sylvestris*.

O perfil cromatográfico sazonal dos OE das populações FCF e EEA apresentaram composição química semelhante, contudo, com algumas diferenças em relação a intensidade dos picos de alguns componentes (Figura 38). Os componentes do OE que apresentaram maiores diferenças na intensidade na população EEA em relação a população FCF foram o germacreno D, *α*-muurolol e *α*-cadinol. Através do *fingerprint* sazonal foi possível sugerir que o OE da *C. sylvestris* var. *lingua* pode se diferenciar da *C. sylvestris* var. *sylvestris* com base no maior teor do germacreno D, *α*-muurolol e *α*-cadinol. Cada linha do perfil cromatográfico sazonal do OE é representada por 10 espécimens coletados mensalmente, durante 24 meses de coleta, totalizando 240 amostras cada linha.

Figura 38. Perfil cromatográfico do OE das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (população FCF) e *C. sylvestris* var. *lingua* (população EEA).

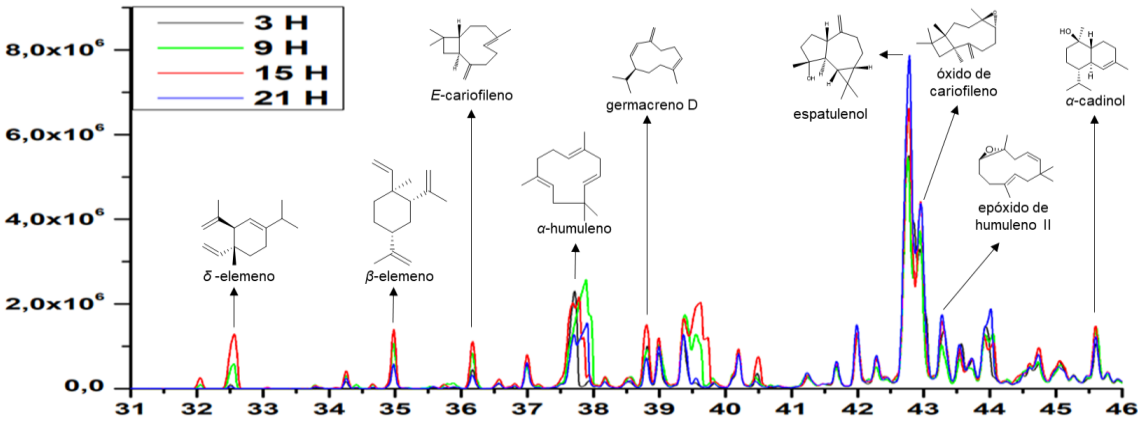


O perfil cromatográfico pode ser utilizado como um cromatograma padrão para determinada amostra, sendo referência no controle de qualidade para identificação, análise de adulterantes (Liang *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2012; Salcedo *et al.*, 2016), local de origem da amostra (Wang *et al.*, 2019), principalmente quando associado a técnicas quimiométricas (Gutierrez *et al.*, 2012). Para obter o perfil cromatográfico foi utilizado o t_R de 31 a 46 min, que corresponde a faixa de tempo onde são eluídos os componentes do OE presentes nas variedades de *C. sylvestris*.

Os componentes relacionados a *C. sylvestris* foram *δ*-elemeno, *β*-elemeno, *E*-cariofileno, *α*-humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, *δ*-cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *α*-muurolol e *α*-cadinol, embora o *α*-copaeno (componente minoritário), *β*-elemeno, *α*-humuleno e espatulenol podem ser considerados os componentes típicos, pois foram identificados em todas as análises populacionais, sazonais e circadianas do OE e nas folhas *in natura* (item 5.6.2.3). Ressalta-se que tais componentes podem ser identificados no OE de outras espécies, portanto não são considerados exclusivos da *C. sylvestris*.

O perfil cromatográfico circadiano do OE da var. *sylvestris* (população FCF) apresentou diferenças na intensidade dos componentes do OE (Figura 39). Através da análise do *fingerprint* observou-se que o horário da coleta influenciou na composição química do OE da var. *sylvestris*, pois foram observadas variações na intensidade dos picos cromatográficos do *δ*-elemeno, *α*-humuleno e do componente do OE referente ao t_R de 39,5 min. Dessa maneira, sugere-se que os fatores climáticos influenciaram na composição do OE na análise circadiana da var. *sylvestris*, porém sem interferir no rendimento de OE. Cada linha do perfil cromatográfico circadiano da população FCF é representado por 10 espécimens (Fev/Ago), totalizando 20 amostras.

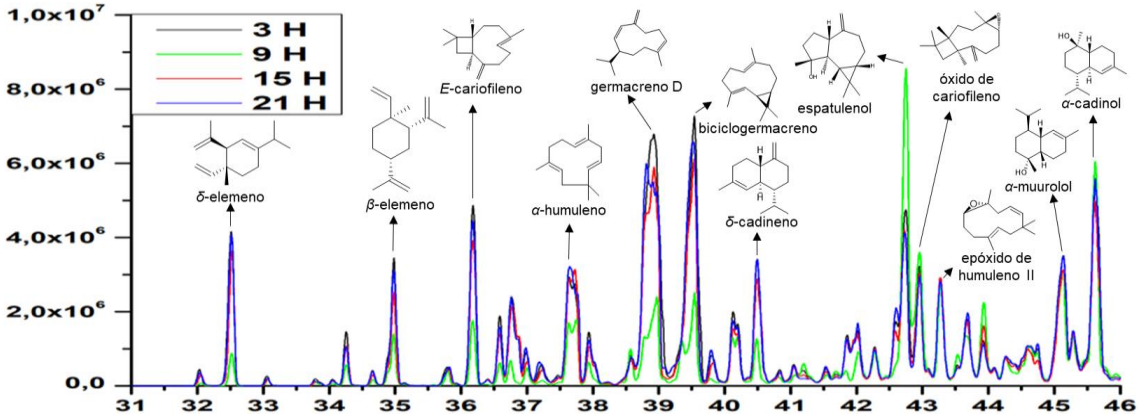
Figura 39. Perfil cromatográfico circadiano do OE das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (população FCF).



O perfil cromatográfico circadiano do OE da var. *lingua* (população EEA) apresentou algumas diferenças na intensidade de alguns picos cromatográficos (Figura 40). Componentes do OE como o *β*-elemeno, *α*-humuleno, *δ*-cadineno,

óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *α*-muurolol e *α*-cadinol não apresentaram diferenças entre os horários analisados. Contudo, o *δ*-elemeno, *E*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno apresentaram menor intensidade, enquanto o espatulenol apresentou maior intensidade às 9 h, em relação aos demais horários. O perfil cromatográfico da população EEA é representado por 10 espécimens (Fev/Ago), totalizando 20 amostras cada linha.

Figura 40. Perfil cromatográfico circadiano do OE das folhas de *C. sylvestris* var. *lingua* (população EEA).



Os fatores climáticos podem ser atribuídos ao maior teor de espatulenol e menores teores de *δ*-elemeno, *E*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno às 9 h, pois o alto IUV e a temperatura diferiram dos demais horários (Tabela 5, Apêndice 1). O fato do teor de espatulenol ser superior pode ser relacionado ao fato do aumento da temperatura favorecer a degradação de biciclogermacreno e formação do espatulenol (Toyota *et al.*, 1996), pois o biciclogermacreno apresentou maiores teores nos demais horários.

Apesar das diferenças quantitativas observadas, as quatro populações mostram perfil qualitativo muito semelhante com a presença de 11 sesquiterpenos majoritários (*δ*-elemeno, *β*-elemeno, *E*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, *δ*-cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *α*-muurolol e *α*-cadinol, Figuras 41 e 42), assim como os outros componentes minoritários comuns às populações e não identificados, podem ser considerados no estabelecimento de um *Fingerprint* para o OE de folhas de

C. sylvestris, aplicável na verificação da sua autenticidade. Os componentes considerados típicos do OE de *C. sylvestris* foram o *α*-copaeno, *β*-elemeno, *α*-humuleno e espatulenol e provavelmente serão identificados em qualquer análise do OE das folhas de *C. sylvestris*. Para diferenciar a var. *lingua* da var. *sylvestris*, sugere-se a análise do teor do germacreno D, *α*-muurolol e *α*-cadinol, pois apresentaram maiores teores na população EEA nas análises populacional e sazonal.

Figura 41. Espectro de massas do *β*-elemeno, *E*-cariofileno, *α*-humuleno e germacreno D (componentes majoritários) do OE das folhas de *C. sylvestris*.

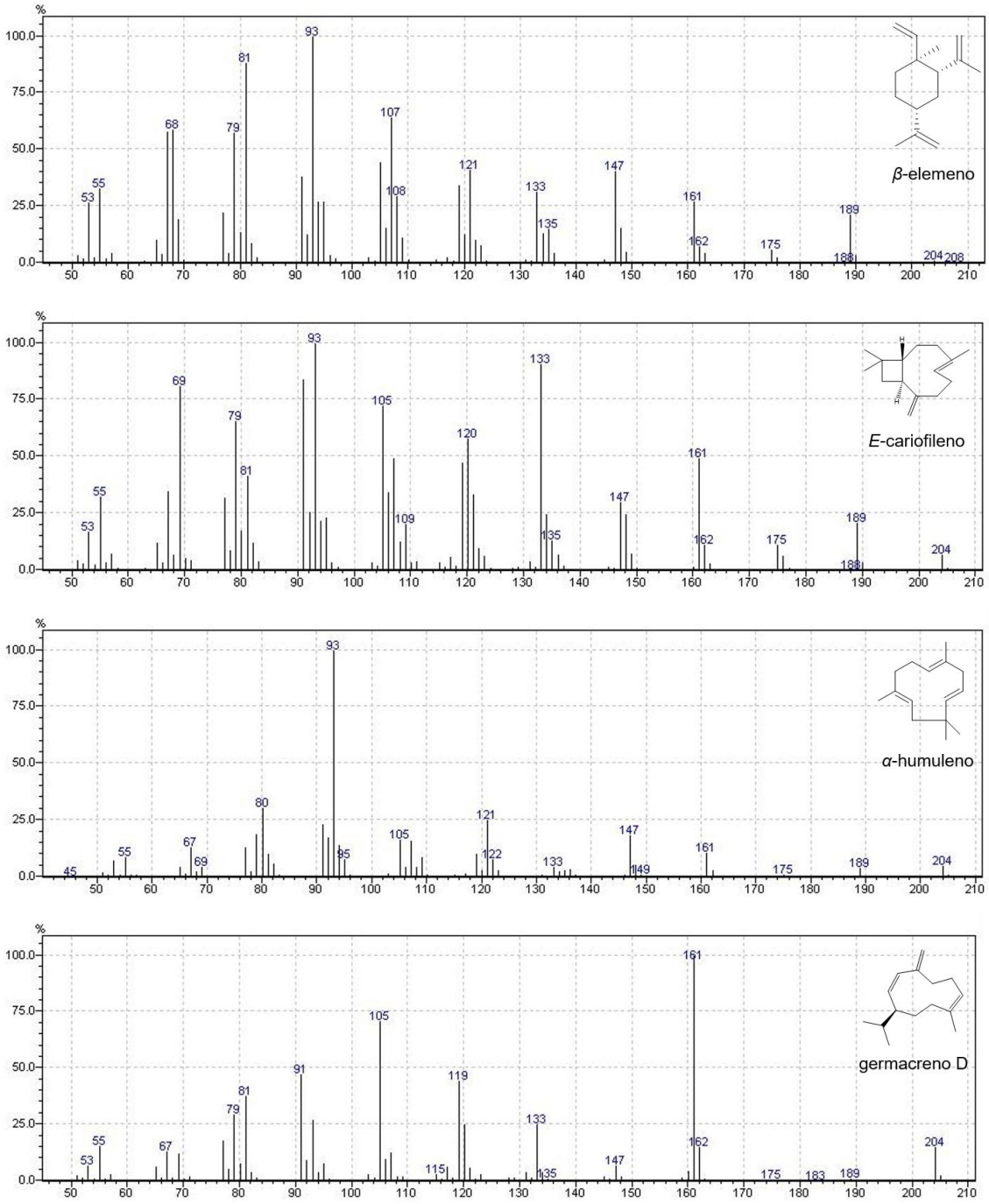
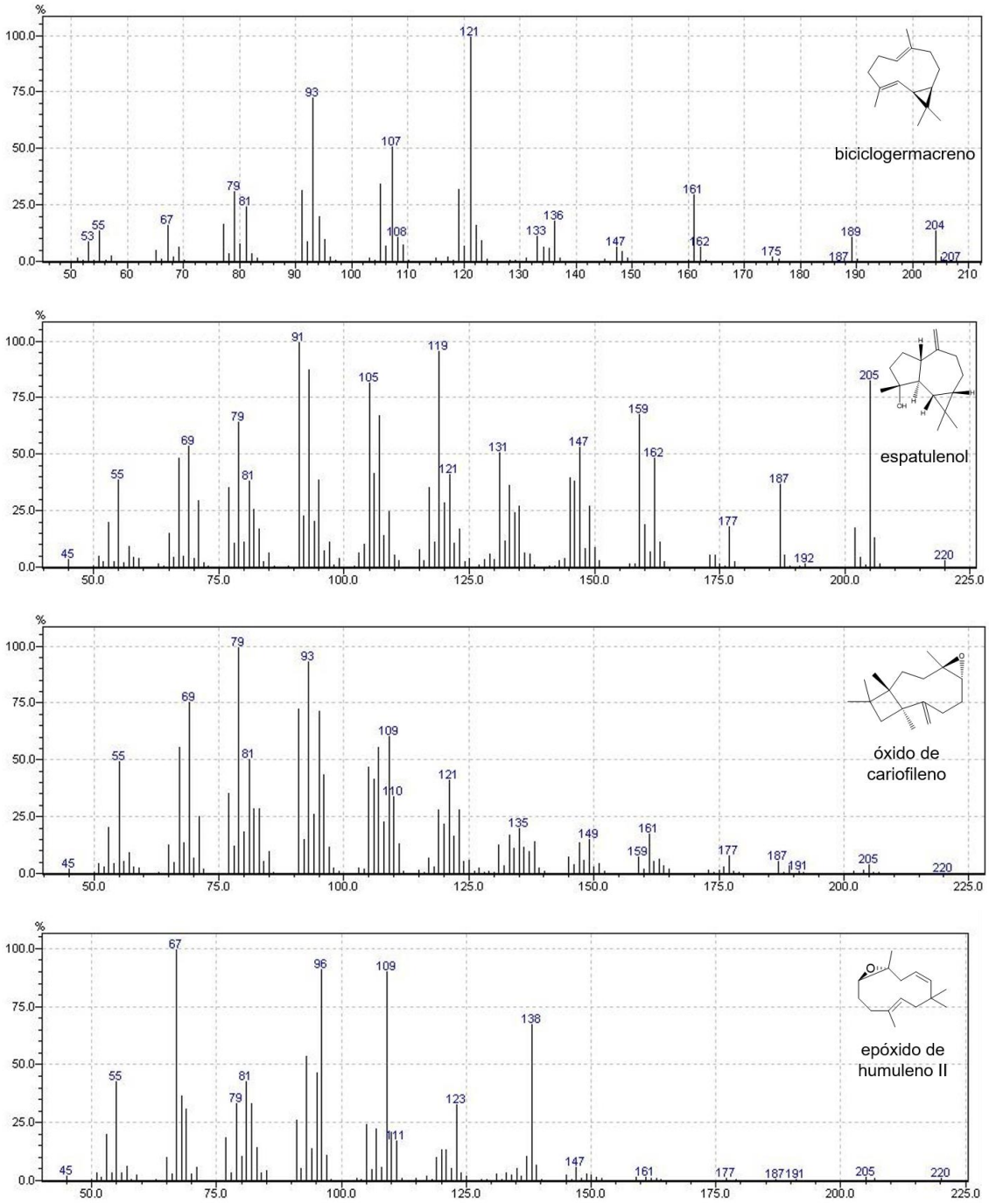


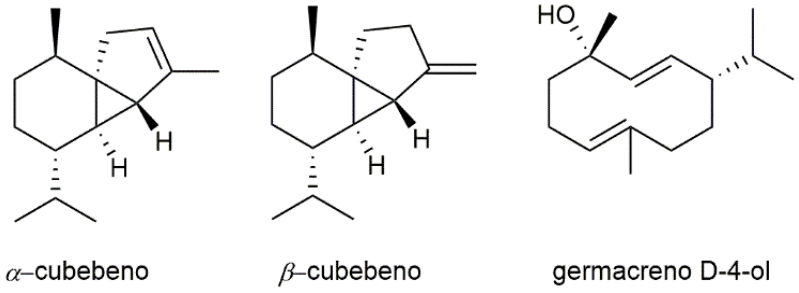
Figura 42. Espectro de massas do biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e epóxido de humuleno II (componentes majoritários) do OE das folhas de *C. sylvestris*.



5.6.2.3 Análise comparativa dos componentes voláteis *in natura*, do OE das folhas frescas e das folhas secas (FCF e EEA)

Foram identificados somente sesquiterpenos entre os componentes voláteis das folhas *in natura* (populações FCF e EEA), indicando que na *C. sylvestris* não há monoterpenos, embora já foram relatados pontualmente na literatura. Apenas nas folhas *in natura* foram identificados o *α*-cubebeno e *β*-cubebeno nas var. *sylvestris* e var. *lingua*, enquanto o germacreno D-4-ol foi identificado na var. *sylvestris* (Figura 43).

Figura 43. Componentes do OE identificado apenas folhas *in natura* da *C. sylvestris*.



O curcumeno e o *α*-selineno foram os componentes específicos do OE da população FCF, e na população EEA o elemol, *γ*-eudesmol, *α*-muurolol, cubenol, rosifoliol e globulol foram os componentes específicos. O único componente do OE que foi identificado apenas nas folhas frescas da população EEA foi o *γ*-elemeno, entretanto, não é um componente específico das folhas frescas, pois já foi identificado nas folhas secas do OE de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA (Tabela 8) e por outros autores (Tabela 2).

Nas folhas *in natura* da população FCF, o teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos foi de 85,4 %, diminuindo para 34,8 % no OE das folhas frescas e reduzindo para 17,2 % no OE das folhas secas, enquanto o teor de sesquiterpenos oxigenados de 3,0 % nas folhas *in natura* aumentou para 48,4 % no OE das folhas frescas e para 65,4 % no OE das folhas secas. Na população EEA, o teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos nas folhas *in natura* foi de 77,0 %, no OE das folhas frescas foi de 70,6 % e no OE das folhas secas foi de 6,9 %, enquanto o teor de sesquiterpenos oxigenados de 5,5 % nas

folhas *in natura* aumentou para 22,0 % no OE das folhas frescas e para 72,5 % no OE das folhas secas.

Na população EEA o teor de sesquiterpenos hidrocarbonetos no OE das folhas frescas não foi proporcional a população FCF, devido o teor de *δ*-elemeno, *γ*-elemeno, biciclogermacreno, *δ*-cadineno e germacreno B aumentarem na população EEA, diferente da população FCF onde diminuíram e também o fato de que no OE das folhas frescas da população EEA o teor de componentes identificados foi maior.

Através dos processos de secagem e extração os sesquiterpenos hidrocarbonetos passaram por reações químicas, transformando em sesquiterpenos oxigenados. De acordo com Spandre (2010) após a secagem os sesquiterpenos hidrocarbonetos diminuíram de 72,5 para 70,6 %, enquanto os sesquiterpenos oxigenados diminuíram de 22,5 para 17,6 %, portanto a variação foi pequena e não houve aumento dos sesquiterpenos oxigenados, semelhante aos resultados de Amaral *et al.* (2017) que verificou aumentos dos sesquiterpenos hidrocarbonetos de 51,3 para 57,5 % e diminuição dos sesquiterpenos oxigenados de 30,8 para 24,0 %. A secagem foi realizada com circulação de ar, sendo que Spandre (2010) secou por 7 d e (Amaral *et al.*, 2017) 1 d, entretanto era esperada que o maior tempo de secagem proporcionasse um aumento maior no teor dos sesquiterpenos oxigenados em relação resultados deste trabalho, que empregou 3 d de secagem com circulação de ar.

O teor de *α*-copaeno, *E*-cariofileno, germacreno D nas populações FCF e EEA reduziu após a extração do OE das folhas frescas e manteve a redução no OE das folhas secas, assim como o *α*-humuleno na população EEA e o *α*-selineno na população FCF. O *α*-humuleno não seguiu o padrão de redução apresentado na população EEA, pois não foi identificado no OE das folhas frescas da população FCF e apresentou maior teor do que nas folhas *in natura*. O biciclogermacreno apresentou aumento de teor no OE das folhas frescas e não foi identificado no OE das folhas secas (população EEA), enquanto o *δ*-cadineno que foi o componente majoritário nas folhas *in natura* (população FCF) não foi identificado no OE das folhas frescas e folhas secas.

Em ambas as populações (FCF e EEA), o viridiflorol foi identificado no OE das folhas frescas com aumento de teor no OE das folhas secas, como não

foi identificado nas folhas *in natura* foi formado durante as etapas de secagem e extração. O óxido de cariofileno aumentou o teor no OE após a secagem e extração na população FCF, entretanto, só foi identificado no OE das folhas secas na população EEA. O epóxido de humuleno II não foi identificado nas folhas *in natura*, mas foi identificado no OE das folhas frescas e seu teor aumentou no OE das folhas secas da população FCF, porém, só foi identificado no OE das folhas secas da população EEA. O *α*-cadinol foi identificado no OE das folhas secas da população FCF e no OE das folhas frescas e folhas secas da população EEA. O *α*-muurolol foi identificado apenas no OE das folhas frescas da população EEA, com aumento de teor no OE das folhas secas. O teor de espatulenol aumentou no OE das folhas frescas e diminuiu no OE das folhas secas da população FC. Já na população EEA, o teor de espatulenol nas folhas *in natura* diminuiu em relação ao OE das folhas frescas e aumentou no OE das folhas frescas.

Os componentes majoritários voláteis nas folhas *in natura* da população FCF foram o *δ*-cadineno (26,8 %), *E*-cariofileno (18,6 %), *α*-copaeno (13,8 %) e *α*-selineno (10,8 %), já no OE das folhas frescas foram o espatulenol (29,2 %), óxido de cariofileno (9,4 %) e o *E*-*β*-farneseno (9,02 %); e no OE das folhas secas foram o epóxido de humuleno II (20,0 %), espatulenol (17,8 %) e o óxido de cariofileno (13,7 %) (Tabela 11 e Figura 44).

Na população EEA, os componentes majoritários voláteis das folhas *in natura* foram o germacreno D (30,9 %) e o *α*-humuleno (22,2 %), já no OE das folhas frescas foram o germacreno B (22,3 %), biciclogermacreno (14,1 %), *α*-humuleno (8,1 %); e no OE das folhas secas foram o espatulenol (21,6 %), epóxido de humuleno II (12,9 %) e óxido de cariofileno (10,8 %) (Tabela 11 e Figura 45). Dados como nome dos componentes, t_R, índice de retenção calculado, índice de retenção identificado, similaridade dos espectros de massas e teor dos componentes do OE estão nas Tabelas 1 a 6, Apêndice 5.

Os teores de OE das folhas frescas e folhas secas de *C. sylvestris* foram estatisticamente diferentes nas variedades *sylvestris* e *lingua*, além de que a composição do OE das folhas frescas foi diferente do OE das folhas secas em ambas as variedades, podendo influenciar na atividade biológica do OE, ou seja, os OE das folhas frescas e folhas secas podem apresentar diferentes ações farmacológicas. A composição OE das folhas frescas e do OE das folhas

secas foram diferentes em relação aos componentes voláteis das folhas *in natura* em ambas as variedades. Os métodos de secagem das folhas e extração do OE utilizados propiciaram reações químicas que modificaram os componentes do OE, entretanto, a composição do OE pode influenciar na atividade biológica pode-se direcionar o tipo de secagem e extração em função da atividade desejada.

Tabela 11. Composição química e teor (%) dos componentes voláteis das folhas *in natura*, folhas secas e frescas de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA (10 espécimens de cada população, respectivamente) analisados por CG-EM.

Componentes	FCF – Folhas *in natura*	FCF – OE Folhas Frescas	FCF – OE Folhas Secas	EEA – Folhas *in natura*	EEA – OE Folhas Frescas	EEA – OE Folhas Secas
α-copaeno	13,83	1,85	0,77	1,51	0,13	0,27
δ-elemeno	0,40	0,30	-----	0,71	5,43	-----
α-cubebeno	1,05	-----	-----	0,34	-----	-----
β-cubebeno	0,73	-----	-----	0,31	-----	-----
β-elemeno	0,96	3,69	3,35	0,96	2,00	0,91
ciclosativeno	0,50	0,66	-----	-----	-----	-----
α-gurjuneno	-----	0,46	-----	-----	0,48	0,25
E-cariofileno	18,65	3,21	0,60	7,85	3,04	0,25
β-copaeno	0,68	0,90	0,25	1,02	0,82	-----
γ-elemeno	-----	-----	-----	-----	6,02	-----
aromadendreno	-----	1,80	1,06	0,38	0,25	0,45
α-humuleno	2,21	-----	6,04	22,24	8,14	1,69
E-*β*-farneseno	-----	9,02	-----	-----	-----	-----
alloaromadendreno	2,06	0,67	0,37	0,75	0,37	-----
E-cadina-1(6),4-dieno	-----	-----	-----	-----	-----	1,11
γ-muuroleno	0,59	-----	0,65	-----	-----	-----
α-muuroleno	-----	-----	-----	0,35	-----	0,94
curcumeno	-----	4,10	0,24	-----	-----	-----
germacreno D	3,92	-----	-----	30,94	22,32	-----
β-selineno	1,80	2,44	1,94	-----	0,12	-----
α-selineno	10,87	4,67	1,47	-----	-----	-----
γ-selineno	-----	-----	-----	-----	0,83	-----
biciclogermacreno	-----	-----	-----	7,05	14,19	-----
E-*β*-guaieno	-----	0,60	-----	-----	-----	-----
γ-cadineno	0,37	0,47	0,46	0,70	0,50	1,07
δ-cadineno	26,81	-----	-----	1,92	2,89	-----
germacreno B	-----	-----	-----	-----	3,14	-----
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	**85,43**	**34,84**	**17,20**	**77,03**	**70,67**	**6,94**
elemol	-----	-----	-----	-----	0,62	0,26
E-nerolidol	-----	1,77	1,31	-----	1,89	1,27

Componentes	FCF – Folhas *in natura*	FCF – OE Folhas Frescas	FCF – OE Folhas Secas	EEA – Folhas *in natura*	EEA – OE Folhas Frescas	EEA – OE Folhas Secas
globulol	-----	-----	-----	-----	1,79	1,30
maliol	-----	-----	1,56	-----	-----	-----
germacreno D-4-ol	0,54	-----	-----	-----	-----	-----
palustrol	-----	0,83	1,84	-----	0,53	-----
espatulenol	1,15	29,24	17,85	5,49	1,08	21,60
óxido de cariofileno	1,39	9,47	13,74	-----	-----	10,87
viridiflorol	-----	2,90	5,28	-----	2,24	5,05
rosifoliol	-----	-----	-----	2,63	3,31	2,01
epóxido de humuleno II	-----	4,26	20,01	-----	-----	12,97
γ-eudesmol	-----	-----	-----	-----	1,12	0,36
α-muurolol	-----	-----	-----	-----	2,81	5,15
cubenol	-----	-----	-----	-----	0,77	1,13
β-eudesmol	-----	-----	-----	-----	-----	0,70
α-cadinol	-----	-----	2,86	-----	5,89	9,87
Sesquiterpenos Oxigenados	**3,08**	**48,47**	**64,45**	**5,49**	**22,05**	**72,54**
Identificado	**88,5**	**83,3**	**81,6**	**82,5**	**92,7**	**79,4**

Figura 44. CG-EM expandidos dos componentes voláteis das folhas *in natura*, do OE de folhas secas e folhas frescas de *C. sylvestris* da população FCF. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno). A coluna cromatográfica foi cortada em 10 cm em ambas as extremidades antes das análises das folhas *in natura*.

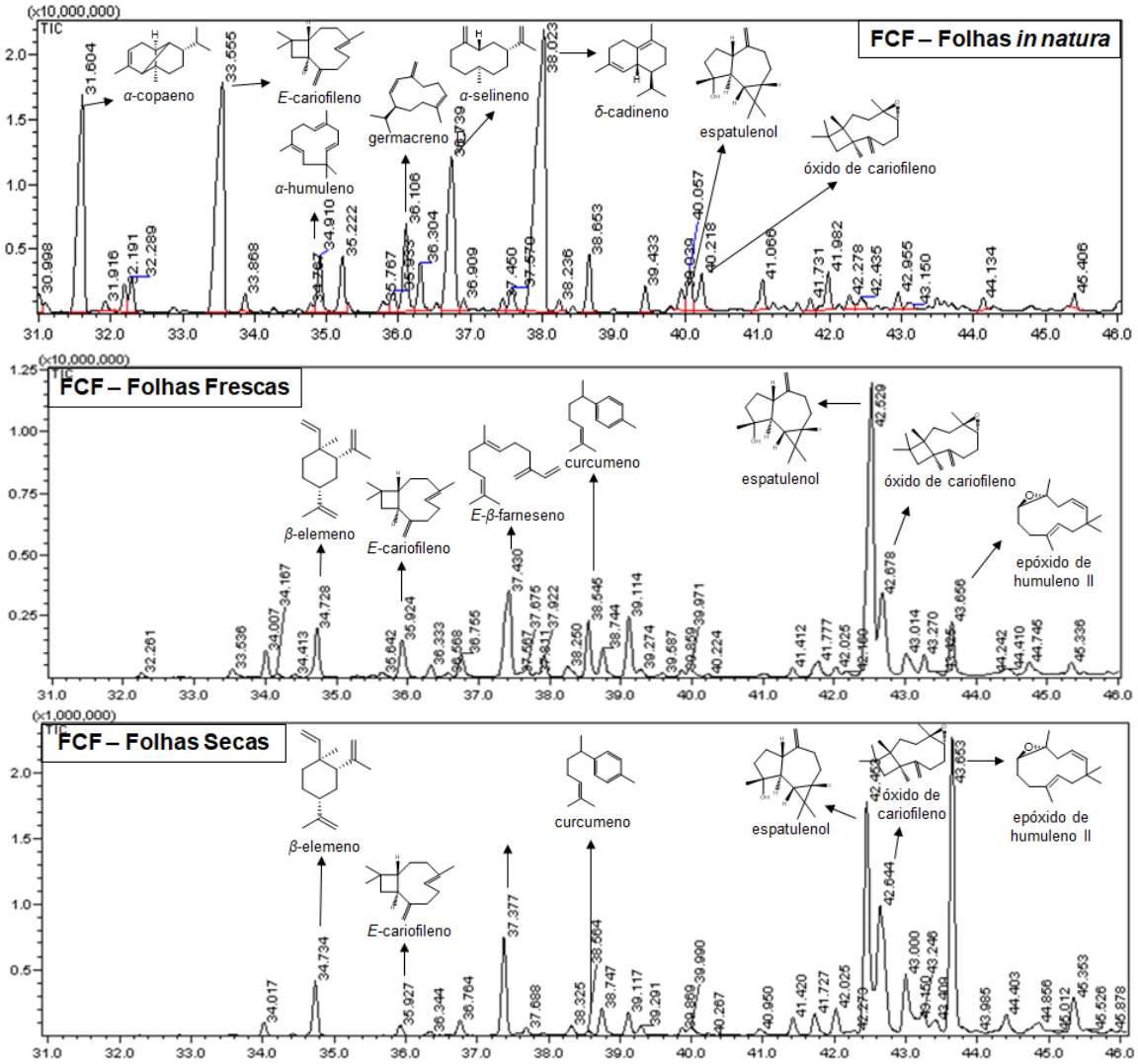
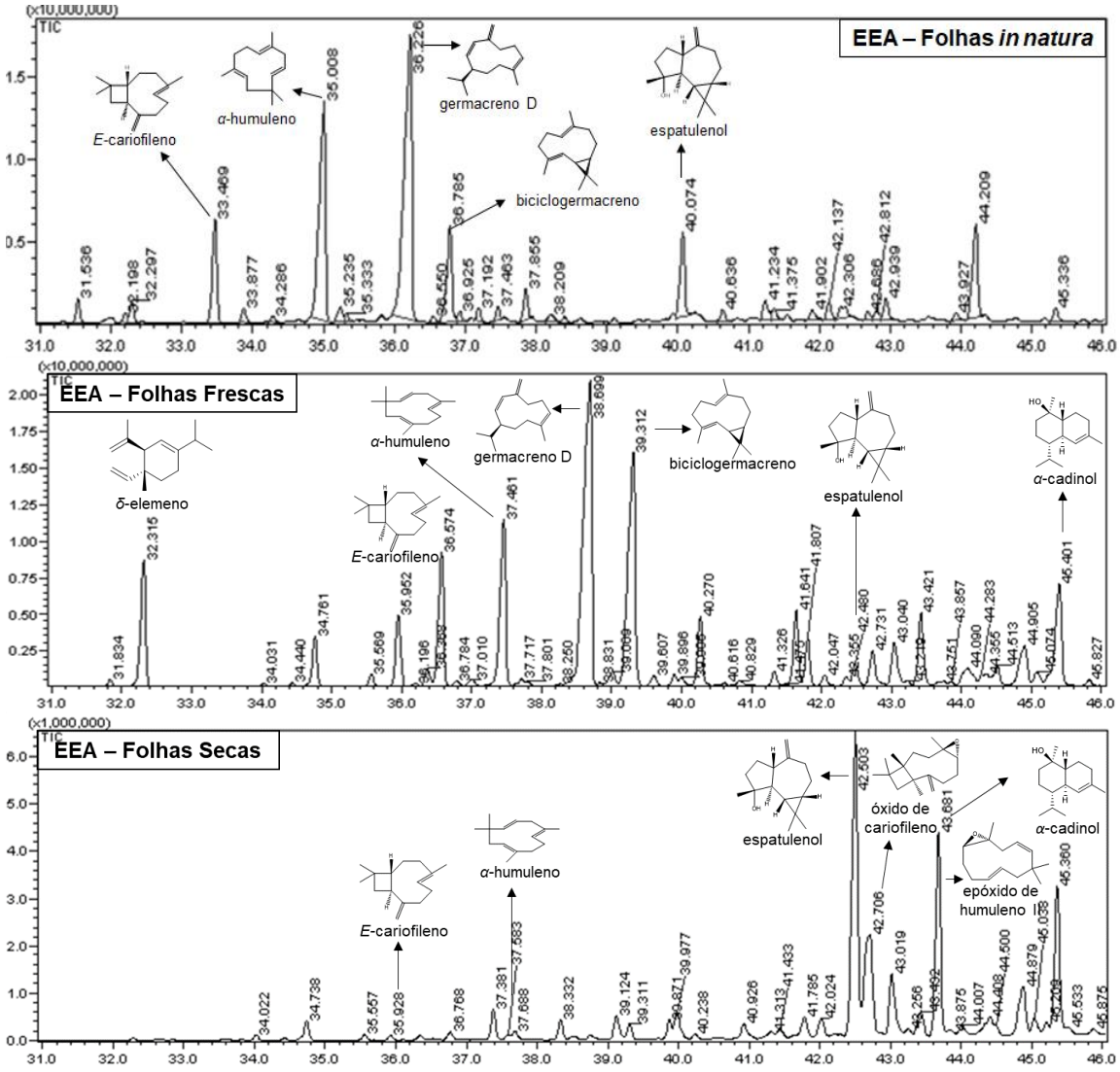


Figura 45. CG-EM expandidos dos componentes voláteis das folhas *in natura*, do OE de folhas secas e folhas frescas de *C. sylvestris* da população EEA. Condições de análise: 60 a 310 ºC - 3º C/ min, por 80 min; temperatura do injetor: 250 ºC; split: 1/20; coluna Rtx5-MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno). A coluna cromatográfica foi cortada em 10 cm em ambas as extremidades antes das análises das folhas *in natura*.

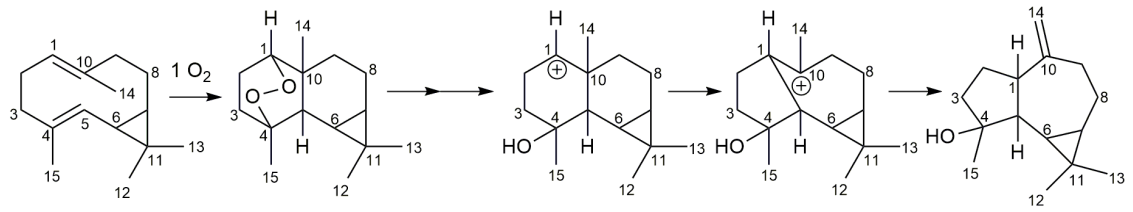


Durante a secagem das folhas e extração do OE ocorrem reações químicas oxidativas e redução de olefinas, como isomerização, polimerização, rearranjo, adição nucleofílica, ciclização e abertura de anéis (Usai *et al.*, 1992; Gopalakrishnan, 1994; Touaibia *et al.*, 2019) e volatilização, o que explicaria a diminuição do teor dos sesquiterpenos hidrocarbonetos após a secagem. Njoroge *et al.* (2003) sugerem que o sesquiterpeno hidrocarboneto biciclogermacreno é oxidado durante a secagem, originando o sesquiterpeno oxigenado espatulenol. De fato, o teor de biciclogermacreno no OE da população EEA foi de 14,1 % nas folhas frescas e após a secagem reduziu para 0 %, enquanto o teor de espatulenol nas folhas frescas foi de 1,0 % e aumentou para 21,6 % após a secagem, enquanto que na população FCF o teor de espatulenol nas folhas *in natura* foi de 1,1 % e aumentou para 29,2 % no OE das folhas frescas, indicando que ocorreram rearranjos e oxidação.

O extrato etéreo de *Scapania stephanii* K. Müller foi analisado por CG-EM, onde foram verificados 2 componentes majoritários (bicicloelemeno e biciclogermacreno) e após 4 meses foi identificado o espatulenol como componente majoritário, com a intensidade do pico do biciclogermacreno reduzida e o bicicloelemeno não sendo identificado. Foi verificado em extratos etéreos de outras amostras frescas a presença do biciclogermacreno, sem identificar o espatulenol e após 8 meses o espatulenol foi identificado nas mesmas amostras sem a presença do biciclogermacreno (Toyota *et al.*, 1996).

Paralelamente o biciclogermacreno foi purificado do extrato etéreo de *Dicranolejeunea yoshinagnna* (S. Hatt.) Mizut. permanecendo em repouso por 4 dias e analisado por CG-EM, onde foi observado a conversão do biciclogermacreno em espatulenol. Ainda conforme Toyota *et al.* (1996) o biciclogermacreno foi convertido em espatulenol, sendo proposto o mecanismo com uma oxidação inicial seguido de rearranjos (Figura 46), semelhante ao mecanismo proposto por Nascimento *et al.* (2018).

Figura 46. Proposta de mecanismo da conversão do biciclogermacreno em espatulenol, adaptado de Toyota *et al.* (1996).



biciclogermacreno espatulenol

Portanto, o biciclogermacreno presente nas folhas frescas de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA foi convertido em espatulenol nos processos de secagem das folhas e de hidrodestilação. O biciclogermacreno é um precursor biossintético do espatulenol, visto esta conversão ser demonstrada através de síntese orgânica por Tran e Cramer (2014). O espatulenol não é um artefato, pois estava presente no OE das folhas frescas de *C. sylvestris* da população FCF, porém o teor aumentou devido as condições de secagem (estufa à 40 ºC com circulação de ar por 3 dias). Nas coletas populacionais de dezembro o teor de espatulenol aumentou em 3 das 4 populações em relação as coletas de julho, o que pode relacionado ao aumento de temperatura em dezembro, corroborando fato de que o aumento da temperatura favoreceu o aumento do teor de espatulenol. Conforme Nishimura *et al.* (1969) através da isomerização do biciclogermacreno são formados o aromadendreno e alloaromadendreno, seguidos de oxidação formariam o espatulenol. Portanto, como o teor de alloaromadendreno diminuiu no OE das folhas frescas e folhas secas, pode ter contribuído para a formação do espatulenol nas populações FCF e EEA, assim como no caso do aromadendreno nas análises das coletas populacionais das populações FCF, CB e FCA entre os meses de julho e dezembro.

Outro componente do OE que apresentou aumento de teor paralelamente a redução do teor de biciclogermacreno foi o viridiflorol, sendo observado redução do biciclogermacreno no OE das folhas secas em relação as folhas frescas, enquanto o teor de viridiflorol aumentou (população EEA), assim como nas análises entre julho e dezembro (populações FCF, CB e FCA), corroborando o fato do aumento da temperatura entre as épocas de coleta favorecer o aumento no teor dos sesquiterpenos oxigenados. O fato do teor de

biciclogermacreno reduzir e o teor do viridiflorol é coerente, pois o biciclogermacreno é um metabólito intermediário na biossíntese do viridiflorol (Telascrea *et al.*, 2007). Sesquiterpenos hidrocarbonetos derivados do cátion *E*,*E*-farnesil como o germacreno (A, B e D), biciclogermacreno, aromadendreno e alloaromadendreno ao serem oxidados originam os sesquiterpenos oxigenados tricíclicos espatulenol, viridiflorol, maliol e globulol de acordo com Njoroge *et al.* (1996).

Foi observado que no OE das folhas de *C. sylvestris* o teor de *E*-cariofileno da população FCF diminuiu após a secagem e extração o teor de óxido de cariofileno aumentou paralelamente. Na população EEA o óxido de cariofileno formou-se somente após a secagem. O teor de *E*-cariofileno das populações FCF, EEA, CB e FCA diminuiu de julho para dezembro, paralelamente o teor de óxido de cariofileno das populações FCF, EEA e CB aumentou, entretanto na população FCA não foi identificado óxido de cariofileno em nenhuma época.

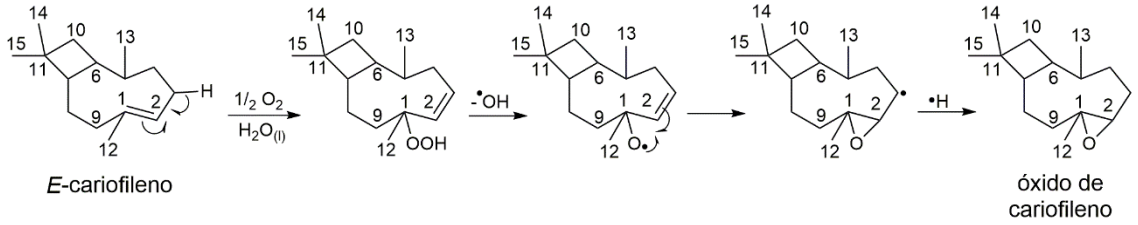
De Jul para Dez o *E*-cariofileno foi convertido em óxido de cariofileno, indicando que o aumento de temperatura favoreceu esta conversão, porém outro metabólito contribuiu para a formação do óxido de cariofileno, pois a quantidade de *E*-cariofileno disponível para oxidação era menor que a quantidade de óxido de cariofileno formado. O teor médio de *E*-cariofileno reduziu enquanto o teor de óxido de cariofileno aumentou nas populações FCF e EEA, conforme análise sazonal.

Em estudos de degradação foi verificado que o teor de *E*-cariofileno começou a diminuir logo após o contato com o ar, paralelamente o teor de óxido de cariofileno começou a aumentar e após 5 semanas o *E*-cariofileno estava abaixo do teor de 50 % do teor inicial, enquanto o teor formado de óxido de cariofileno foi de 30 %. Depois de 40 semanas o *E*-cariofileno ficou próximo a 0 % e o teor de óxido de cariofileno estabilizou em torno de 40 % (Sköld *et al.*, 2006). De acordo com este experimento, foi possível concluir que o óxido de cariofileno foi um dos produtos formados a partir da oxidação do *E*-cariofileno.

A oxidação do *E*-cariofileno apresenta 2 etapas conforme Sköld *et al.* (2006), a oxidação primária onde houve a formação de hidroperóxidos (mais

reativo) seguida da oxidação secundária com a formação do óxido de cariofileno (menos reativo), Figura 47.

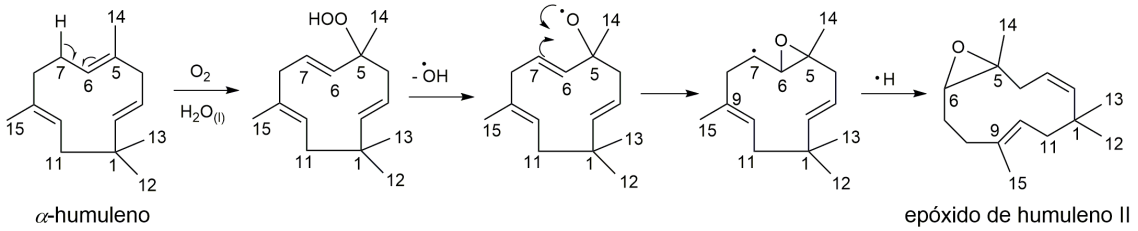
Figura 47. Proposta de mecanismo da oxidação do *E*-cariofileno em óxido de cariofileno, adaptado de Sköld *et al.* (2006).



O epóxido de humuleno II foi formado através da oxidação do *α*-humuleno (Figura 48), considerando que o epóxido de humuleno II já foi obtido por síntese através do *α*-humuleno (Yang e Deinzer, 1992; Zigon *et al.*, 2015). O teor de *α*-humuleno no OE de folhas de *C. sylvestris* da população EEA diminuiu após a secagem, enquanto o teor de epóxido de humuleno II aumentou. Na população FCF os teores de *α*-humuleno e epóxido de humuleno II aumentaram após a secagem, indicando que a secagem favoreceu o aumento de epóxido de humuleno II.

As populações FCF e CB (var. *sylvestris*) apresentaram redução no teor de *α*-humuleno e aumento proporcional no teor de epóxido de humuleno de julho para dezembro no OE, contudo na população FCA ocorreu o mesmo, sem apresentar proporcionalidade. Na população EEA (var. *lingua*) o teor de *α*-humuleno aumentou e o teor de epóxido de humuleno II se manteve estável de julho para dezembro.

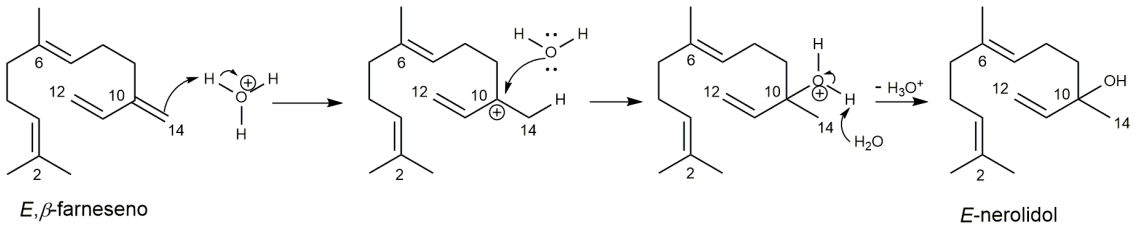
Figura 48. Proposta de mecanismo da oxidação do *α*-humuleno em epóxido de humuleno II.



O *E*-*β*-farneseno foi identificado apenas no OE das folhas frescas do espécimen FCF 10 com 73,5 %, podendo correlacionar sua degradação com o

aumento do *E*-nerolidol de 3,9 para 11,1 % no OE das folhas secas do espécimen FCF 10. A oxidação da ligação dupla no C-10 do *E*-*β*-farneseno pode levar a formação de uma hidroxila, sugerindo a formação do *E*-nerolidol após a secagem das folhas de *C. sylvestris* (Figura 49).

Figura 49. Proposta de mecanismo da oxidação *E*-*β*-farneseno em *E*-nerolidol.



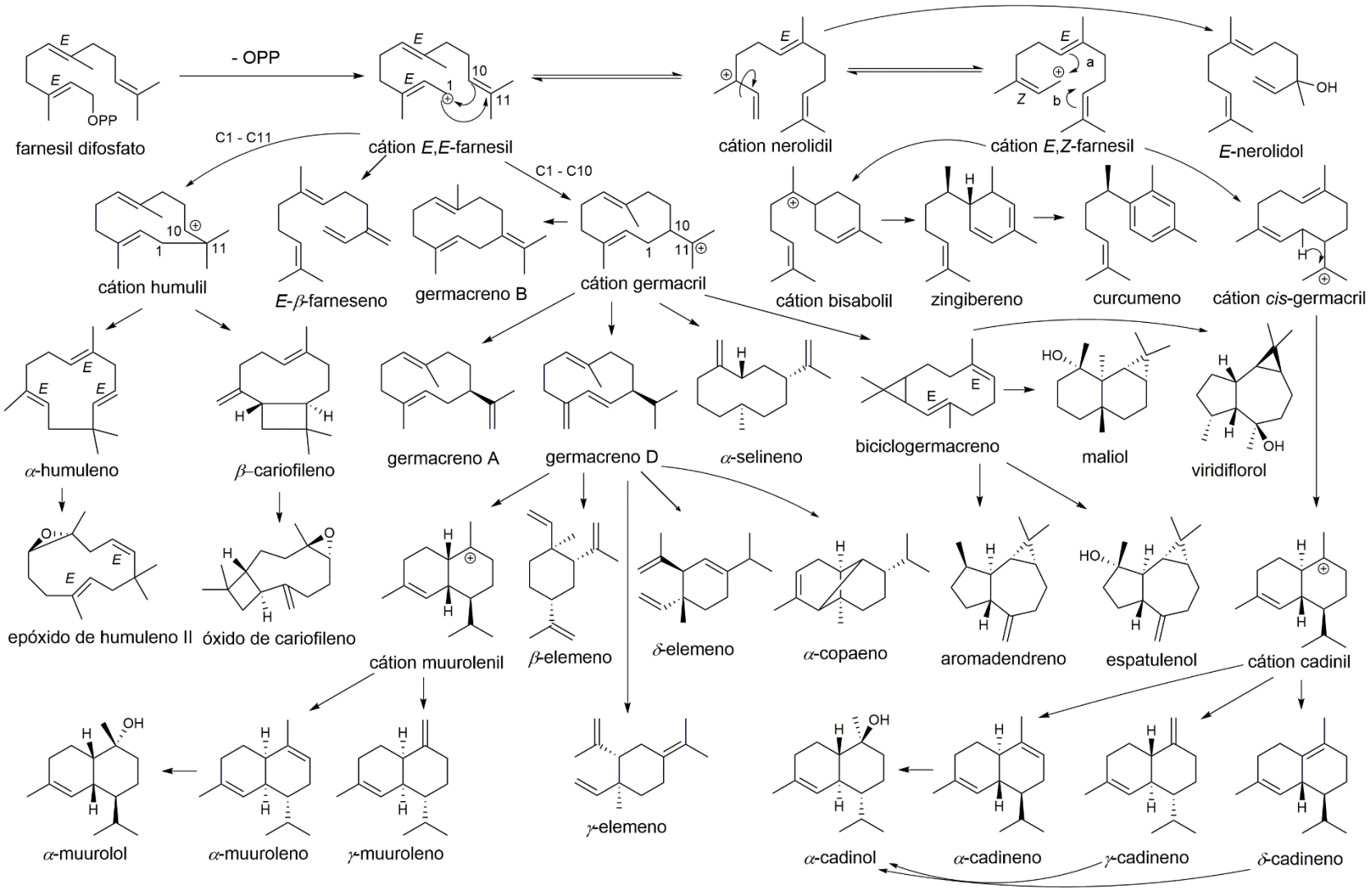
O germacreno D pode ser convertido em elemenos, muurolenos (Bülow e König, 2000; Njoroge *et al.*, 2003) e também em cadinenos através de uma rota alternativa de biossíntese onde o germacreno D se converte no cátion *cis*-germacril (Arigoni, 1975; Bülow e König, 2000), entretanto, dados da literatura sugerem que os cadinenos são derivados do cátion *E*,*Z*-farnesil e nesse caso não poderiam ser derivados do germacreno D (Degenhardt *et al.*, 2009; Dewick, 2009). O teor de germacreno D no OE das folhas frescas diminuiu em relação as folhas *in natura* das populações FCF e EEA, enquanto o teor de *β*-elemeno aumentou no OE das folhas frescas de ambas as populações, assim como o teor de *δ*-elemeno aumentou na população EEA. Ocorreu diminuição no teor de germacreno D e aumento do *β*-elemeno na população CB nas coletas de julho e dezembro. Contudo, o teor dos cadinenos e muurolenos não aumentou, corroborando os resultados de Spandre (2010).

O teor de *δ*-cadineno reduziu no OE das folhas secas em relação as folhas frescas, enquanto o teor de *α*-cadinol aumentou no OE das folhas secas, indicando que a oxidação do *δ*-cadineno pode formar o *α*-cadinol.

O esquema geral proposto da biossíntese dos sesquiterpenos (hidrocarbonetos e oxigenados), identificados como componentes majoritários em *C. sylvestris* var. *sylvestris* e var. *lingua* (Figura 50), demonstra que a maioria dos metabólitos secundários são derivados do cátion *E*,*E*-farnesil, entretanto, também foram biossintetizados metabólitos secundários através do cátion *E*,*Z*-farnesil.

Para formar o cátion humulil e seus componentes derivados ocorre uma ciclização entre os carbonos 1 e 11 (C1-C11), enquanto para originar o cátion germacril há uma ciclização entre os carbonos 1 e 10 (C1-C10), ambas no cátion *E*,*E*-farnesil (Telascrea *et al.*, 2008). A maioria dos componentes majoritários identificados na *C. sylvestris* (folhas *in natura*) são derivados dos cátions humulil e germacril, que são derivados diretos do cátion *E*,*E*-farnesil, sugerindo a ocorrência de alguma enzima específica favorecendo a formação de derivados do cátion *E*,*E*-farnesil.

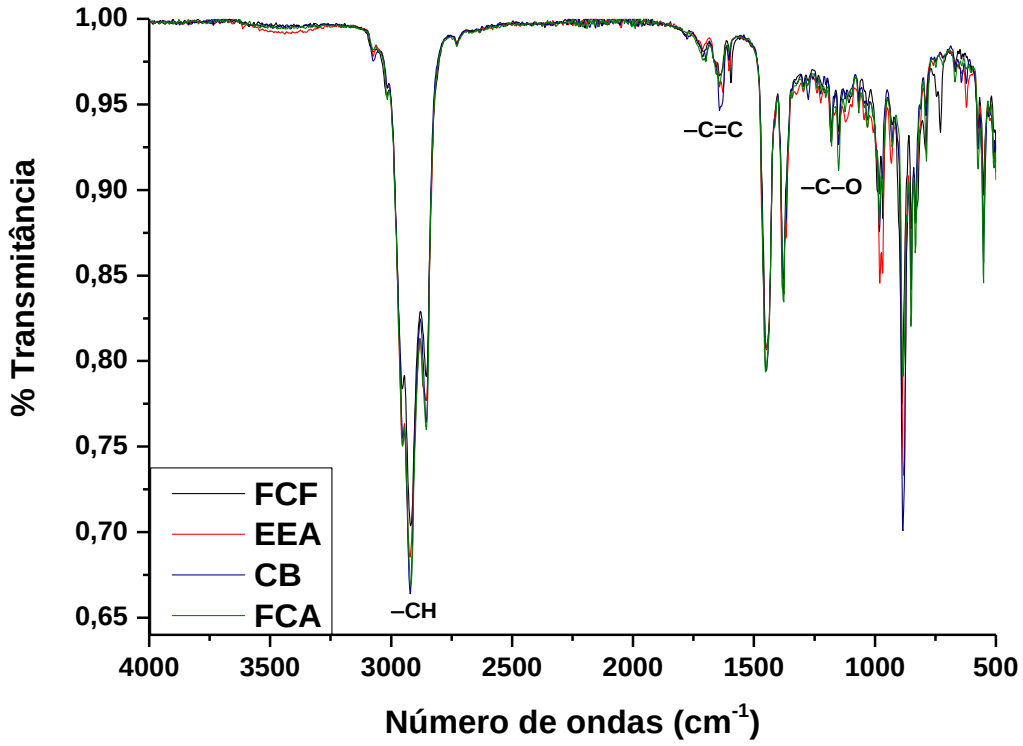
Figura 50. Esquema geral da biossíntese dos componentes majoritários presentes em *C. sylvestris*.



5.6.3 Espectroscopia no IV-FT

Os espectros no IV dos OE das folhas de *C. sylvestris* das populações coletadas nos meses de julho e dezembro/2016 apresentaram bandas de absorção e intensidade semelhantes (Figura 51). Dados de IV-FT podem ser utilizados para definir perfil químico (*Fingerprint*) e parâmetro de pureza e identidade no controle de qualidade de OE, entretanto, a literatura não relata dados referentes ao perfil de OE de folhas de *C. sylvestris* por IV-FT.

Figura 51. Espectros na região do IV-FT do OE de folhas de *C. sylvestris* populações FCF, EEA, CB e FCA coletadas em Jul e Dez/2016. Cada população é formada pelo OE da mistura de 10 espécimens.



Ao correlacionar as bandas de absorção com informações estruturais referentes aos grupos funcionais, verificou-se a predominância de bandas de absorção de deformações de ligações carbono-hidrogênio e carbono-carbono simples e duplas, além de bandas de absorção de deformações de ligações carbono-oxigênio indicativas de substâncias oxigenadas. A ausência de bandas de absorção referentes a substâncias aromáticas, sugere que não há

fenilpropanoides na composição do OE de folhas de *C. sylvestris*. A Tabela 12 apresenta as bandas de absorção do OE referente às populações FCF, EEA, CB e FCA coletadas em Jul e Dez/2016, sendo que cada população é formada pelo OE de 10 espécimens.

Tabela 12. Bandas de absorção relativas as deformações vibracionais dos OE das folhas de *C. sylvestris*. Cada população está representa pelas coletas de Jul e Dez/2016.

FCF	EEA	CB	FCA	Banda (número de onda; cm^{-1})	* Atribuição
2954	2954	2954	2954	2962	$\tilde{\nu}_{ass}$ –C–H (CH_3)
2919	2924	2921	2919	2926	$\tilde{\nu}_{s}$ –C–H (CH_2)
2854	2854	2854	2854	2854	δ_{s} –C–H (CH_2)
1643	1644	1642	1643	1675 – 1623	$\tilde{\nu}_{s}$ –C=C *cis* ou *trans*
1448	1448	1448	1452	1450	δ_{ass} –C–H (CH_3)
1376	1382	1378	1378	1375	δ_{s} –C–H (CH_3)
1179	1181	1181	1179	1210 – 1163	$\tilde{\nu}$ C–O (O–H); $\tilde{\nu}_{ass}$ C–C–O
1150	1150	1150	1150	1150	$\tilde{\nu}$ C–O
1067	1066	1065	1066	1070	$\tilde{\nu}$ –C–CH_2; $\tilde{\nu}$ C–O
984	979	981	981	985	δ_{s} H–C –C=C
966	968	968	967	970	δ_{s} C=C *trans*-1,2 dissubstituída
929	932	929	930	920	δ_{s} –C–H; δ –C=C
887	878	884	882	890	δ_{s} C=C 1,1 dissubstituída
850	850	850	850	850	δ_{s} C=C 1,1 dissubstituída
831	832	832	832	837	δ –C=C–H trissubstituído
790	788	788	788	790	δ =C–H
574	573	574	573	574	$(R)_2$ δ $C=CH_2$
551	551	551	551	550	δ –C–H
507	507	508	509	507	δ =CC_2

*(Silverstein *et al.*, 2005)

Através da correlação das bandas de absorção, foi possível sugerir que os OE analisados são formados predominantemente por hidrocarbonetos não-aromáticos e pouco oxigenados, devido não aparecerem bandas de absorção de hidroxilas. Contudo, como nos OE foram identificados sesquiterpenos álcoois, pode ser que tenha ocorrido ligação intermolecular de hidrogênio, assim enfraquecendo as ligações O–H e deixando a banda de absorção em uma frequência muito baixa (Silverstein *et al.*, 2005). Os espectros de IV-FT foram muito semelhantes, apresentando pouca diversidade de grupos

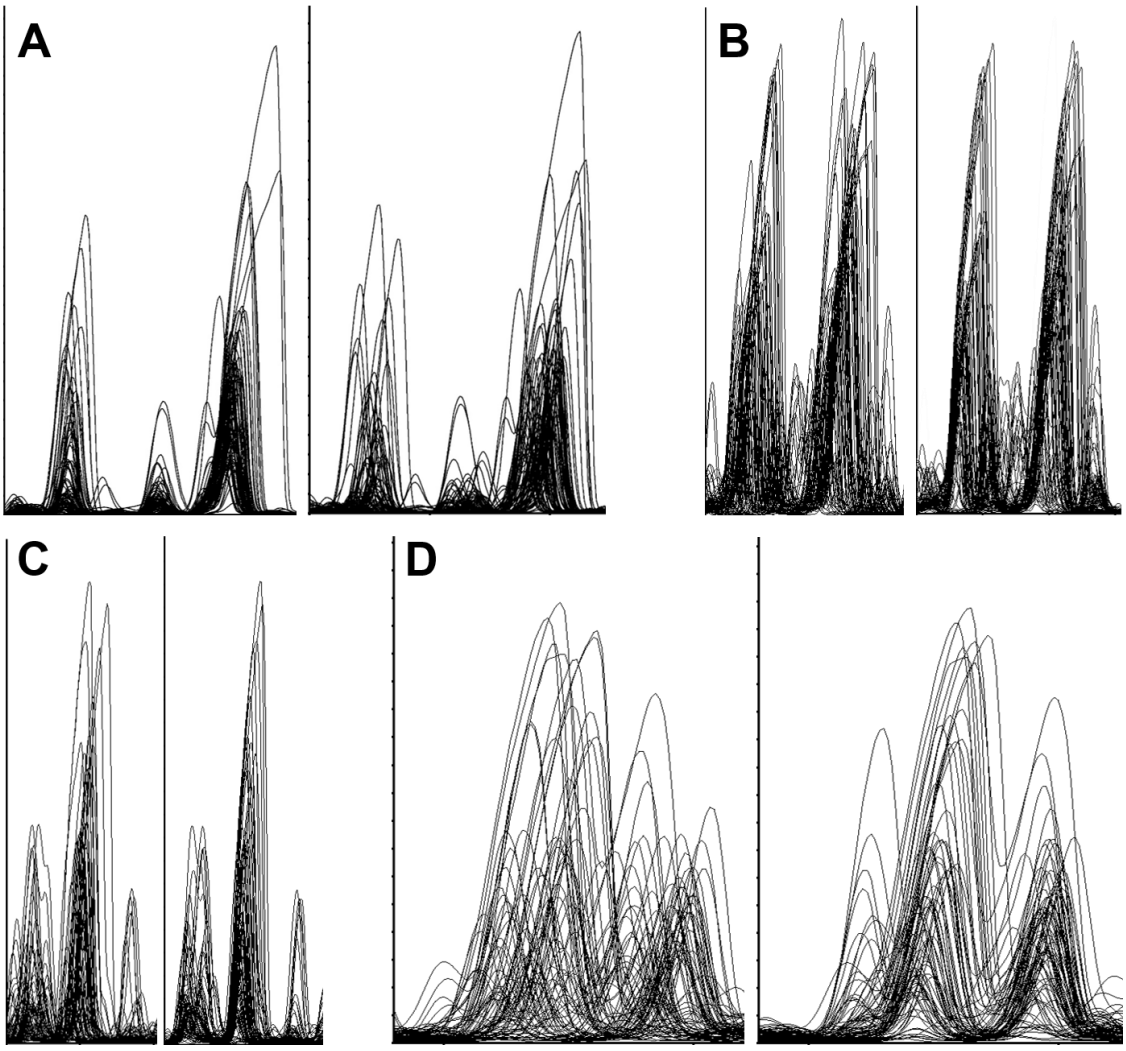
funcionais. Como não foram observadas presença de bandas de absorção na região de compostos aromáticos (fenilpropanoides) e carbonilas, pode ser um indicativo de adulteração do OE de *C. sylvestris* com outros tipos de OE, óleo fixo ou óleo mineral.

5.7 Análises quimiométricas

5.7.1 Alinhamento cromatográfico

O alinhamento dos picos dos cromatogramas possibilitou ajuste no t_R dos picos e maior centralização dos picos, em comparação com os picos antes do alinhamento. Na representação ampliada dos cromatogramas antes de depois do alinhamento, são apontadas as alterações nos t_R com o alinhamento, mantendo as áreas e intensidades dos picos cromatográficos (Figura 52). Conforme Sherman *et al.* (2018), Martins *et al.* (2011) e Casale *et al.* (2010), as pequenas variações na fase móvel ou temperatura, idade ou sangria da coluna, ruídos e contaminantes podem causar deslocamentos nos t_R e intensidade dos picos e através do alinhamento realizado pelo algoritmo COW, os picos cromatográficas foram alinhados, corrigindo os deslocamentos do t_R e intensidade, mantendo a forma e área original, assim evitando resultados errôneos nas análises quimiométricas (Nederkassel *et al.*, 2006).

Figura 52. Representação ampliada dos cromatogramas antes (esquerda) e depois (direita) do alinhamento: A) t_R 35,000 min, B) t_R 3,000 min, C) t_R 40,000 min, d) t_R 43,000 min.



5.7.2 Análises quimiométricas

A análise quimiométrica populacional foi realizada com 10 espécimens de cada população de *C. sylvestris* (FCF, EEA, CB e FCA coletados em Jul e Dez). Foram observados 3 agrupamentos entre os espécimens analisados na PCA populacional (Figura 53). No Grupo I estão agrupados os espécimens com características da var. *lingua*, sendo composto pela população EEA e pelos espécimens 4, 8 e 9 da população FCF que estão distribuídos em locais com ampla incidência de luz solar anualmente e menor umidade, diferentemente dos demais espécimens desta população, podendo justificar o agrupamento com a população EEA, embora tais espécimens da população FCF não apresentaram troncos com características morfológicas típicas da var. *lingua*

que são cascas profundamente sulcadas e folhas com a presença de curvatura adaxial. Os componentes químicos principais do Grupo I foram o germacreno D (t_R 38,8 – 38,9 min), *α*-muurolol (t_R 45,0 – 45,2 min) o *α*-cadinol (t_R 45,5 – 45,8 min) e o *E*-cariofileno (t_R 36,1 – 36,3 min), conforme o gráfico de loadings (Figura 54).

O Grupo II é composto predominantemente pelas populações CB e FCA, que apresentam clima mais úmido e presença de fungos nas folha da maioria dos espécimens (Tabela 3, Apêndice 1) e pelos espécimens 3, 7 e 10 da população FCF. A presença dos espécimens 4 e/ou 8 da população EEA em todos os grupos pode ser devido à localização em áreas sombreadas na maior parte do ano, por isso podem ser inseridas em ambas as variedades, pois a composição do OE variou conforme a época do ano. Os componentes principais do Grupo II foram o espatulenol (t_R 42,7 – 42,8 min) e o *E*-cariofileno (t_R 36,1 – 36,3 min), de acordo com o gráfico de loadings. Os espécimens da população CB (Mata Atlântica) apresentaram composição química do OE e características morfológicas semelhantes aos espécimens da população FCA, que estão localizados em área que apresenta resquícios de Mata Atlântica e a presença de Cerrado.

O Grupo III é majoritariamente representado por espécimens das populações FCF, CB, FCA que são atribuídos a var. *sylvestris* (FCF e CB) ou formas intermediárias com características mais marcantes da var. *sylvestris* (FCA) e um espécimen da população EEA. A var. *sylvestris* apresentou variabilidade química de acordo com o local da população, indicando que a população CB (localizada na Mata Atlântica) é diferente da população FCF (localizada no Cerrado), enquanto que a população FCA apresentou espécimens com características químicas semelhantes as var. *sylvestris* e var *lingua*, o que é contundente, pois está localizada em um região de que apresenta os 2 biomas com resquícios de Mata e a presença de Capoeira sendo considerada uma região de transição entre Mata Atlântica e Cerrado (Silva, 2003a). Os componentes principais do Grupo III são o biciclogermacreno (t_R 39,4 – 39,7) e o *β*–elemeno (t_R 34,9 – 35,1), segundo gráfico de loadings.

Figura 53. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA, mostrando os agrupamentos de acordo com as populações.

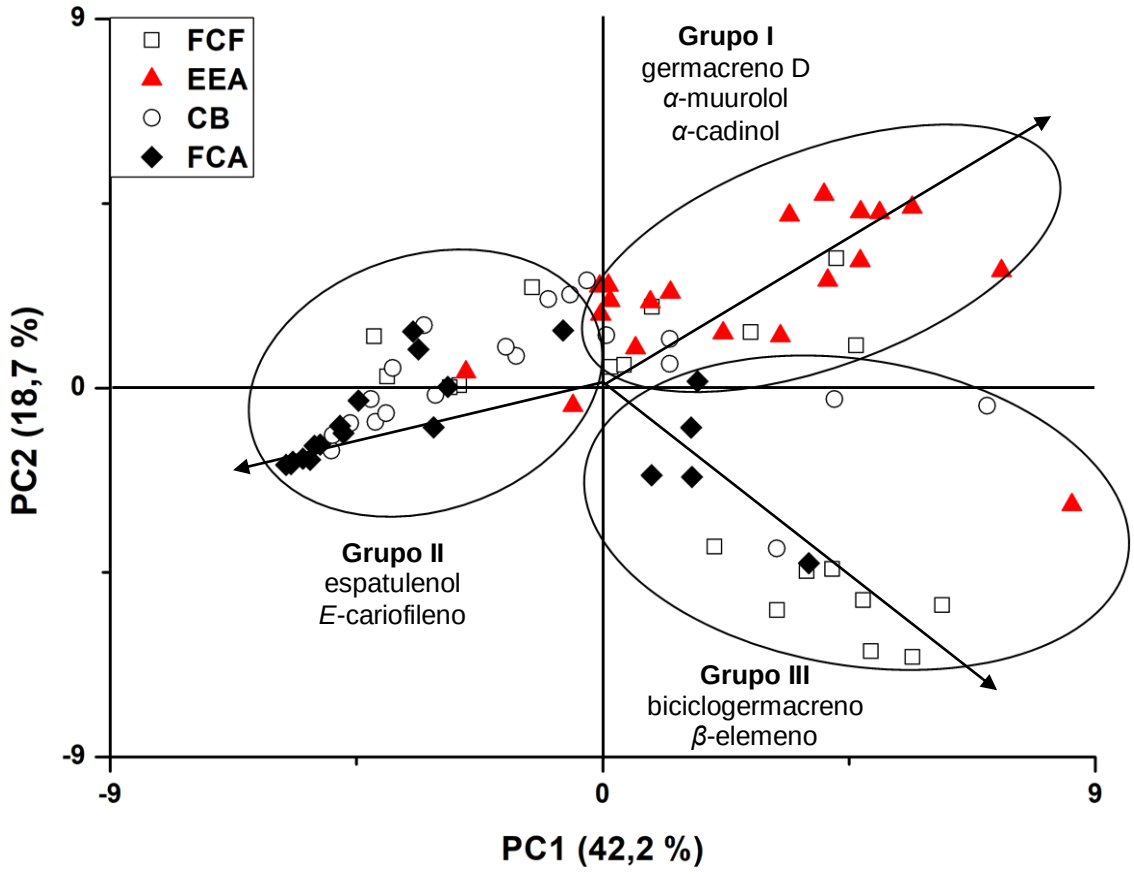
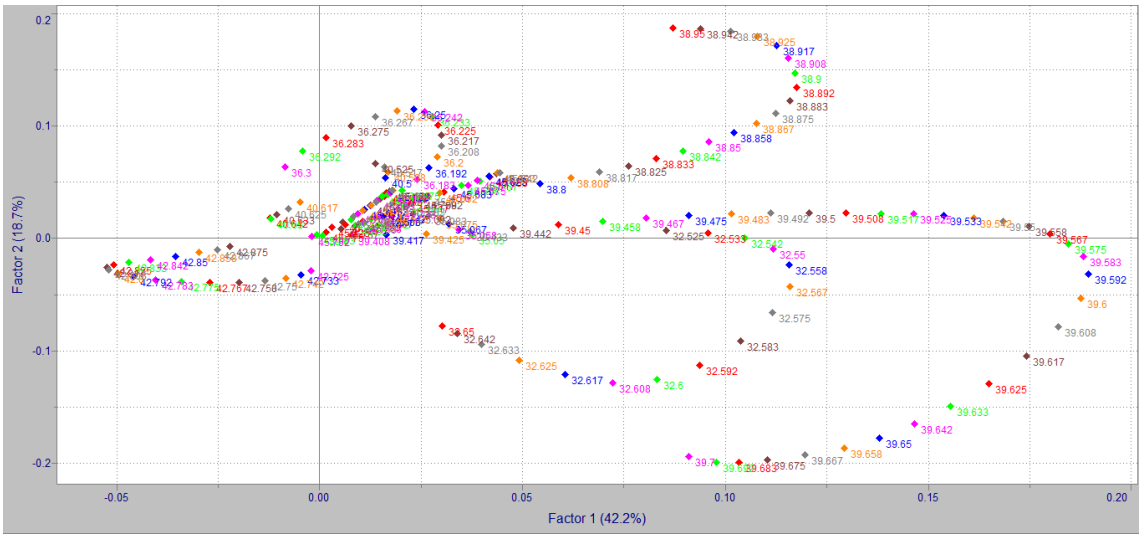


Figura 54. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF, EEA, CB e FCA.



Os componentes voláteis da *C. sylvestris* não apresentaram classes diferentes na composição do OE, pois são formados exclusivamente por

sesquiterpenos, diferentemente dos componentes não-voláteis (flavonoides, derivados do ácido gálico e diterpenos), que possibilitaram diferenciar as variedades de *C. sylvestris*, conforme relatado por Bueno *et al.* (2015). Contudo, foi verificado que a var. *lingua* (Grupo I) apresentou como componentes principais os sesquiterpenos oxigenados *α*-muurolol e *α*-cadinol, além dos sesquiterpenos hidrocarbonetos germacreno D e *E*-cariofileno.

O sesquiterpeno oxigenado espatulenol em conjunto com o *E*-cariofileno foram os componentes principais da var. *sylvestris* e das formas intermediárias no Grupo II, que é representado majoritariamente pelos espécimens das populações CB e FCA, enquanto que o Grupo III apresentou como componentes principais os sesquiterpenos hidrocarbonetos biciclogermacreno e *β*-elemeno, os quais podem ser os componentes majoritários do OE da var. *sylvestris* (população FCF) e das formas intermediárias (população FCA).

Os resultados mostraram semelhanças qualitativas na composição química entre as populações, com distinção entre as variedades em relação ao teor dos componentes, sugerindo que o ambiente e a composição do solo influenciam na morfologia, fisiologia e composição dos metabólitos secundários da *C. sylvestris* assim como o nível de exposição solar, que seria um fator determinante na composição do OE com características químicas de ambas as variedades, os quais sofrem alteração de acordo com a época do ano. Segundo Moore *et al.* (2014), os nutrientes presentes no solo, o nível de exposição solar e a disponibilidade hídrica são fatores que influenciam nas características genotípicas e morfológicas. As componentes principais possibilitaram diferenciar as variedades, contudo, não são típicos e podem ser encontrados em maior ou menor quantidade em ambas as variedades, assim como os compostos fenólicos e diterpenos clerodânicos que são marcadores químicos das var. *lingua* e var. *sylvestris*, respectivamente (Marquete, 2001; Cavallari *et al.*, 2010; Claudino *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2015).

As análises quimiométricas sazonais da *C. sylvestris* foram realizadas com 10 espécimens de cada uma das populações de *C. sylvestris* (FCF e EEA coletados por 2 anos). As análises quimiométricas sazonais (Figura 55) indicam que o OE da var. *sylvestris* (população FCF) mantem suas características químicas sem sofrer alterações perante a variabilidade sazonal, diferentemente da var. *lingua*, onde alguns espécimens (Grupo II) apresentaram composição

química variável nos meses entre novembro-março, que pode ser relacionada ao aumento de temperatura e pluviometria, entretanto os espécimens do Grupo II representam menos de 10 % da população EEA, sugerindo assim que tais fatores climáticos pouco influenciaram, porém a var. *lingua* é mais susceptível a variações na composição do OE em relação a var. *sylvestris*, indicando que tal variação pode ser relacionada a adaptação a diferentes condições ambientais.

No Grupo II o teor de germacreno D (t_R 38,7 – 38,9) e *δ*-cadineno (t_R 40,4 – 40,6), conforme o gráfico de *loadings* (Figura 56), foram superiores nos meses de inverno/outono, possibilitando diferenciar do Grupo I, contudo nos demais meses não foi possível diferenciar as var. *sylvestris* e var. *lingua* através da composição do OE.

Figura 55. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA mostrando os agrupamentos de acordo com as populações.

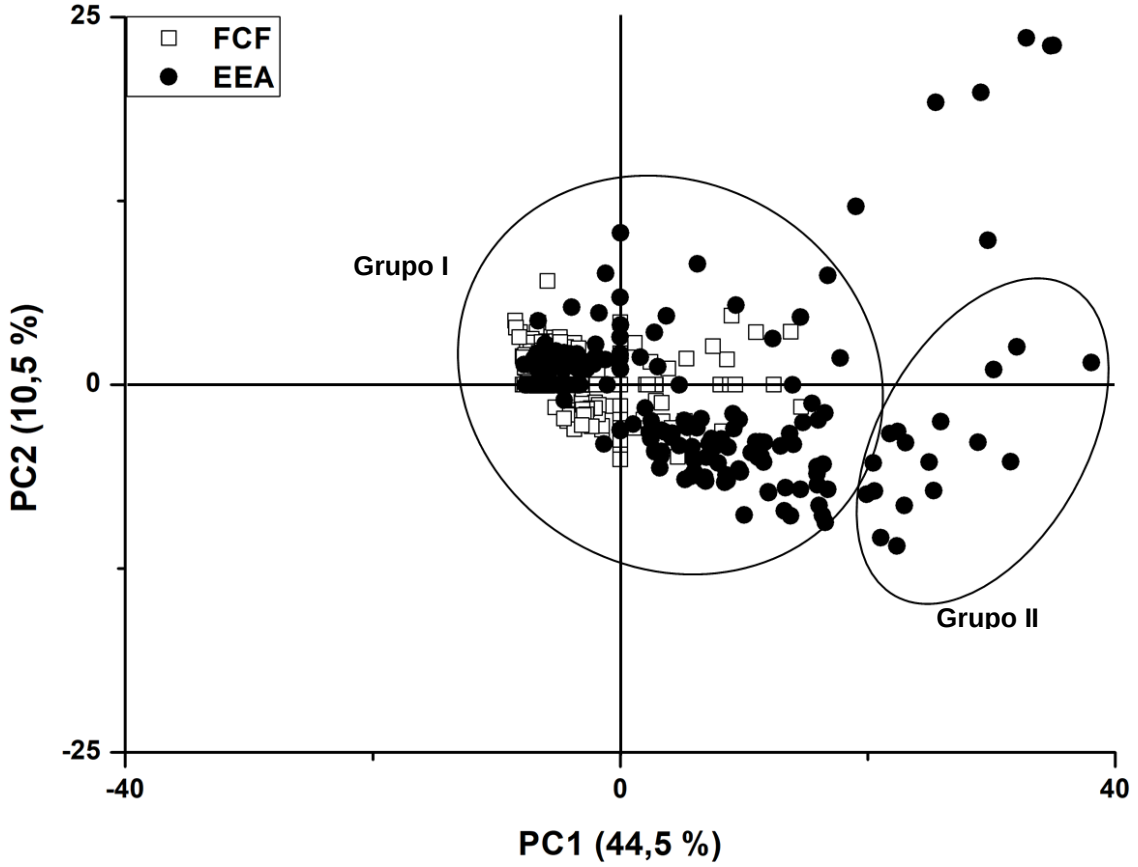
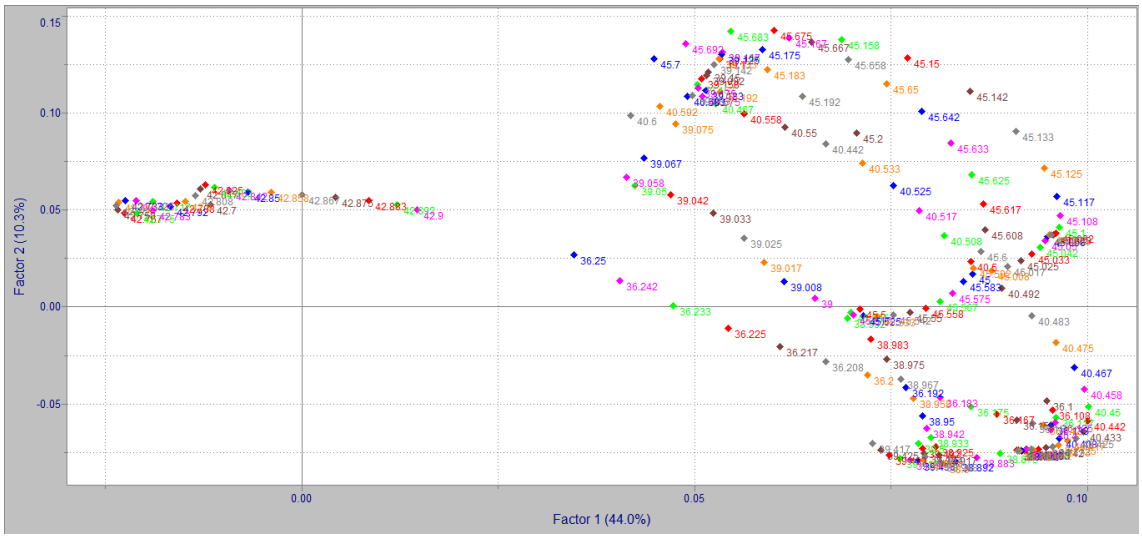


Figura 56. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA.



A análise quimiométrica sazonal da população FCF (Figuras 57 e 58) indica que o padrão de agrupamento se repetiu durante os 2 anos analisados, sugerindo que os espécimens da var. *sylvestris* apresentaram o mesmo comportamento perante as variações climáticas sazonais. Entretanto, os espécimens 4 e 8 apresentaram características químicas relacionados a var. *lingua*, conforme as análises quimiométricas populacionais. O não agrupamento dos espécimens 4 e 8 foi mais frequente nos períodos de outono-inverno, o que pode ser relacionado ao *δ*-cadineno, *α*-muurolol e *α*-cadinol, que são os componentes principais do OE da var. *lingua*.

Figura 57. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF mostrando o agrupamento de acordo com as estações do ano.

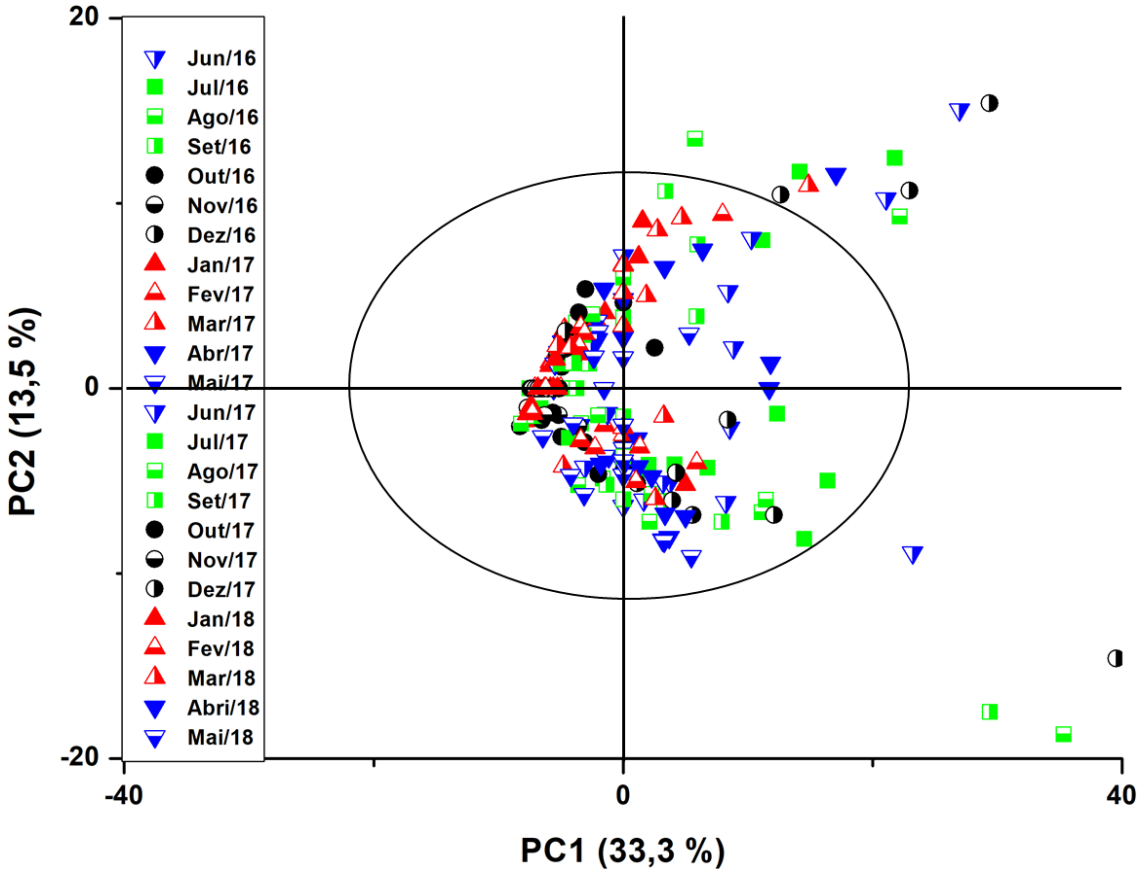
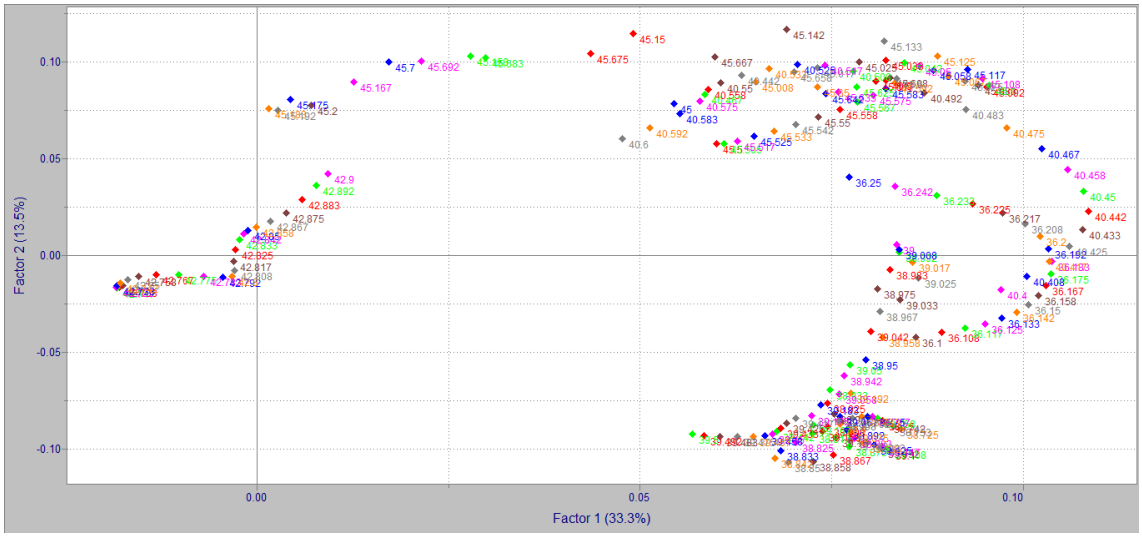


Figura 58. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF.



A análise quimiométrica sazonal da população EEA (Figura 59) apresentou 2 grupos os quais indicam que houve um padrão de agrupamento,

sugerindo que os espécimens da var. *lingua* se comportam de maneira diferente em relação as variações climáticas sazonais, mesmo pertencendo ao mesmo bioma. O Grupo I é formado por espécimens que apresentaram como componente principal o espatulenol nos períodos de outono-primavera-verão, entretanto não houve reprodutibilidade entre os 2 anos analisados, pois no Grupo II também houve agrupamento dos mesmos espécimens nos respectivos períodos, conforme o gráfico de loadings (Figura 60).

Foi observado que no inverno houve um agrupamento dos espécimens no Grupo II e que se repetiu no ano seguinte, o que sugere que a var. *lingua* apresentou o mesmo comportamento fisiológico e maior adaptação as condições climáticas nos períodos de menor temperatura, umidade e pluviometria.

Figura 59. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA mostrando os agrupamentos de acordo com as estações do ano.

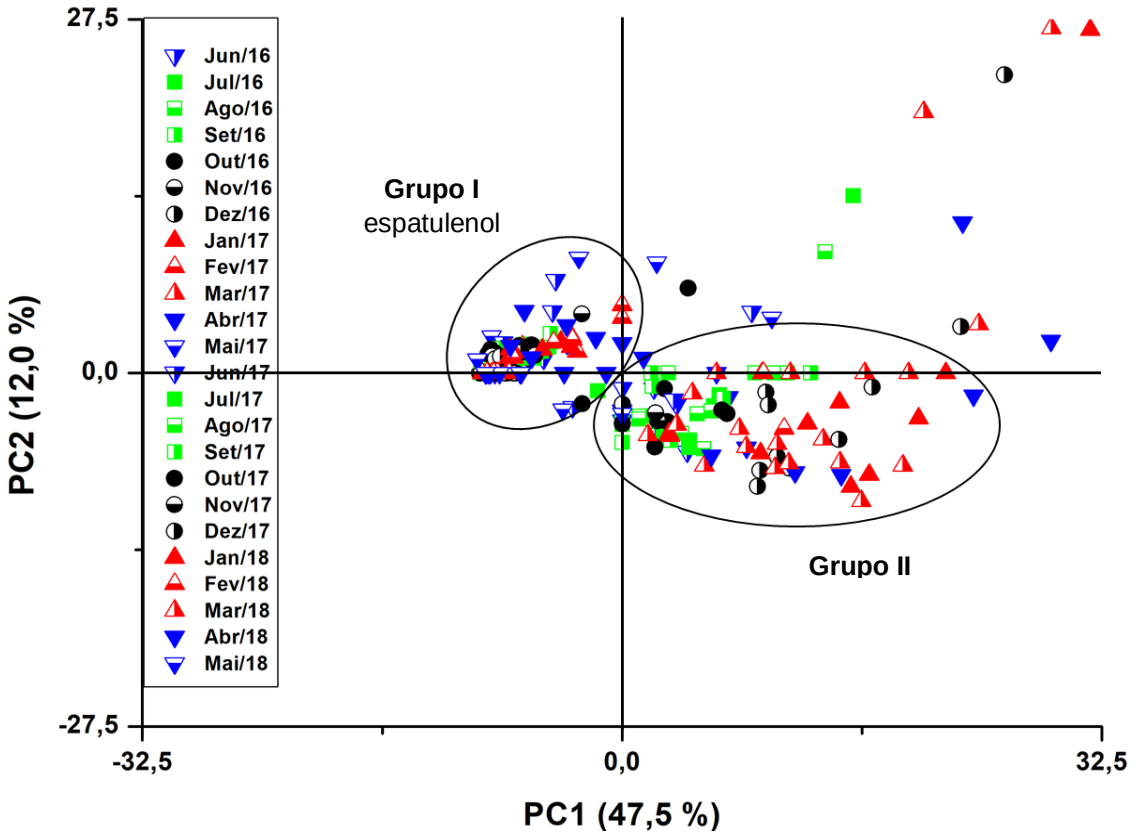
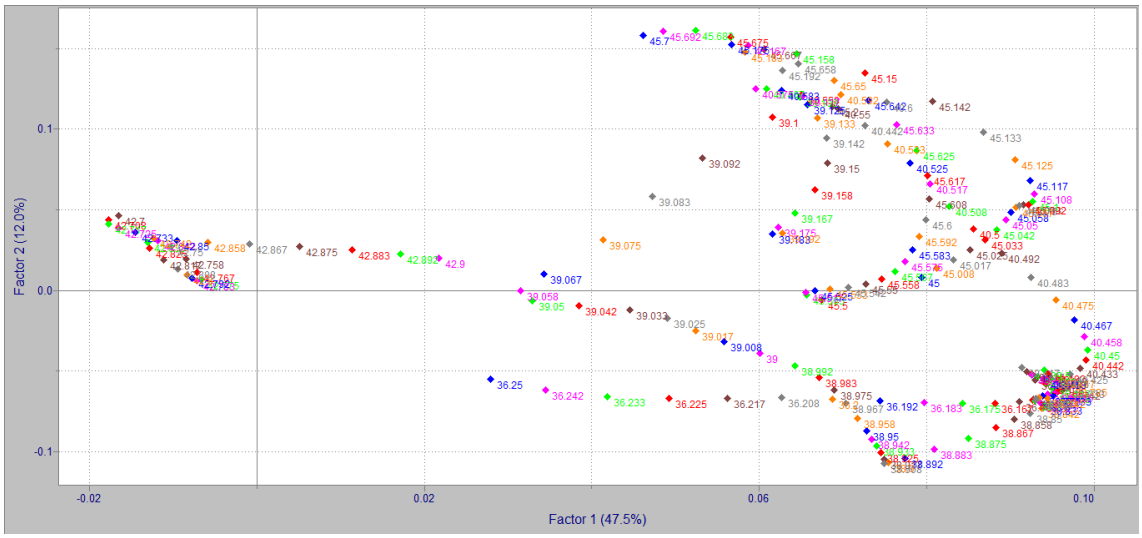


Figura 60. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA mostrando os agrupamentos de acordo com as estações do ano.



A análise quimiométrica circadiana (3, 9 15 e 21 h coletados em Fev e Ago) das populações FCF e EEA foram realizadas com 10 espécimens de *C. sylvestris* de cada população, sendo observado um perfil de agrupamento entre todos os horários em ambos os meses, conforme a PCA circadiana referente a população FCF (Figuras 61 e 62). O agrupamento da maioria dos espécimens indica que não houve variação circadiana na composição química do OE na var. *sylvestris* nos meses analisados, fato que pode ser corroborado pelo cromatograma *fingerprint* (item 5.6.2.2, Figura 39).

Figura 61. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF mostrando o agrupamento de acordo com os horários (à esquerda fevereiro e à direita Agosto).

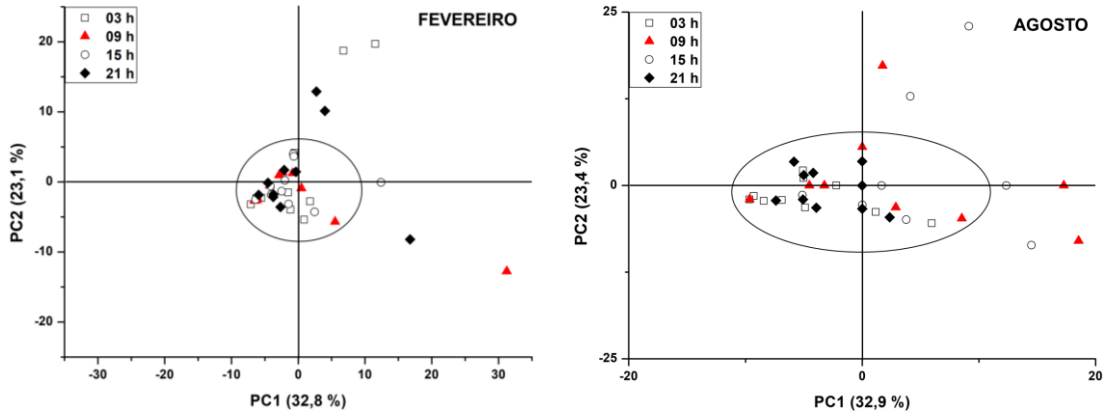
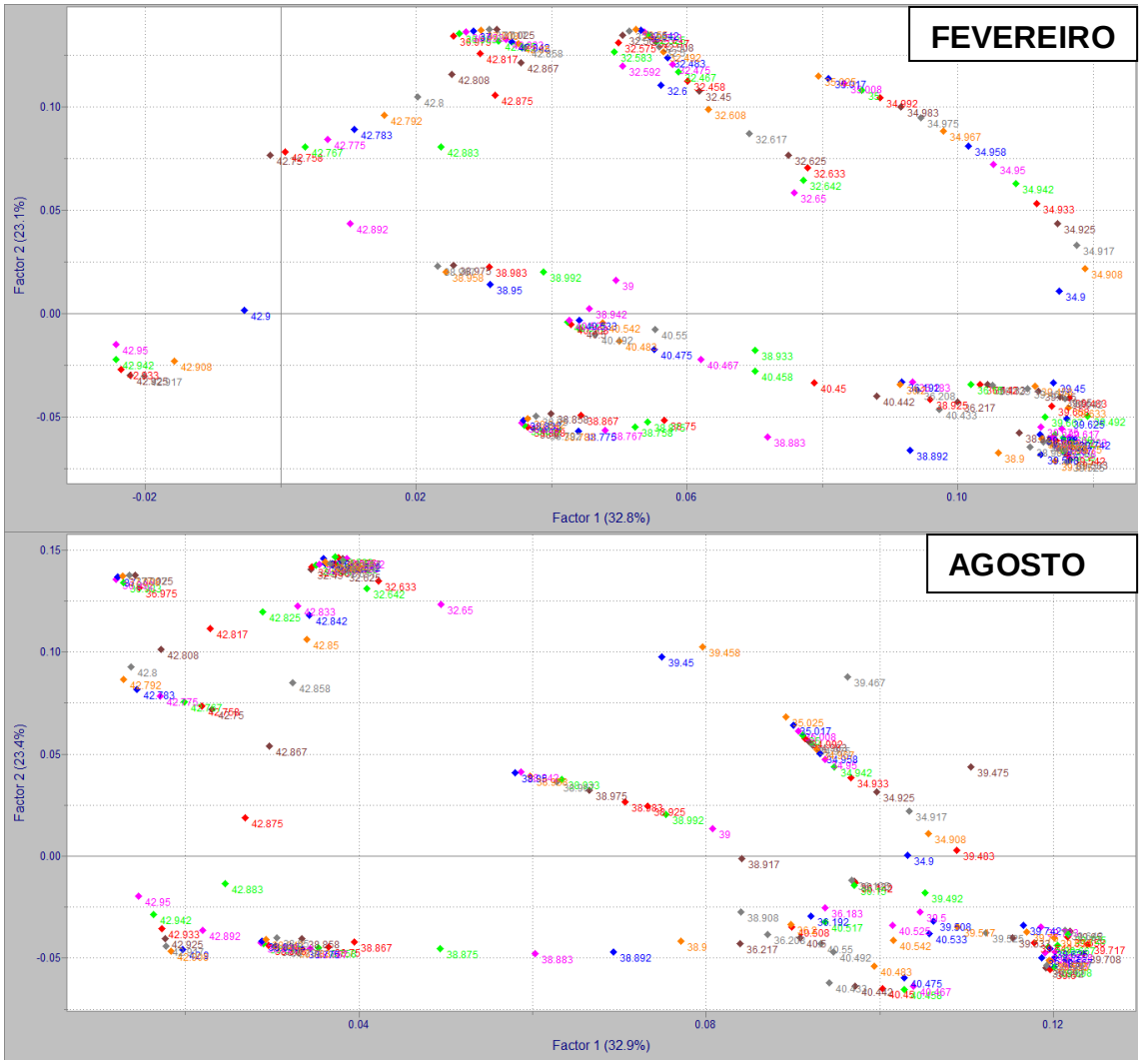


Figura 62. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população FCF (à esquerda fevereiro e à direita Agosto).



Fatores climáticos podem influenciar na composição química do OE, pois alguns espécimens que ficaram desagrupados nas análises de fevereiro às 03 h podem ser relacionados à presença de chuva. Nas análises de agosto o vento às 09 h e a variação na temperatura de 16-18 ºC para 25 ºC às 15 h pode ter influenciado na composição química do OE de alguns espécimens (Tabela 4, Apêndice 1). A composição química de OE pode variar devido a influência de fatores climáticos como temperatura, pluviometria e incidência de ventos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Barbosa *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2018) entretanto, nem todos os espécimens estão sujeitos a determinados fatores, pois tais variações climáticas circadianas não foram extremas.

Nas análises quimiométricas circadianas da população EEA (Figuras 63 e 64) os espécimens coletados às 09 h (Fev e Ago) se agruparam, entretanto,

não apresentaram agrupamento com os demais horários, que ficaram agrupados entre si. Contudo, foi observado que houve uma inversão na posição dos grupos entre os meses analisados, que pode ser atribuído ao componente principal espatulenol de acordo com as análises quimiométricas, pois apresentou diferença no teor nas análises dos espécimens coletados às 09 h para os demais horários (que foram semelhantes entre si).

Figura 63. Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA mostrando os agrupamentos de acordo com os horários (à esquerda fevereiro e à direita Agosto).

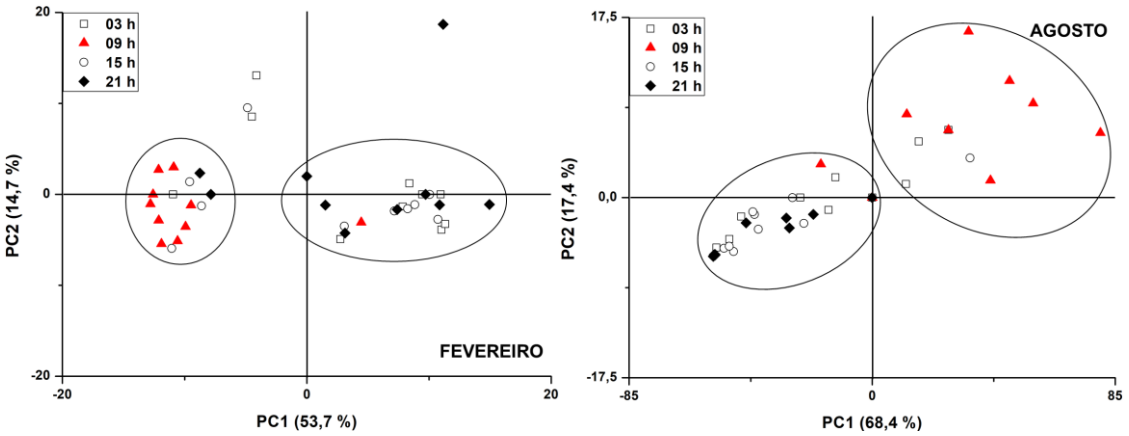
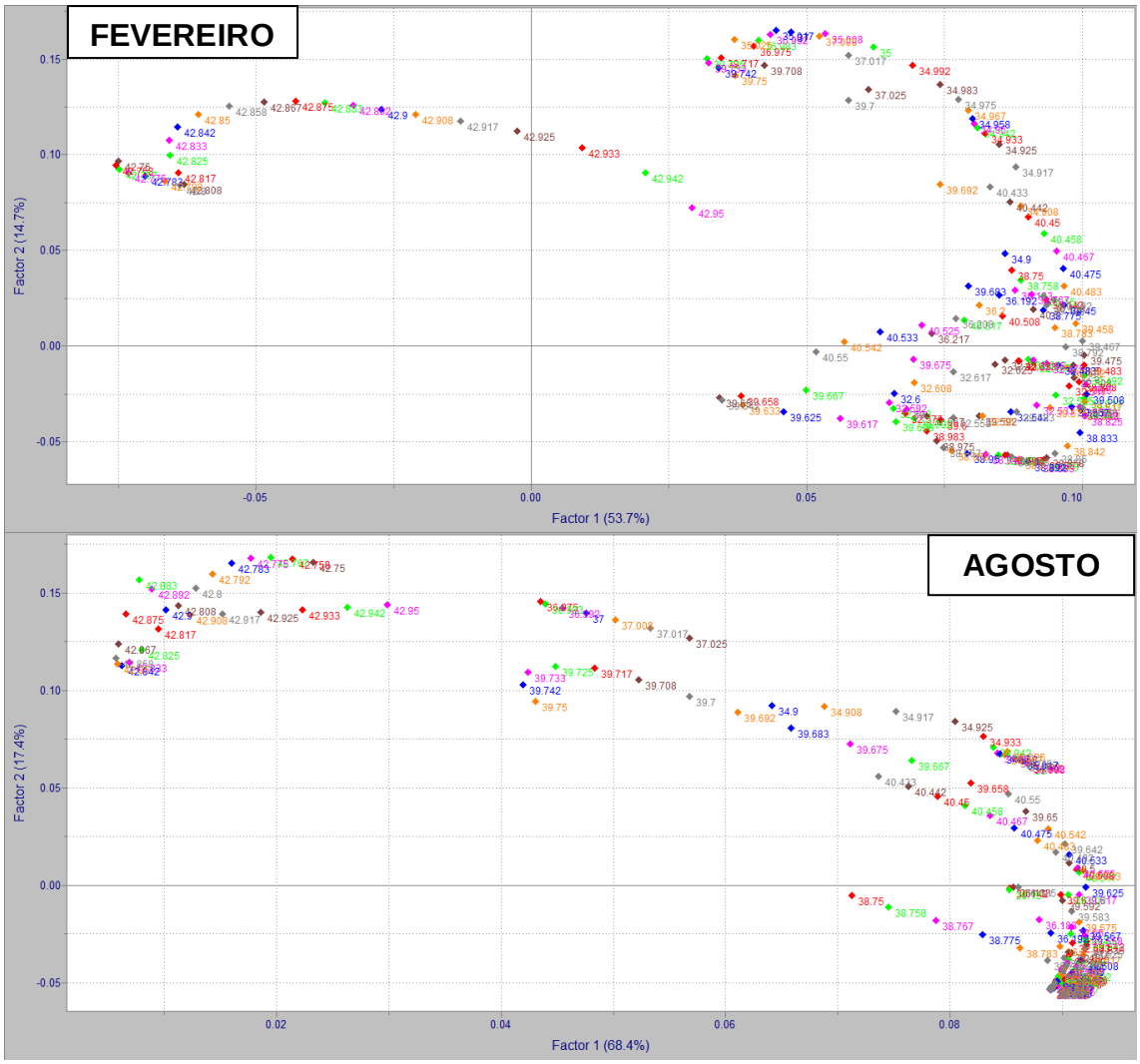


Figura 64. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos espécimens de *C. sylvestris* da população EEA (à esquerda fevereiro e à direita Agosto).



Não foram observadas variações climáticas que pudessem explicar o agrupamento dos espécimens coletados às 09 h separado dos demais horários, contudo, foi observada variação pluviométrica entre fevereiro/agosto e presença de flores em todos os espécimens em agosto (Tabela 5, Apêndice 1). Era esperado que a variação pluviométrica e a presença de flores influenciassem em todos os horários coletados e não apenas em um determinado horário, portanto essa diferença não pode ser atribuída aos índices pluviométricos e a floração as variações na composição do OE da var. *lingua*.

C. sylvestris var. *sylvestris*, Cerrado – Araraquara-SP. Fonte: O Autor

6 CONCLUSÕES

A morfologia dos troncos e a anatomia foliar classificaram a população EEA como var. *lingua* e as populações FCF, CB e FCA como var. *sylvestris*. Através da morfologia foliar, largura significativamente menor das folhas, coloração verde claro e a curvatura adaxial classificaram os espécimens da população EEA como var. *lingua*. O menor grau de curvatura adaxial das folhas e a coloração verde claro na população FCA indicam que podem ser formas intermediárias entre as variedades.

O índice de refração, a densidade relativa e a espectroscopia no IV-FT podem ser utilizados em conjunto como parâmetros de autenticidade e pureza do OE de *C. sylvestris*. A população EEA apresentou valor da rotação óptica específica negativo (var. *lingua*), populações FCF e CB valores positivos (var. *sylvestris*) e a população FCA apresentou valores positivos e negativos (forma intermediária).

Os componentes majoritários do OE foram o *β*-elemeno, *α*-humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e epóxido de humuleno II; já o bulnesol, *γ*-gurjuneno e 10-*epi*-*β*-acoradieno foram típicos da var. *sylvestris* e os teores de germacreno D, *α*-muurolol e *α*-cadinol foram maiores na var. *lingua*. Nas análises dos componentes voláteis das folhas *in natura* por dessorção térmica e do OE das folhas (frescas e secas) identificaram apenas sesquiterpenos e a secagem e extração favoreceram a oxidação dos sesquiterpenos aumentando o teor de sesquiterpenos oxigenados.

O teor de OE apresentou variabilidade intrapopulacional e sazonal nas populações FCF e EEA; já a população CB apresentou maior teor do que as populações EEA e FCA, mostrando que a var. *sylvestris* produz mais OE. As análises quimiométricas da composição do OE mostraram que há agrupamentos entre os espécimens da população EEA (var. *lingua*) e entre os espécimens da população CB (var. *sylvestris*), mostrando que há variabilidade química populacional. Ainda de acordo com as análises quimiométricas da composição do OE foram verificadas variabilidade química sazonal e circadiana nas populações FCF e EEA.

A pluviometria e temperatura influenciaram no teor de OE sazonal e circadiano (populações FCF e EEA) e juntamente com os ventos influenciaram na composição do OE populacional, sazonal e circadiano. Já os micronutrientes do solo P e K influenciaram no florescimento e morfologia foliar na população EEA.

C. sylvestris var. *sylvestris*, Cerrado – Araraquara-SP. Fonte: O Autor

7 REFERÊNCIAS

ABSY, M.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha,** v. 30, p. 641-76, 1973.

ADAMS, R. P. **Identification of Essencial Oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4 th ed. USA: Allured. 2007. 804p.

ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos.** Argentina: Corpus Editorial y Distribuidora. 2007. 1143p.

AMARAL, W. et al. Essential Oil Yield and Composition of Native Tree Species from Atlantic Forest, South of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants,** v. 20, n. 6, p. 1525-35, 2017.

AMENI, A. Z. et al. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology,** v. 175, p. 9-13, 2015.

APEL, M. A. **Óleos voláteis de espécies da subtribo eugeniinae (Myrtaceae): composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória**. 2001. 256p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2001.

APG. The Angiosperm Phylogeny Group. **Journal of the Linnean Society,** v. 141, p. 399–436, 2003.

ARIGONI, D. Stereochemical aspects of sesquiterpene biosynthesis. **Pure and Applied Chemistry,** v. 41, n. 1-2, p. 219-45, 1975.

AZUMA, T. et al. Phylogenetic relationships of Salix (*Salicaceae*) based on rbcL sequence data. **American Journal of Botany,** v. 87, n. 1, p. 67-75, 2000.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul; guia de identificação & interesse ecológico – as principais espécies nativas sul-brasileiras**. Santa Cruz do Sul: Clube da Árvore/Instituto Souza Cruz. 2002. 325p.

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

BALBACH, A. **As plantas curam**. São Paulo: A Edificação do Lar. 1981. p. 230.

BALDAUF, C. et al. Ferveu, queimou o ser da erva": conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 11, n. 3, p. 282-329, 2009.

BALLESTEROS, J. L. et al. Rediscovering Medicinal Amazonian Aromatic Plants: *Piper carpunya* (Piperaceae) Essential Oil as Paradigmatic Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2019.

BALZON, D. R. et al. Cadeia produtiva do chá-de-bugre (*Casearia sylvestris*) na região metropolitana de Curitiba-Paraná. **Floresta,** v. 38, n. 4, 2008.

BARATA-SILVA, W. A.; MACQEDO, R. L. G.; GOMES, J. E. Potencial de utilização de espécies arbóreas medicinais no Rio Grande do Sul. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n. 6, p. 1-6, 2005.

BARBOSA, P. C. S. et al. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 23, p. 1823-1833, 2012.

BARROS, F. M. C. et al. Seasonal variability and terpenoid biosynthesis of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Química Nova,** v. 32, n. 4, p. 861-7, 2009.

BASILE, A. C. et al. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 30, n. 2, p. 185-97, 1990.

BATISTA, E. A. et al. Influência de fatores edáficos sobre o desenvolvimento da vegetação de uma mata mesófila no município de Lindóia, SP. **Revista do Instituto Florestal,** v. 1, n. 2, p. 25-35, 2000.

BAYA, A. **Descripcion taxonomica de especies utilizadas como medinales en el Tropico de Cochabamba**. Cochabamba: Universidad Privada del Valle, Cochabamba, Bolivia. 2001. 111 p.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v. 21, n. 1, p. 105-12, 1997.

BECKER, C. **Avaliação da Atividade Acaricida de Óleos Essenciais de** *Acanthospermum australe* **(Loefl.) O. Kuntze,** *Casearia sylvestris* **Sw e** *Pothomorphe umbellata* **(L.) Miq., em** *Tetranychus urticae* **Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae).** 2009. 49 f. Dissertação
(Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) - Centro Universitário Univates. Lajeado., 2009.

BELKHODJA, H. et al. Chemical composition and properties of essential oil of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba*. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,** v. 39, n. 2, p. 324-32, 2016.

BENOVIT, S. C. et al. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish Rhamdia quelen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 87, p. 1675-89, 2015.

BETTS, T. J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial

gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography A,** v. 936, n. 1-2, p. 33-46, 2001.

BITU, V. C. N. et al. Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants,** v. 18, n. 3, p. 647-53, 2015.

BLANK, A. F. et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, n. 1, p. 73-8, 2005.

BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect,** v. 15, n. 3, p. 187-92, 2002.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy,** v. 32, n. 3, 2010.

BOTREL, R. T. et al. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica,** v. 20, n. 1, p. 143-56, 2006.

BOU, D. D. et al. Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound alpha-zingiberene and derivatives. **Molecules,** v. 18, n. 8, p. 9477-87, 2013.

BOU, D. D. et al. Dinor Casearin X, a New Cytotoxic Clerodane Diterpene from *Casearia sylvestris*. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 26, p. 1725-9, 2015.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA**,** v. 1, 2010.

_____. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA**:** 126 p. 2011.

_____. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. 26., A. N. D. V. S. A. R. D. D. C.-R. N. 2014.

_____. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**. ANVISA, B. 1ª edição 2018 Primeiro Suplemento 2018.

BRATTI, C. et al. Levantamento de plantas medicinais nativas da Fazenda Azulão em Dourados–MS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 15, n. 4I, p. 675-83, 2013.

BUENO, P. C. P. **Variabilidade química infraespecífica e dinâmica de metabólitos secundários fenólicos e diterpênicos em** *Casearia sylvestris* **Sw. (Salicaceae): correlação metabolômica e proteômica utilizando cromatografia, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e quimiometria**. 2015. 255 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara., 2015.

BUENO, P. C. P. et al. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety lingua (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology,** v. 68, p. 23-6, 2016.

BUENO, P. C. P. et al. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **Journal of Separation Science,** v. 1, p. 1-8, 2015.

BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry,** v. 55, n. 2, p. 141-68, 2000.

BURLE, M. L.; MIELNICZUK, J.; FOCCHI, S. Effect of cropping systems on soil chemical characteristics, with emphasis on soil acidifcation. **Plant Soil,** v. 190, n. 2, p. 309-16, 1997.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro: Tipographia Nacional. 1877. p. 2600.

CAMPOS, M. C. C. et al. Topossequência de solos na transição campos naturais-floresta na região de Humaitá, Amazonas. **Acta Amazonica,** v. 42, p. 387-8, 2012.

CARVALHO, F. A. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de látex natural de *Hevea brasiliensis* (Wild. ex A.Juss.) Müll.Arg. com extrato de *Casearia sylvestris* Swartz e seus componentes.** 2015. 168 f. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.,

CARVALHO, P. E. R. Cafezeiro-do-Mato-*Casearia sylvestris*. **Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007a.

_____. Cafezeiro-do-Mato: *Casearia sylvestris*. **EMBRAPA-CNPF - Circular Técnica** v. 138, 2007b.

CARVALHO, P. R. et al. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry,** v. 49, n. 6, p. 1659-62, 1998.

CASALE, M. et al. Chemometrical strategies for feature selection and data compression applied to NIR and MIR spectra of extra virgin olive oils for cultivar identification. **Talanta,** v. 80, n. 5, p. 1832-7, 2010.

CASTELLANI, D. C. et al. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, n. 4, p. 104-7, 2006a.

CASTELLANI, D. C. et al. Produção de óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, n. 4, 2006b.

CASTRO, R. C. **Caracterização por espectrometria de massas e investigação das atividades anti-inflamatória e gastroprotetora do extrato etanólico e diterpenos clerodânicos de folhas de** *Casearia sylvestris* **Swartz. 2016. 150f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.**, 2016.

CAVALHEIRO, A. H. et al. Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bacteria. **Revista de Odontologia da UNESP,** v. 45, n. 4, p. 214-8, 2016.

CAVALLARI, M. M. et al. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. **Annals of Botany,** v. 106, n. 4, p. 627-36, 2010.

CHASE, M. W. et al. When in doubt, put it in *Flacourtiaceae*: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. **KEW Bulletin**, p. 141-81, 2002.

CHAVAN, M., J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine,** v. 17, n. 2, p. 149-51, 2010.

CLAUDINO, J. C. et al. Evaluation of morpho-anatomical and chemical differences between varieties of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 85, n. 4, p. 1253-65, 2013.

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo. 1958. p. 169-70.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura: IBDF. 1975. p. 514-6.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: Farmacognosia experimental**. 3rd ed., v.3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian. 2001. 999p.

COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 19, n. 3, p. 710-4, 2009.

DARWINION, I. D. B. **Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina**: *Flacourtiaceae* 2002.

DAVID, E. F. S.; MISCHAN, M. M.; BOARO, C. S. F. Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Biotemas,** v. 20, n. 2, p. 15-26, 2007.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry,** v. 70, n. 15-6, p. 1621-37, 2009.

DEWICK, P. M. **Medical Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 2009. 520p.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

EMBRAPA, E. B. D. P. A.-. **Sistema Brasileiro de Classifcação de Solos**. 3.ed. Brasília: Embrapa. 2013. 353p.

ESPINDOLA, L. S. et al. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica,** v. 70, n. 11, p. 1093-5, 2004.

ESPINOSA, J. et al. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibitsin vitro antioxidant and antimicrobial activities andin vivo hypolipidemic effect in rats. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 17, p. 305-15, 2015.

ESTEVES, I. et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 101, n. 1, p. 191-6, 2005.

EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 15th ed., WB Saunders Harcourt Publishers Ltd. 2002. 585p.

FAPESP; USP; UNESP. **Processo de obtenção de extratos de *Casearia sylvestris*, processos de obtenção de frações ativas, extratos, frações ativas, uso de extratos e frações ativas, composição, unidade de dosagem, método para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gastrointestinais, medicamento e princípio ativo**. Brasil. P I 0306167-1, 2003.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds *alpha*-humulene and (−)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology,** v. 569, n. 3, p. 228-36, 2007.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology,** v. 569, n. 3, p. 228-36, 2007.

FERNANDES, S. R. et al. Chemical composition and seasonal variation of the volatile oils from *Trembleya phlogiformis* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 27, n. 4, p. 419-25, 2017.

FERREIRA, P. M. et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias,** v. 83, n. 4, p. 1373-84, 2011.

FERREIRA, P. M. P. et al. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions,** v. 222, p. 112-125, 2014.

FIDYT, K. et al. *β*-caryophyllene and *β*-caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine,** v. 5, n. 10, p. 3007-17, 2016.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal,** v. 23, n. 4, p. 213-26, 2008.

FIGUEIREDO, P. L. B. et al. Chemical variability in the essential oil of leaves of Araçá (*Psidium guineense* Sw.), with occurrence in the Amazon. **Chemistry Central Journal,** v. 12, n. 1, p. 52, 2018.

FREITAS, L. et al. Técnicas multivariadas na avaliação de atributos de um Latossolo vermelho submetido a diferentes manejos. v. 10, p. 17-26, 2015.

FREITAS, L. et al. Análise multivariada na avaliação de atributos de solos com diferentes texturas cultivados com cana-de-açúcar. **Revista de Ciências Agrárias,** v. 57, n. 3, p. 224-33, 2014.

GENU, A. M.; DEMATTÊ, J. A. M.; NANNI, M. R. Caracterização e comparação do comportamento espectral de atributos do solo obtidos por sensores orbitais (ASTER e TM) e terrestre (IRIS). **Ambiência,** v. 9, n. 2, p. 279-88, 2013.

GILARDONI, G. et al. Phytochemistry of Three Ecuadorian Lamiaceae: *Lepechinia heteromorpha* (Briq.) Epling, *Lepechinia radula* (Benth.) Epling and *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling. **Plants,** v. 8, n. 1, p. 1, 2019.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova,** v. 30, p. 374-81, 2007.

GOPALAKRISHNAN, N. Studies on the storage quality of carbon dioxide-extracted cardamom and clove bud oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 42, n. 3, p. 796-8, 1994.

GRAHAM, J. G. et al. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 73, n. 3, p. 347-77, 2000.

GROSSER, T.; SMYTH, E. M.; FITZGERALD, G. A. Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. In: BRUNTON, L.;CHABNER, B., *et al* (Ed.). **Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw-Hill, cap. 34, 2011.

GROTEWOLD, E. Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. **Trends in Plant Science,** v. 10, n. 2, p. 57-62, 2005.

GUIL-GUERRERO, J.; CAMPRA, P. Cytotoxicity screening of endemic plants from Guayana highlands. **Tropical biomedicine,** v. 26, n. 2, p. 149-54, 2009.

GÜNTZEL, A. R. C. **Avaliação das atividades farmacológicas de extrato de** *Casearia sylvestris* **Sw**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) – Curso de Ambiente e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado. 2008.

GUTIERREZ, J. R. L.; COELLO, J.; MASPOCH, S. Enhanced chromatographic fingerprinting of herb materials by multi-wavelength selection and chemometrics. **Analytica Chimica Acta,** v. 710, p. 40-9, 2012.

HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 29, n. 2, p. 159-72, 1990.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. 1939. p. 355.

HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O. **O Jardim Botânico de São Paulo**. 1941.

IMATOMI, M.; PEREZ, S. C. J. G. A.; FERREIRA, A. G. Caracterização e comportamento germinativo de sementes de *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae). **Revista Brasileira de Sementes,** v. 31, n. 2, p. 36-47, 2009.

ITOKAWA, H. et al. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** v. 38, n. 12, p. 3384-8, 1990.

JUNGES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonoides da *Casearia sylvestris* Sw. (erva de bugre). **Caderno de Farmácia,** v. 2, n. 1, p. 95-101, 1985.

KARIMA, O. Y.; MEDDAH, B.; TIR, T. Proprieties of *Laurus nobilis* from Mascara (Algeria). **International Journal of Multidisciplinary and Current Research,** v. 4, 2016.

KIAZOLU, J. B. et al. Phytochemical screening and chemical variability in volatile oils of aerial parts of *Morinda morindoides*. **Natural Product Research,** v. 30, n. 19, p. 2249-52, 2016.

KIM, C. et al. *β*-caryophyllene oxide inhibits constitutive and inducible STAT3 signaling pathway through induction of the SHP-1 protein tyrosine phosphatase. **Molecular Carcinogenesis,** v. 53, n. 10, p. 793-806, 2014.

KIRAN, S. R.; DEVI, P. S.; REDDY, K. J. Bioactivity of essential oils and sesquiterpenes of *Chloroxylon swietenia* DC against *Helicoverpa armigera*. **Current Science**, p. 544-8, 2007.

KLEIN, R. M.; SLEUMER, H. O. **Flora ilustrada catarinense: flacourtiáceas**. 1984. p. 78-87.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Editora Rima Artes e Texto, São Carlos. 2000. 531p.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of *β*-caryophyllene on anticancer activity of *α*-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 59, n. 12, p. 1643-7, 2007.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science,** v. 325, n. 5937, p. 161-5, 2009.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B,** v. 812, n. 1-2, p. 53-70, 2004.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. 1 Ed. Editora IST Press Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal. 2007. 272p.

LOPES, N. P. et al. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry,** v. 46, n. 4, p. 689-93, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum. 2002. 352p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum. 2002. p. 220-1.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. 2 ed., Plantarum, Nova Odessa - SP. 2008.

LU, X. F. et al. Authentication and distinction of Shenmai injection with HPLC fingerprint analysis assisted by pattern recognition techniques. **Journal of Pharmaceutical Analysis,** v. 2, n. 5, p. 327-33, 2012.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology *In Vitro*,** v. 18, n. 3, p. 337-42, 2004.

MALTI, C. E. W. et al. Chemical Variability of the Essential Oil Of *Pituranthos scoparius* from Algeria. **Chemistry & Biodiversity,** v. 15, 2018.

MARQUETE, R. Reserva Ecológica do IBGE (Brasília - DF): Flacourtiaceae. **Rodriguésia,** v. 52, p. 5-16, 2001.

MARQUETE, R.; MANSANO, V. F. A new species of *Casearia* (*Salicaceae*) from Southeastern Brazil. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature,** v. 20, n. 2, p. 179-81, 2010.

MARQUETE, R.; VAZ, A. M. S. F. O gênero *Casearia* no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia,** v. 58, p. 705-38, 2007.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas Medicinais**. 1 ed. Viçosa: Ed. UFV: Universidade Federal de Viçosa. 2003.

MARTINS, F. T. et al. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova,** v. 29, p. 1203-9, 2006.

MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 400, n. 2, p. 469-81, 2011.

MATIAS, E. F. F. et al. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products,** v. 87, p. 45-53, 2016.

MESQUITA, M. L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 100, p. 783-7, 2005.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; CALEGARI, A. Efeito de material vegetal na acidez do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v. 17, n. 3, p. 411-6, 1993.

MOORE, B. D. et al. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist,** v. 201, n. 3, p. 733-50, 2014.

MORAES, L. A. S. et al. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 74, n. 1, p. 183-6, 2002.

MORAIS, T. P. S.; PISSARRA, T. C. T.; REIS, F. C. Atributos físicos e matéria orgânica de um Argissolo Vermelho Amarelo em microbacia hidrográfca sob vegetação nativa, pastagem e cana-de-açúcar. **Enciclopédia Biosfera,** v. 8, n. 15, p. 212-3, 2012.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. Los usos múltiples de las plantas de Sabana: un estudio de la comunidad" Sitio Pindura", Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotánica**, n. 27, p. 159-90, 2009.

MOREIRA, R. R. D. et al. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 61, n. e33, 2019.

MORITA, H. et al. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical & pharmaceutical bulletin,** v. 39, n. 3, p. 693-7, 1991.

MUSTARICHIE, R.; MOEKTIWARDOJO, M.; DEWI, W. A. Isolation, Identification, and Characteristic of Essential Oil of Iler (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br leaves. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,** v. 9, n. 11, p. 2218-23, 2017.

NAPOLITANO, D. R. et al. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of ethnopharmacology,** v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

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, p. 351-8, 2018.

NEDERKASSEL, A. M. et al. Chemometric treatment of vanillin fingerprint chromatograms: effect of different signal alignments on principal component analysis plots. **Journal of Chromatography A,** v. 1120, n. 1-2, p. 291-8, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products,** v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016.

NIELSEN, N. P. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. **Journal of chromatography A,** v. 805, n. 1-2, p. 17-35, 1998.

NISHIMURA, K.; SHINODA, N.; HIROSE, Y. A new sesquiterpene, bicyclogermacrene. **Tetrahedron Letters,** v. 10, n. 36, p. 3097-100, 1969.

NIWA, M.; IGUCHI, M.; YAMAMURA, S. Co-occurrence of (-) and (+)-germacrene-D in *Solidago altissima* L.: determination of the optical rotation of optically pure germacrene-D. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin,** v. 28, n. 3, p. 997-9, 1980.

NJOROGE, S. M.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Changes in the volatile composition of yuzu (*Citrus junos* Tanaka) cold-pressed oil during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 44, n. 2, p. 550-6, 1996.

_____. Changes of the volatile profile and artifact formation in Daidai (*Citrus aurantium*) cold-pressed peel oil on storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, n. 14, p. 4029-35, 2003.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. G. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P.*, et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Artmed., 2004.

NOGUEIRA, M. et al. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 28, n. 1, p. 93-7, 2007.

OBERLIES, N. H. et al. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products,** v. 65, n. 2, p. 95-9, 2002.

OLIVEIRA, B. et al. An evaluation of the abortive activity of *Casearia sylvestris* Swartz. **Journal of Medical and Biological Research,** v. 18, n. 5-6, p. 726A, 1985.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica e de Morfologia Vegetal**. 3a ed. São Paulo: Atheneu,. 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia – Identificação de Drogas vegetais.** 2 ed. Rio de Janeiro - RJ. 2014. 436.

OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, F. F.; SACRAMENTO, C. K. Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. **Bahia Agricola,** v. 8, n. 1, p. 46-8, 2007.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**. 3. ed. São Paulo: IBRASA. 1998.

PARK, K. R. et al. *β*-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters,** v. 312, n. 2, p. 178-88, 2011.

PASSREITER, C. M.; ALDANA, B. E. M. Variability of sesquiterpene lactones in *Neurolaena lobata* of different origin. **Planta Medica,** v. 64, n. 05, p. 427-30, 1998.

PEREIRA, A. M. S. et al. **Formulário de Preparação Extemporânea - Farmácia da Natureza - Chás Medicinais**. 1. ed. São Paulo: Bertolucci. 2017.

PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVEZ, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina popular III. Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 73, n. 4, p. 85-6, 1992.

PEREIRA, F. G. et al. Anti-herpes activities of the pure and nanoemulsion of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris* Sw.(Salicaceae). **International Journal of Green and Herbal Chemistry,** v. 5, 2016b.

PEREIRA, F. G. et al. DNA damages promoted by the essential oil from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Medicinal Plants Research,** v. 10, n. 44, 2016a.

PEREIRA, F. G. et al. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 89, n. 4, p. 2817-24, 2017b.

PEREIRA, F. G. et al. Cytotoxic effects of the essential oil from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) and its nanoemulsion on A549 tumor cell line. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas,** v. 16, n. 5, 2017a.

PEREIRA, R. C. A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento in vitro de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (Unha-de-gato). **Ciência Agrotecnológica,** v. 30, n. 4, p. 637-42, 2006.

PEREIRA, Z. V. et al. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul state. **Acta Scientiarum. Biological Sciences,** v. 31, n. 3, p. 293-9, 2009.

PEZZI, A. *Casearia sylvestris***: análise quali-quantitativa do óleo essencial, sua ação fungicida *in vitro* sobre fitopatógenos e estudo sobre rizogênese**. 2014. 115f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014., 2014.

PICCAGLIA, R. et al. Agronomic factors affeting the yields and the essential oil of Peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Acta Horticulturae,** v. 344, p. 29-40, 1993.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science,** v. 311, n. 5762, p. 808-11, 2006.

PIERRI, E. G. **Avaliação das atividades cicatrizante e anti-inflamatória de** *Casearia sylvestris* **Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos**.

2013. 125f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara., 2013.

PIERRI, E. G. et al. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 27, n. 4, p. 495-501, 2017.

POSSOLO, H.; FERREIRA, C. Saponinas e outros compostos interessantes na Família das Flacourtiaceae. I - *Casearia sylvestris* Swartz, guassatonga do Brasil. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da USP,** v. 7, p. 377-85, 1949.

PRADO, R. M. **Nutrição de Plantas**. 1 Ed. Editora UNESP, São Paulo. 2008. 407p.

PUPO, J. A. O óleo de Chaulmoogra e as Flacourtiaceas do Brasil. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo,** v. 1, p. 331-40, 1926.

RAIJ, B. V. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. 1996. 285p.

RANGEL, O. J. P.; SILVA, C. A. Estoques de carbono e nitrogênio e frações orgânicas de Latossolo submetido a diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v. 31, p. 1609-23, 2007.

RASLAN, D. S. et al. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bollettino Chimico Farmaceutico,** v. 141, n. 6, p. 457-60, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2014. 876p.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B.; PEREIRA, N. A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente venenos de cobras. **Revista Brasileira de Farmacologia,** v. 69, p. 82-6, 1988.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência Agrotecnológica,** v. 25, n. 1, p. 102-23, 2001.

ROGERIO, A. P. et al. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene *α*-humulene in experimental airways allergic inflammation. **British Journal of Pharmacology,** v. 158, n. 4, p. 1074-87, 2009.

RUPPELT, B. M.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas II-Bloqueio da atividade na permeabilidade capilar e na letalidade do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*). **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 71, n. 3, p. 57-8, 1990b.

RUPPELT, B. M. et al. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas I – Atividades analgésica e antiinflamatória. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 71, n. 3, p. 54-6, 1990a.

SÁ, S. et al. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 26, n. 6, p. 688-93, 2016.

SALCEDO, E. M. S. et al. (Poly) phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC–MS approach. **Food Chemistry,** v. 212, p. 250-5, 2016.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation,** v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 19, p. 436-41, 2009.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos do extrato das folhas de** *Casearia sylvestris***: contribuição para o desenvolvimento de um**

fitoterápico. 2008. 335 f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-graduação em Química, Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara., 2008.

SANTOS, A. G. et al. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry & biodiversity,** v. 7, n. 1, p. 205-15, 2010.

SANTOS, A. G. et al. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova,** v. 30, p. 1100-3, 2007.

SANTOS, D. L. et al. Chemical composition of essential oils of leaves, flowers and fruits of *Hortia oreadica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 26, n. 1, p. 23-8, 2016.

SARRAZIN, S. L. F. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. **Molecules,** v. 20, n. 2, p. 1860-71, 2015.

SCAVONE, O. et al. Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz): aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo,** v. 19, n. 1, p. 73-82, 1979.

SCHNEIDER, N. F. et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* Swart. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 87, n. 4, p. 112-4, 2006.

SCHWOB, I. et al. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology,** v. 32, n. 8, p. 735-45, 2004.

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.

SERTIÉ, J. A.; CARVALHO, J. C.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology,** v. 38, n. 2, p. 112-9, 2000.

SHERMAN, E. et al. Reference samples guide variable selection for correlation of wine sensory and volatile profiling data. **Food Chemistry,** v. 267, p. 344-54, 2018.

SIENIAWSKA, E. et al. *Nigella damascena* L. essential oil and its main constituents, damascenine and *β*-elemene modulate inflammatory response of human neutrophils ex vivo. **Food and Chemical Toxicology,** v. 125, p. 161-9, 2019.

SILVA, F. A. et al. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. **Acta Amazonica,** v. 18, p. 219-29, 1988.

SILVA, G. A. A. B.; BAUER, L. Análise do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 6, p. 327-31, 1970.

SILVA, G. L. et al. Soil physical quality of Luvisols under agroforestry, natural vegetation and conventional crop management systems in the Brazilian semi-arid region. **Geoderma,** v. 167-8, p. 61-70, 2011.

SILVA, M. A.; BARBOSA, J. S.; ALBUQUERQUE, H. N. Levantamento das plantas espontâneas e suas potencialidades fitoterapêuticas: um estudo no complexo Aluízio Campos-Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Informações Científicas,** v. 1, n. 1, p. 52-66, 2010a.

SILVA, M. A. B. et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 20, n. 4, p. 549-62, 2010b.

SILVA, M. A. S. **Variabilidade genética e fitoquímica de** *Casearia sylvestris* **em populações do cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo.** 2003. 110f. Tese (Doutorado em Agronômia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu., 2003a.

_____. **Variabilidade genética e fitoquímica de** *Casearia sylvestris* **Sw em populações do cerrado e mata atlântica do Estado de São Paulo.** 2003. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu., 2003b.

SILVA, M. A. S. et al. Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris* Sw. from Sao Paulo State Atlantic forest and Cerrado populations. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, n. esp, 2006.

SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1926. 429p.

SILVA, S. L.; CHAAR JDA, S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). **European journal of pharmacology,** v. 608, n. 1-3, p. 76-83, 2009.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica,** v. 38, p. 107-112, 2008.

SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica,** v. 38, p. 107-12, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds.** 7 th edition. New York: JOHN WILLEY & SONS, INC,. 2005. 550p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Artmed. 2017. 833p.

SINNOTT-SILVA, E. et al. An avaluation of toxicity and effects of extracts from *Casearia sylvestris* Swartz on rat uterine motility. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 17, n. 5-6, p. 530, 1984.

SKÖLD, M. et al. The fragrance chemical β-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology,** v. 44, n. 4, p. 538-45, 2006.

SLEUMER, H. O. **Flacourtiaceae: Flora neotropica**. Monograph number 22. New York: The New York Botanic Garden 1980. p. 4, 281, 392-3, 400-1.

SOBRINHO, T. J. S. P. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 14, n. 4, p. 586-1, 2012.

SOUSA, E. O. et al. Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana camara* Linn (Verbenaceae) growing in Brazil Northeastern. **Records of Natural Products,** v. 4, n. 1, p. 31, 2010.

SOUSA, F. G. et al. Clastogenic and Anticlastogenic Effect of the Essential Oil from *Casearia sylvestris* Swart. **Journal of Essential Oil Research,** v. 19, n. 4, p. 376-8, 2007.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica,** v. 20, n. 1, p. 135-2, 2006.

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

SPANDRE, P. **Produção de óleo essencial e propagação vegetativa de** *Casearia Sylvestris* **Swartz**. **Tese (Doutorado em Agronômia) – Curso de Pós-graduação em Agronômia, Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciencias Agrárias, Curitiba**, 2010.

SPÓSITO, L. et al. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Casearia sylvestris* leaf derivatives. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 233, p. 1-12, 2019.

STEHMANN, R. S.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Artmed. p., 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 918p.

TELASCREA, M. et al. Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp from the atlantic rain forest. **Química Nova,** v. 31, n. 3, p. 503-507, 2008.

TELASCREA, M. et al. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology,** v. 35, n. 4, p. 222-32, 2007.

TININIS, A. G. et al. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, n. 4, p. 132-6, 2006.

TOBIAS, M. L. et al. Quality control of vegetable drugs of the manipulation drugstores of Maringa (Parana Brazil). **Revista Eletrônica de Farmácia,** v. 4, p. 95-103, 2007.

TOMASI, G.; VAN DEN BERG, F.; ANDERSSON, C. Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society,** v. 18, n. 5, p. 231-41, 2004.

TOMAZI, L. B. et al. Estudo etnobotânico das árvores medicinais do Parque Ecológico Municipal José Milanese, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 16, n. 2, p. 450-61, 2014.

TORRES, R. B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das especies de *Casearia Jacq*.(Flacourtiaceae) do estado de Sao Paulo.(Taxonomy of the species of *Casearia Jacq*.(Flacourtiaceae) from the state of Sao Paulo.). **Revista Brasileira de Botânica,** v. 9, n. 2, p. 239-58, 1986.

TOUAIBIA, M. et al. Natural Terpenes as Building Blocks for Green Chemistry. In: (Ed.). **Plant Based "Green Chemistry 2.0"**, 2019. p.171-95.

TOYOTA, M. et al. (−)-ent-spathulenol isolated from liverworts is an artefact. **Phytochemistry,** v. 41, n. 5, p. 1347-50, 1996.

TRAN, D. N.; CRAMER, N. Biomimetic Synthesis of (+)-Ledene,(+)-Viridiflorol,(−)-Palustrol,(+)-Spathulenol, and Psiguadial A, C, and D via the Platform Terpene (+)-Bicyclogermacrene. **Chemistry–A European Journal,** v. 20, n. 34, p. 10654-60, 2014.

TZAKOU, O.; SKALTSA, H. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Satureja parnassica* subsp. *parnassica*. **Planta Medica,** v. 69, n. 03, p. 282-4, 2003.

USAI, M.; ARRAS, G.; FRONTEDDU, F. Effects of cold storage on essential oils of peel of Thompson navel oranges. **Journal of Agricultural Food Chemistry,** v. 40, n. 2, p. 271-5, 1992.

VALDÉS, A. B. et al. Flora y vegetación de la propuesta de Reserva Florística Manejada" Meseta de San Felipe", Camagüey, Cuba. **Foresta Veracruzana,** v. 10, n. 1, 2008.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of chromatography,** v. 11, p. 463-71, 1963.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica,** v. 61, n. 1-2, p. 83-103, 2006.

VENDRUSCOLO, G. S.; SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **Pesquisa Botânica,** v. 56, p. 285-320, 2005.

VIECELLI, C. A. **GUIA DE DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS EM PLANTAS**. 1 Ed. Toledo, PR: PUCPR/Grupo Marista, ASSOESTE. 2017. 112p.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Genetic resources of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

VIEIRA, W. L. et al. Leaf Morphological Plasticity of Tree Species from Two Developmental Stages in Araucaria Forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v. 57, p. 476-85, 2014.

WANG, Q. Q.; HUANG, H. Y.; WANG, Y. Z. Geographical Authentication of *Macrohyporia cocos* by a Data Fusion Method Combining Ultra-Fast Liquid Chromatography and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Molecules,** v. 24, n. 7, 2019.

WANG, W. et al. Neolignans from the Leaves of *Casearia sylvestris* SWARTZ. **Helvetica Chimica Acta,** v. 93, p. 139-46, 2010.

WANG, W. et al. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia,** v. 80, n. 7, p. 404-7, 2009a.

WANG, W. et al. Two New C13 nor-Isoprenoids from the Leaves of *Casearia sylvestris*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin,** v. 57, p. 636-8, 2009b.

WANG, X. S. et al. The effect of δ-elemene on hela cell lines by apoptosis induction. **Yakugaku Zasshi,** v. 126, n. 10, p. 979-90, 2006.

XIA, L. et al. The genus Casearia: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews,** v. 14, p. 99-135, 2014.

YANG, X.; DEINZER, M. Hydrolysis and reversible isomerization of humulene epoxides II and III. **The Journal of Organic Chemistry,** v. 57, n. 17, p. 4717-22, 1992.

ZIAEI, A. et al. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. **Phytotherapy Research,** v. 25, n. 4, p. 557-62, 2011.

ZIGON, N. et al. Where is the Oxygen? Structural Analysis of α-Humulene Oxidation Products by the Crystalline Sponge Method. **Angewandte Chemie International Edition,** v. 54, n. 31, p. 9033-7, 2015.

C. sylvestris var. *sylvestris*, errado – Araraquara-SP. Fonte: O Autor

8 APÊNDICES

APÊNDICE 1

Tabela 1. Dados referentes as coletas sazonais na população FCF. Fonte https://www.ipmet.unesp.br/.

Data da coleta	Horário	T ºC		UR %	Pluviometria (mm)		IUV	Clima	Espécimens ( )
		dia	mês		dia	mês			
01/06/16	8:00 - 9:00	22	18,2	73	0	41,5	6	sol	Flores (3)
10/07/16	8:00 - 9:00	20	18,1	68	0	25,8	6	sol	Flores (3)
23/08/16	8:00 - 9:00	17	22,0	66	0	24,3	2	sol	Flores (1 - 4,10); Frutos (1, 3, 4, 6 - 9)
13/09/16	8:30 - 9:30	22	21,6	57	0	60,7	5	sol	Flores (1, 2); Flores e Frutos (3 - 10)
05/10/16	8:20 - 9:20	19	22,6	72	0	123,5	2	sol	Frutos (2 - 7, 9)
04/11/16	8:30 - 9:30	20	23,0	85	0	159,3	5	sol	Flores (3 – 6); Frutos secos (5, 6)
01/12/16	9:30 - 10:30	23	27,0	80	0	224,0	6	sol	Frutos verdes (1)
04/01/17	9:30 - 10:30	27	26,0	68	0	328,6	9	sol	-----
01/02/17	9:00 - 10:00	20	26,0	82	0	297,7	2	nublado	Ataque herbívoro (9)
04/03/17	8:00 - 9:00	24	26,0	83	0	226,3	5	sol	-----
03/04/17	8:00 - 9:00	21	25,2	71	0	102,0	4	sol	-----
04/05/17	8:00 - 9:00	22	23,1	71	0	52,7	2	nublado	Flores (2- 4, 10)
02/06/17	8:00 - 9:00	12	22,0	94	0	19,0	2	sol	Flores (4, 6); 3 Frutos verdes (3)
03/07/17	8:00 - 9:00	16	23,0	70	0	11,0	2	sol	Flores (3, 4, 6, 7)
01/08/17	8:00 - 9:00	17	25,0	52	0	24,8	1	sol/vento	Flores (1 - 10)
02/09/17	8:30 - 9:30	19	27,0	63	0	69,0	1	sol/vento	Flores (1, 2, 5 - 10); Frutos (3 - 10)
02/10/17	8:40 - 9:40	20	28,0	82	9	114,7	1	chuva	Frutos (1- 2, 5 - 10)
03/11/17	9:00 - 10:00	23	28,0	67	0	195,0	3	sol/vento	-----
03/12/17	9:00 - 10:00	23	27,0	76	0	285,2	3	nublado	-----
04/01/18	8:00 - 9:00	21	27,0	89	0	319,3	1	sol	-----
02/02/18	8:30 - 9:30	21	27,0	81	0	274,0	1	nublado	-----
01/03/18	8:30 - 9:30	25	26,0	79	0	226,3	4	sol	-----
02/04/18	9:00 - 10:00	22	25,0	81	0	105,0	1	nublado	-----
04/05/18	9:00 - 10:00	24	23,0	49	0	41,0	2	sol	-----

Tabela 2. Dados referentes as coletas sazonais na população EEA. Fonte https://www.ipmet.unesp.br/.

Data da coleta	Horário	T ºC		UR %	Pluviometria (mm)		IUV	Clima	Espécimens ( )
		dia	mês		dia	mês			
10/06/16	8:30 - 9:30	13	18,2	68	0	41,5	5	sol	Flores (4)
14/07/16	8:40 - 9:40	26	18,1	47	0	25,8	6	sol	Flores (1, 3 - 9)
26/08/16	8:20 - 9:20	23	22,0	49	0	24,3	4	sol	Flores e Frutos (1 - 9)
21/09/16	8:40 - 9:40	18	21,6	52	0	60,7	7	sol/vento	Flores (1 - 4, 7 - 9); Frutos (3 - 7)
19/10/16	8:10 - 9:10	24	22,6	91	0	123,5	8	sol	9 Flores (1 - 9); Frutos (1, 4 - 6)
09/11/16	8:10 - 9:10	25	23,0	72	0	159,3	8	sol	-----
09/12/16	9:20 - 10:20	27	27,0	72	0	224,0	8	sol	-----
12/01/17	9:00 - 10:00	23	26,0	99	0	328,6	2	nublado	Ataque herbívoro (4, 8)
09/02/17	8:00 - 9:00	25	26,0	74	0	297,7	7	sol	Ataque herbívoro (4)
09/03/17	8:00 - 9:00	28	26,0	70	0	226,3	7	sol	Ataque herbívoro (4)
10/04/17	8:00 - 9:00	24	25,2	68	0	102,0	7	sol	Ataque herbívoro (4)
05/05/17	8:00 - 9:00	22	23,1	73	3,0	52,7	2	nublado	Ataque herbívoro (4)
05/06/17	8:00 - 9:00	20	22,0	78	0	19,0	1	sol	Ataque herbívoro (8)
06/07/17	8:00 - 9:00	16	23,0	66	0	11,0	3	sol/vento	Flores (1 - 3, 5 - 7); At. Herbívoro (4, 8)
07/08/17	9:00 - 10:00	20	25,0	45	0	24,8	2	sol	Flores (1 - 10); Folhas secas (4)
06/09/17	8:40 - 9:40	24	27,0	36	0	69,0	3	sol	Flores e Frutos (1 - 10); sem folhas (4)
06/10/17	8:40 - 9:40	27	28,0	54	0	114,7	5	sol	Frutos (1 - 10); poucas folhas (4)
01/11/17	9:00 - 10:00	19	28,0	71	0	195,0	3	sol/vento	Poucas folhas (4)
01/12/17	8:40 - 9:40	19	27,0	95	0	285,2	1	nublado	Ataque herbívoro (4)
05/01/18	9:00 - 10:00	23	27,0	86	0	319,3	3	sol	Poucas folhas (4)
05/02/18	9:00 - 10:00	21	27,0	72	0	274,0	2	nublado	Ataque herbívoro (4)
05/03/18	9:00 - 10:00	27	26,0	68	0	226,3	4	sol	----
06/04/18	9:00 - 10:00	23	25,0	70	0	105,0	3	sol	-----
02/05/18	9:00 - 10:00	24	23,0	57	0	41,0	3	sol	-----

Tabela 3. Dados referentes as coletas populacionais (FCF, EEA, CB e FCA). Fonte https://www.ipmet.unesp.br/.

População	Data da coleta	Horário	T ºC		UR %	Pluviometria (mm)		IUV	Clima	Espécimens ( )
			dia	mês		dia	mês			
FCF	10/06/16	8:30 - 9:30	13	18,2	68	0	41,5	5	sol	Flores (4)
FCF	01/12/16	9:30 - 10:30	23	27,0	80	0	224,0	6	sol	Frutos verdes (1)
EEA	10/06/16	8:30 - 9:30	13	18,2	68	0	41,5	5	sol	Flores (4)
EEA	09/12/16	9:20 - 10:20	27	27,0	72	0	224,0	8	sol	-----
CB	28/07/16	10:00 -13:00	14	16,5	69	0	55,7	2	nublado	Fungos (1 - 8)
CB	13/12/16	10:00 - 13:00	18	26,2	67	0	250,2	7	sol	Fungos e Frutos (1 - 10)
FCA	29/07/16	13:00 - 15:00	25	23,2	61	0	37,7	6	sol	Fungos (1 - 10)
FCA	14/12/16	11:00 - 13:00	22	26,2	69	0	210,2	6	nublado	Fungos (1 - 10)

Tabela 4. Dados referentes as coletas circadianas na população FCF. Fonte https://www.ipmet.unesp.br/.

Data da coleta	Horário	T ºC		UR %	Pluviometria (mm)		IUV	Clima	Espécimens ( )
		dia	mês		dia	mês			
01/02/17	9:00 - 10:00	20	26,0	82	0	297,7	2	nublado	Ataque herbívoro (9)
01/02/17	15:00 - 16:00	28		60	0		9	sol	
01/02/17	21:00 - 22:00	20		41	0		0	claro	
02/02/17	3:00 - 4:00	19		80	10		0	chuva	
01/08/17	8:00 - 9:00	17	25,0	52	0	24,8	1	sol/vento	-----
01/08/17	14:00 - 15:00	25		25	0		3	sol	
01/08/17	20:00 - 21:00	18		53	0		0	claro	
02/08/17	2:00 - 3:00	16		56	0		0	claro	

Tabela 5. Dados referentes as coletas circadianas na população EEA. Fonte https://www.ipmet.unesp.br/.

Data da coleta	Horário	T ºC		UR %	Pluviometria (mm)		IUV	Clima	Espécimens ( )
		dia	mês		dia	mês			
09/02/17	9:00 - 10:00	25	26,0	74	0	297,7	7	sol	Ataque herbívoro (4)
09/02/17	15:00 - 16:00	33		41	0		14	sol	
09/02/17	21:00 - 22:00	27		40	0		0	claro	
10/02/17	3:00 - 4:00	22		73	0		0	claro	
07/08/17	9:00 - 10:00	20	25,0	45	0	24,8	2	sol	Flores (1 - 10); Folhas secas (4); Ataque herbívoro (8)
07/08/17	14:30 - 15:30	28		25	0		3	claro	
07/08/17	21:00 - 22:00	22		49	0		0	claro	
08/08/17	2:30 - 3:30	17		63	0		0	claro	

APÊNDICE 2

Tabela 1. Dimensões das folhas (duplicata), altura (estimada) e diâmetro do caule à altura do peito (DAP) dos espécimens de *C. sylvestris* var. *sylvestris* da população FCF.

Espécimens	Folhas comp. x largura (cm x cm)[1]	Folhas comp. x largura (cm x cm)[2]	Altura (m)[3]	Tronco (cm)[4]
FCF 101	10,0 x 3,1	9,0 x 2,9	8,0	40,0
FCF 102	9,5 x 2,6	9,0 x 2,6	8,0	25,0
FCF 103	10,0 x 2,9	10,0 x 2,9	2,5	15,0
FCF 104	9,1 x 3,0	9,6 x 3,1	5,0	18,0
FCF 105	7,5 x 2,8	7,8 x 2,5	2,5	11,0
FCF 106	8,0 x 2,3	8,3 x 2,1	2,5	15,0
FCF 107	7,0 x 2,5	7,0 x 2,7	3,0	10,0
FCF 108	8,9 x 3,2	8,1 x 3,0	3,5	14,0
FCF 109	8,0 x 2,8	7,4 x 2,0	2,5	10,0
FCF 110	13,0 x 3,4	13,5 x 3,5	2,5	10,0
Média	9,0 ± 1,7 x 2,8 ± 0,4		4,0 ± 2,2	16,8 ± 9,3

[1]Determinação 1; [2]Determinção 2; [3]Altura estimada; [4]DAP

Tabela 2. Dimensões das folhas (duplicata), altura (estimada) e diâmetro do caule à altura do peito (DAP) dos espécimens de *C. sylvestris* var. *sylvestris* da população CB.

Espécimens	Folhas comp. x largura (cm x cm)[1]	Folhas comp. x largura (cm x cm)[2]	Altura (m)[3]	Tronco (cm)[4]
CB 401	7,0 x 2,4	6,5 x 2,6	5,0	23,0
CB 402	10,0 x 3,0	9,0 x 3,2	4,0	26,0
CB 403	8,3 x 3,0	8,2 x 2,8	4,0	25,0
CB 404	9,0 x 3,0	9,2 x 3,0	6,0	37,0
CB 405	8,5 x 3,0	9,0 x 3,2	3,0	23,0
CB 406	7,5 x 2,5	7,0 x 2,6	3,5	28,0
CB 407	7,5 x 2,3	7,0 x 2,4	6,0	40,0
CB 408	8,9 x 2,9	8,2 x 2,6	4,5	42,0
CB 409	10,5 x 3,2	9,5 x 3,0	3,0	23,0
CB 410	11,0 x 2,8	11,8 x 3,0	6,0	35,0
Média	8,7 ± 1,4 x 2,8 ± 0,3		4,5 ± 1,2	30,2 ± 7,5

[1]Determinação 1; [2]Determinação 2; [3]Altura estimada; [4]DAP

Tabela 3. Dimensões das folhas (duplicata), altura (estimada) e diâmetro do caule à altura do peito (DAP) dos espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua* da população EEA.

Espécimens	Folhas comp. x largura (cm x cm)[1]	Folhas comp. x largura (cm x cm)[2]	Altura (m)[3]	Tronco (cm)[4]
EEA 201	7,1 x 2,2	6,5 x 2,0	5,0	51,0
EEA 202	7,0 x 2,0	6,0 x 2,4	4,0	47,0
EEA 203	7,0 x 2,1	6,7 x 2,1	4,0	35,0
EEA 204	7,0 x 2,7	7,4 x 2,8	3,0	21,0
EEA 205	6,0 x 2,0	6,0 x 1,8	2,5	25,0
EEA 206	7,5 x 1,7	7,5 x 2,1	2,0	25,0
EEA 207	7,8 x 2,4	7,0 x 2,2	4,0	40,0
EEA 208	8,3 x 2,6	8,1 x 2,4	3,0	11,0
EEA 209	8,0 x 2,5	8,3 x 2,5	2,5	21,0
EEA 210	6,5 x 2,2	6,7 x 2,3	4,0	14,0
Média	7,1 ± 0,7 x 2,3 ± 0,3		3,6 ± 0,9	29,0 ± 13,6

[1]Determinação 1; [2]Determinação 2; [3]Altura estimada; [4]DAP

Tabela 4. Dimensões das folhas (duplicata), altura (estimada) e diâmetro do caule à altura do peito (DAP) dos espécimens de *C. sylvestris* var. *lingua* da população FCA.

Espécimens	Folhas comp. x largura (cm x cm)[1]	Folhas comp. x largura (cm x cm)[2]	Altura (m)[3]	Tronco (cm)[4]
FCA 301	9,5 x 2,9	9,6 x 2,0	3,0	22,0
FCA 302	7,8 x 2,8	7,5 x 2,8	5,0	45,0
FCA 303	8,5 x 2,0	9,5 x 2,0	3,0	12,0
FCA 304	10,0 x 2,8	9,8 x 2,8	2,5	16,0
FCA 305	9,5 x 2,8	9,5 x 2,0	4,0	17,0
FCA 306	10,5 x 3,3	10,0 x 3,1	2,5	20,0
FCA 307	9,0 x 3,0	8,0 x 3,0	4,0	23,0
FCA 308	11,2 x 3,2	11,5 x 3,2	4,0	15,0
FCA 309	11,5 x 2,9	11,2 x 3,0	3,0	16,0
FCA 310	9,0 x 2,7	9,7 x 2,8	5,0	25,0
Média	9,6 ± 1,2 x 0,5 ± 0,5		3,6 ± 0,9	21,1 ± 9,3

[1]Determinação 1; [2]Determinação 2; [3]Altura estimada; [4]DAP

APÊNDICE 3

Tabela 1. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população FCF, Jul/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
limoneno	15,993	1032	1029	96	0,13
-----	31,999	1333	-----	-----	1,11
δ-elemeno	32,153	1344	1352	96	7,79
α-cubebeno	33,003	1354	1348	94	0,16
ciclosativeno	33,729	1370	1371	96	0,56
isoledeno	34,061	1377	1376	95	0,24
α-copaeno	34,213	1380	1376	95	3,28
β-cubebeno	34,356	1383	1388	91	0,13
β-bouborneno	34,603	1389	1388	91	0,48
β-elemeno	34,940	1396	1390	96	4,27
α-gurjuneno	35,696	1414	1409	96	0,63
-----	35,845	1417	-----	-----	0,16
E-cariofileno	36,187	1426	1417	96	7,47
β-copaeno	36,532	1435	1432	95	1,22
γ-elemeno	36,712	1439	1436	94	0,44
-----	36,767	1440	-----	-----	0,27
aromadendreno	36,957	1445	1441	96	2,75
6,9-guaiadieno	37,131	1449	1444	91	0,79
-----	37,367	1455	-----	-----	0,23
α-humuleno	37,657	1462	1454	90	12,15
9-*epi*-*E*-cariofileno	37,897	1468	1466	95	1,92
10-*epi*-*β*-acoradieno	38,123	1475	1474	92	0,95
γ-gurjuneno	38,466	1483	1477	89	1,08
γ-muuroleno	38,575	1485	1479	92	0,51
germacreno D	38,781	1490	1485	96	6,31
β-selineno	38,978	1495	1490	95	2,69
E-*β*-guaieno	39,399	1505	1502	92	7,79
biciclogermacreno	39,575	1510	1500	95	15,71
Z-*γ*-bisaboleno	39,772	1515	1515	91	1,34
γ-cadineno	40,077	1523	1513	95	0,65
-----	40,150	1524	-----	-----	0,38
δ-cadineno	40,472	1532	1523	97	5,46
E-cadina-1,4-dieno	40,791	1540	1534	91	0,21
-----	41,784	1565	-----	-----	0,08
-----	41,915	1568	-----	-----	0,79
maliol	42,215	1576	1567	91	0,51
espatulenol	42,631	1586	1578	96	1,26
globulol	42,878	1592	1590	93	1,75
viridiflorol	43,181	1600	1592	93	1,47
-----	43,557	1610	-----	-----	0,45
-----	43,717	1614	-----	-----	0,11
-----	43,832	1618	-----	-----	0,33
-----	44,000	1622	-----	-----	0,11
-----	44,330	1632	-----	-----	0,36
-----	44,433	1634	-----	-----	0,13
-----	44,523	1637	-----	-----	0,50
γ-eudesmol	44,660	1641	1632	95	0,82
cubenol	44,917	1648	1646	89	0,25
α-muurolol	45,043	1651	1646	89	0,44
α-eudesmol	45,497	1664	1653	88	1,38
Identificado					**95,2**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 2. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população FCF, Dez/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
α-copaeno	34,226	1380	1376	96	0,48
β-elemeno	34,939	1396	1390	96	1,25
aromadendreno	36,969	1445	1441	96	1,46
α-humuleno	37,581	1461	1454	93	0,45
10-*epi*-*β*-acoradieno	38,136	1474	1475	92	0,84
γ-gurjuneno	38,462	1582	1477	89	0,36
curcumeno	38,756	1490	1480	96	4,37
β-selineno	38,956	1495	1490	92	2,56
E-*β*-guaieno	39,322	1504	1502	89	1,06
-----	39,503	1508	-----	-----	0,31
γ-cadineno	40,077	1523	1513	88	0,41
-----	40,164	1525	-----	-----	0,62
-----	41,191	1550	-----	-----	0,76
silfiperfol-5-en-3-ol A	41,631	1561	1559	90	1,64
germacreno B	41,928	1568	1561	91	1,74
palustrol	42,234	1576	1568	90	1,58
-----	42,397	1580	-----	-----	0,62
espatulenol	42,714	1588	1578	95	24,37
óxido de cariofileno	42,887	1592	1583	93	13,81
-----	43,083	1597	-----	-----	0,54
viridiflorol	43,205	1600	1592	94	4,48
-----	43,468	1608	-----	-----	0,98
ledol	43,645	1612	1602	90	0,03
epóxido de humuleno II	43,883	1619	1608	90	15,09
-----	44,626	1640	-----	-----	1,56
-----	44,683	1641	-----	-----	1,28
-----	44,903	1647	-----	-----	0,49
-----	45,075	1652	-----	-----	0,62
-----	45,226	1656	-----	-----	0,29
α-cadinol	45,554	1666	1654	89	1,44
-----	45,730	1671	-----	-----	0,62
-----	45,878	1675	-----	-----	0,30
-----	46,076	1680	-----	-----	0,38
-----	46,193	1683	-----	-----	0,57
-----	46,313	1687	------	-----	0,61
-----	46,468	1691	-----	-----	0,52
-----	46,709	1698	-----	-----	0,40
-----	47,650	1724	-----	-----	0,37
-----	47,748	1727	-----	-----	0,77
-----	47,919	1732	-----	-----	0,25
-----	48,148	1738	-----	-----	1,41
-----	48,325	1743	-----	-----	0,37
-----	48,622	1751	-----	-----	1,17
-----	48,817	1757	-----	-----	0,26
-----	48,934	1760	-----	-----	1,01
-----	49,033	1763	-----	-----	2,56
-----	49,560	1777	-----	-----	1,24
-----	49,744	1782	-----	-----	0,90
-----	50,032	1790	-----	-----	0,53
-----	55,093	1945	-----	-----	0,27
Identificado					**78,2**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 3. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população EEA, Jul/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
α-copaeno	34,233	1381	1376	93	0,28
β-elemeno	34,948	1396	1390	95	1,19
E-cariofileno	36,134	1425	1419	89	0,26
aromadendreno	36,977	1446	1441	95	0,76
α-humuleno	37,588	1461	1454	95	0,66
9-*epi*-*E*-cariofileno	37,900	1468	1466	93	0,38
γ-muuroleno	38,541	1484	1479	93	1,23
β-selineno	38,970	1495	1490	92	0,54
-----	39,324	1504	-----	-----	1,49
α-muuroleno	39,519	1509	1500	92	0,93
γ-cadineno	40,082	1523	1513	95	1,50
-----	40,164	1525	-----	-----	1,41
-----	40,451	1532	-----	-----	0,98
-----	41,152	1549	-----	-----	2,04
-----	41,645	1561	-----	-----	0,91
maliol	41,925	1568	1567	92	0,48
E-nerolidol	42,012	1571	1563	91	0,82
palustrol	42,235	1576	1568	91	2,10
-----	42,403	1580	-----	-----	0,36
espatulenol	42,665	1587	1578	96	20,26
globulol	42,875	1592	1590	90	10,35
-----	43,035	1596	-----	-----	0,56
rosifoliol	43,200	1600	1600	89	6,81
-----	43,458	1607	-----	-----	0,42
5-*epi*-7-*epi*-*α*-eudesmol	43,631	1612	1607	89	3,22
epóxido de humuleno II	43,861	1618	1608	89	8,13
-----	44,050	1624	-----	-----	0,50
junenol	44,208	1628	1619	89	1,37
Z-cadin-4-en-7-ol	44,559	1638	1636	89	2,30
-----	44,708	1642	-----	-----	0,77
cubenol	45,069	1652	1646	90	4,67
α-muurolol	45,226	1656	1646	89	1,40
-----	45,411	1662	-----	-----	0,36
α-cadinol	45,547	1665	1654	91	9,21
-----	45,732	1671	-----	-----	0,75
-----	46,188	1683	-----	-----	0,24
-----	46,852	1702	-----	-----	0,30
-----	46,966	1705	-----	-----	0,40
-----	47,801	1728	-----	-----	1,83
-----	48,150	1738	-----	-----	1,10
-----	48,341	1743	-----	-----	0,93
-----	48,525	1748	-----	-----	0,27
-----	48,625	1751	-----	-----	1,04
-----	48,833	1757	-----	-----	0,44
-----	48,937	1760	-----	-----	1,20
-----	49,091	1764	-----	-----	0,59
------	49,570	1778	-----	-----	1,07
-----	49,755	1783	-----	-----	0,62
-----	49,966	1789	-----	-----	0,55
-----	52,071	1981	-----	-----	0,52
Identificado					**78,8**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 4. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população EEA, Dez/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
δ-elemeno	32,485	1343	1338	96	0,51
ciclosativeno	33,759	1370	1371	95	0,29
α-copaeno	34,228	1381	1376	96	1,95
β-bourboneno	34,633	1389	1388	92	0,22
β-elemeno	34,945	1396	1390	95	3,15
α-gurjuneno	35,764	1415	1409	92	1,11
E-cariofileno	36,136	1425	1419	95	1,70
β-copaeno	36,554	1435	1432	95	0,81
γ-elemeno	36,719	1439	1436	95	0,56
aromadendreno	36,975	1446	1441	96	1,08
α-humuleno	37,602	1461	1454	98	5,66
9-*epi*-*E*-cariofileno	37,903	1469	1466	96	1,35
germacreno D	38,542	1488	1485	94	1,93
valenceno	38,687	1495	1496	94	0,31
E-*β*-guaieno	38,968	1504	1502	93	0,25
α-muuroleno	39,322	1509	1500	89	1,51
γ-cadineno	39,522	1523	1513	95	1,86
δ-cadineno	40,085	1525	1523	96	1,92
-----	40,166	1532	-----	-----	1,17
Z-calameneno	40,452	1546	1529	89	0,75
α-cadineno	41,008	1546	1538	89	0,18
------	41,164	1550	-----	-----	0,92
-----	41,642	1561	-----	-----	0,72
E-nerolidol	42,000	1570	1561	90	1,23
palustrol	42,244	1576	1568	91	1,57
espatulenol	42,734	1588	1578	95	14,99
óxido de cariofileno	42,908	1593	1583	92	8,74
-----	43,051	1596	-----	-----	0,29
viridiflorol	43,232	1601	1592	95	4,80
-----	43,499	1608	-----	-----	1,61
5-*epi*-7-*epi*-*α*-eudesmol	43,646	1612	1607	89	2,74
epóxido de humuleno II	43,907	1620	1608	89	8,77
-----	44,075	1624	-----	-----	0,26
junenol	44,225	1629	1619	89	0,99
Z-cadin-4-en-7-ol	44,467	1635	1636	90	2,57
-----	44,616	1640	-----	-----	0,60
-----	44,725	1643	-----	-----	0,76
α-muurolol	45,089	1653	1646	90	5,35
cubenol	45,237	1657	1646	89	1,44
-----	45,419	1662	-----	-----	0,42
α-cadinol	45,574	1666	1654	91	7,63
-----	45,726	1670	-----	-----	0,67
-----	46,075	1680	-----	-----	0,20
-----	46,175	1683	-----	-----	0,68
-----	46,966	1705	-----	-----	0,20
-----	47,831	1729	-----	-----	1,14
-----	48,335	1743	-----	-----	0,58
-----	48,616	1751	-----	-----	1,09
-----	49,582	1778	-----	-----	0,41
-----	49,687	1781	-----	-----	0,36
Identificado					**86,7**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 5. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população CB, Jul/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
-----	31,961	1332	-----	-----	0,52
δ-elemeno	32,440	1342	1338	96	6,32
α-cubebeno	32,968	1354	1348	94	0,10
ciclosativeno	33,692	1369	1371	96	0,11
isodeleno	33,965	1375	1376	93	0,26
α-copaeno	34,166	1379	1376	96	1,87
-----	34,571	1388	-----	-----	0,96
β-elemeno	34,931	1396	1389	97	8,12
α-gurjuneno	35,678	1413	1409	95	4,46
E-cariofileno	36,164	1425	1419	96	10,72
-----	36,342	1430	-----	-----	0,09
β-copaeno	36,494	1434	1432	95	0,89
γ-elemeno	36,667	1438	1436	94	2,90
aromadendreno	36,898	1444	1441	94	2,63
6,9-guaiadieno	37,081	1448	1444	91	1,19
alloaromadendreno	37,335	1454	1460	90	0,45
α-humuleno	37,539	1460	1454	95	2,97
9-*epi*-*E*-cariofileno	37,844	1467	1466	94	1,28
-----	38,150	1475	-----	-----	0,16
γ-gurjuneno	38,316	1479	1477	93	0,33
γ-muuroleno	38,523	1484	1479	91	1,20
germacreno D	38,760	1490	1485	97	10,93
β-selineno	38,935	1494	1490	96	2,23
valenceno	39,018	1496	1496	93	0,82
α-muuroleno	39,143	1499	1500	93	0,36
biciclogermacreno	39,437	1507	1500	93	15,16
Z-*γ*-bisaboleno	39,697	1513	1515	90	2,24
γ-cadineno	40,022	1521	1513	97	1,31
δ-cadineno	40,401	1531	1523	97	4,92
-----	40,747	1539	-----	-----	0,08
α-cadineno	40,956	1544	1538	90	0,11
germacreno B	41,749	1564	1561	95	1,21
-----	41,867	1567	-----	-----	0,77
palustrol	42,184	1575	1568	90	0,62
espatulenol	42,587	1585	1578	95	1,13
globulol	42,838	1591	1590	93	1,64
viridiflorol	43,150	1599	1592	95	1,18
-----	43,207	1600	-----	-----	1,52
guaiol	43,327	1604	1600	93	1,15
-----	43,574	1610	-----	-----	0,61
-----	43,947	1621	-----	-----	0,13
-----	44,133	1626	-----	-----	0,07
-----	44,297	1631	-----	-----	1,35
-----	44,499	1636	-----	-----	0,36
Z-cadin-4-en-7-ol	44,644	1640	1636	89	0,11
-----	44,875	1647	-----	-----	0,18
α-muurolol	44,998	1650	1646	90	0,53
-----	45,367	1660	-----	-----	0,13
α-cadinol	45,489	1664	1654	89	0,88
bulnesol	45,949	1677	1671	92	0,74
Identificado					**94,2**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 6. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população CB, Dez/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
α-copaeno	34,217	1380	1376	92	0,24
β-bouborneno	34,619	1389	1388	91	0,24
β-elemeno	34,955	1396	1390	97	12,22
E-cariofileno	36,129	1421	1419	95	0,88
aromadendreno	36,695	1439	1441	96	1,21
α-humuleno	37,578	1460	1454	91	0,19
9-*epi*-*E*-cariofileno	37,892	1468	1466	94	0,19
γ-gurjuneno	38,503	1483	1477	90	0,88
β-selineno	38,956	1495	1490	95	4,31
γ-patchouleno	39,318	1504	1502	89	0,92
α-muuroleno	39,508	1508	1500	87	0,24
γ-cadineno	40,075	1522	1513	93	0,59
cubebol	40,156	1524	1515	84	0,31
-----	41,160	1549	-----	-----	0,50
silfiperfol-5-en-3-ol A	41,629	1561	1559	92	2,27
germacreno B	41,933	1569	1561	92	1,73
palustrol	42,236	1576	1568	89	1,94
-----	42,514	1583	-----	-----	0,51
espatulenol	42,732	1588	1578	95	16,65
óxido de cariofileno	42,916	1593	1583	96	21,61
viridiflorol	43,204	1600	1592	93	3,14
-----	43,477	1608	-----	-----	0,70
ledol	43,631	1612	1602	89	0,94
epóxido de humuleno II	43,864	1619	1608	87	3,62
-----	44,006	1623	-----	-----	1,26
-----	44,207	1628	-----	-----	0,21
Z-cadin-4-en-7-ol	44,596	1639	1636	88	0,62
-----	44,742	1643	-----	-----	0,29
-----	44,891	1647	-----	-----	0,41
α-muurolol	45,069	1652	1646	88	0,47
-----	45,242	1657	-----	-----	0,25
-----	45,417	1662	-----	-----	0,70
bulnesol	45,571	1666	1671	88	4,40
-----	45,720	1670	-----	-----	1,01
-----	45,841	1674	-----	-----	0,35
Z-*α*-santalol	46,191	1683	1675	89	2,51
-----	46,306	1687	-----	-----	0,51
-----	46,616	1695	-----	-----	0,30
-----	47,520	1720	-----	-----	1,08
-----	47,750	1727	-----	-----	1,04
-----	47,891	1731	-----	-----	0,85
-----	48,027	1735	-----	-----	1,13
-----	48,621	1751	-----	-----	0,25
-----	48,841	1757	-----	-----	0,73
-----	48,933	1760	-----	-----	0,42
-----	49,028	1762	-----	-----	1,65
-----	49,343	1771	-----	-----	0,57
-----	49,570	1778	-----	-----	1,05
-----	49,742	1782	-----	-----	1,68
-----	50,380	1800	-----	-----	0,23
Identificado					**84,0**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 7. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população FCA, Jul/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
-----	32,020	1333	-----	-----	0,86
δ-elemeno	32,545	1345	1338	93	10,53
α-cubebeno	33,030	1355	1348	96	1,39
isoledeno	34,081	1377	1376	94	0,11
α-copaeno	34,221	1380	1376	96	1,82
β-cubebeno	34,624	1389	1388	93	0,47
β-elemeno	34,965	1396	1390	96	5,64
α-gurjuneno	35,774	1416	1409	93	3,61
E-cariofileno	36,154	1425	1419	96	3,77
β-copaeno	36,542	1435	1432	93	0,56
γ-elemeno	36,727	1439	1436	94	2,94
aromadendreno	36,957	1445	1441	94	2,21
6,9-guaiadieno	37,145	1450	1444	91	2,37
E-muurola-3,5-dieno	37,473	1458	1453	93	4,96
α-humuleno	37,607	1461	1454	95	1,63
9-*epi*-*E*-cariofileno	37,900	1468	1466	92	1,11
-----	38,212	1476	-----	-----	0,16
-----	38,419	1481	-----	-----	0,97
γ-muuroleno	38,548	1485	1479	90	0,74
germacreno D	38,767	1490	1485	96	4,97
β-selineno	38,978	1495	1490	96	1,65
E-*β*-guaieno	39,212	1501	1502	92	4,10
biciclogermacreno	39,552	1509	1500	94	19,08
Z-*γ*-bisaboleno	39,762	1515	1515	92	1,60
γ-cadineno	40,084	1523	1513	97	0,63
-----	40,158	1525	-----	-----	0,73
-----	40,462	1532	-----	-----	4,27
E-cadina-1,4-dieno	40,807	1541	1534	95	1,46
α-cadineno	41,008	1546	1538	89	0,11
-----	41,154	1549	-----	-----	0,21
-----	41,663	1562	-----	-----	0,09
germacreno B	41,808	1565	1561	96	1,30
maliol	41,931	1569	1567	93	0,48
palustrol	42,240	1576	1568	90	0,75
espatulenol	42,656	1587	1578	95	2,37
globulol	42,899	1593	1590	92	1,67
viridiflorol	43,206	1600	1592	91	2,24
5-*epi*-7-*epi*-*α*-eudesmol	43,582	1611	1607	94	1,73
-----	44,205	1628	-----	-----	0,09
-----	44,355	1632	-----	-----	0,67
-----	44,450	1635	-----	-----	0,26
-----	44,584	1639	-----	-----	1,22
-----	44,942	1649	-----	-----	0,37
cubenol	45,072	1652	1646	89	0,97
-----	45,225	1656	-----	-----	0,16
-----	45,408	1662	-----	-----	0,10
-----	45,547	1665	-----	-----	0,44
-----	45,857	1674	-----	-----	0,10
-----	46,498	1692	-----	-----	0,09
-----	57,026	2005	-----	-----	0,24
Identificado					**91,4**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 8. Composição química do OE de folhas de *C. sylvestris* da população FCA, Dez/16.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
δ-elemeno	32,473	1343	1338	90	0,24
α-copaeno	34,215	1380	1376	95	0,64
β-elemeno	34,931	1396	1390	94	1,72
aromadendreno	36,965	1445	1441	96	0,87
α-humuleno	37,579	1461	1454	92	0,73
9-*epi*-*E*-cariofileno	37,891	1468	1466	94	0,24
γ-muuroleno	38,532	1484	1479	89	0,45
β-selineno	38,954	1495	1490	94	2,23
-----	39,183	1500	-----	-----	0,39
-----	39,313	1504	-----	-----	1,96
α-muuroleno	39,507	1508	1500	90	0,33
-----	40,158	1525	-----	-----	3,03
Z-calameneno	40,444	1532	1529	95	4,58
-----	41,217	1551	-----	-----	0,78
-----	41,368	1555	-----	-----	2,32
-----	41,631	1561	-----	-----	1,45
-----	41,926	1568	-----	-----	0,64
-----	42,040	1571	-----	-----	0,24
palustrol	42,233	1576	1568	89	1,38
-----	42,390	1580	-----	-----	0,24
espatulenol	42,705	1588	1578	95	29,92
globulol	42,880	1592	1590	92	10,51
-----	43,031	1596	-----	-----	1,23
viridiflorol	43,204	1600	1592	92	3,25
-----	43,472	1608	-----	-----	0,97
ledol	43,637	1612	1602	91	2,67
epóxido de humuleno II	43,868	1619	1608	89	9,26
-----	44,004	1622	-----	-----	0,45
Z-cadin-4-en-7-ol	44,597	1639	1636	91	2,74
-----	44,775	1644	-----	-----	0,33
-----	44,925	1648	-----	-----	0,24
cubenol	45,074	1652	1646	89	1,41
-----	45,222	1656	-----	-----	0,38
-----	45,560	1666	-----	-----	1,21
-----	45,734	1671	-----	-----	1,36
-----	45,867	1674	-----	-----	0,31
-----	46,086	1680	-----	-----	0,73
-----	46,215	1684	-----	-----	0,40
-----	46,887	1703	-----	-----	0,49
-----	47,392	1717	-----	-----	0,30
-----	47,651	1724	-----	-----	0,28
-----	47,759	1727	-----	-----	0,54
-----	47,917	1731	-----	-----	0,50
-----	48,146	1738	-----	-----	0,66
-----	48,318	1743	-----	-----	1,02
-----	48,626	1751	-----	-----	0,78
-----	48,931	1760	-----	-----	1,10
-----	49,086	1764	-----	-----	0,89
-----	49,574	1778	-----	-----	0,82
-----	49,688	1781	-----	-----	0,79
Identificado					**73,1**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

APÊNDICE 4

Figura 1. CG-EM do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações FCF e EEA (julho e dezembro de 2016).

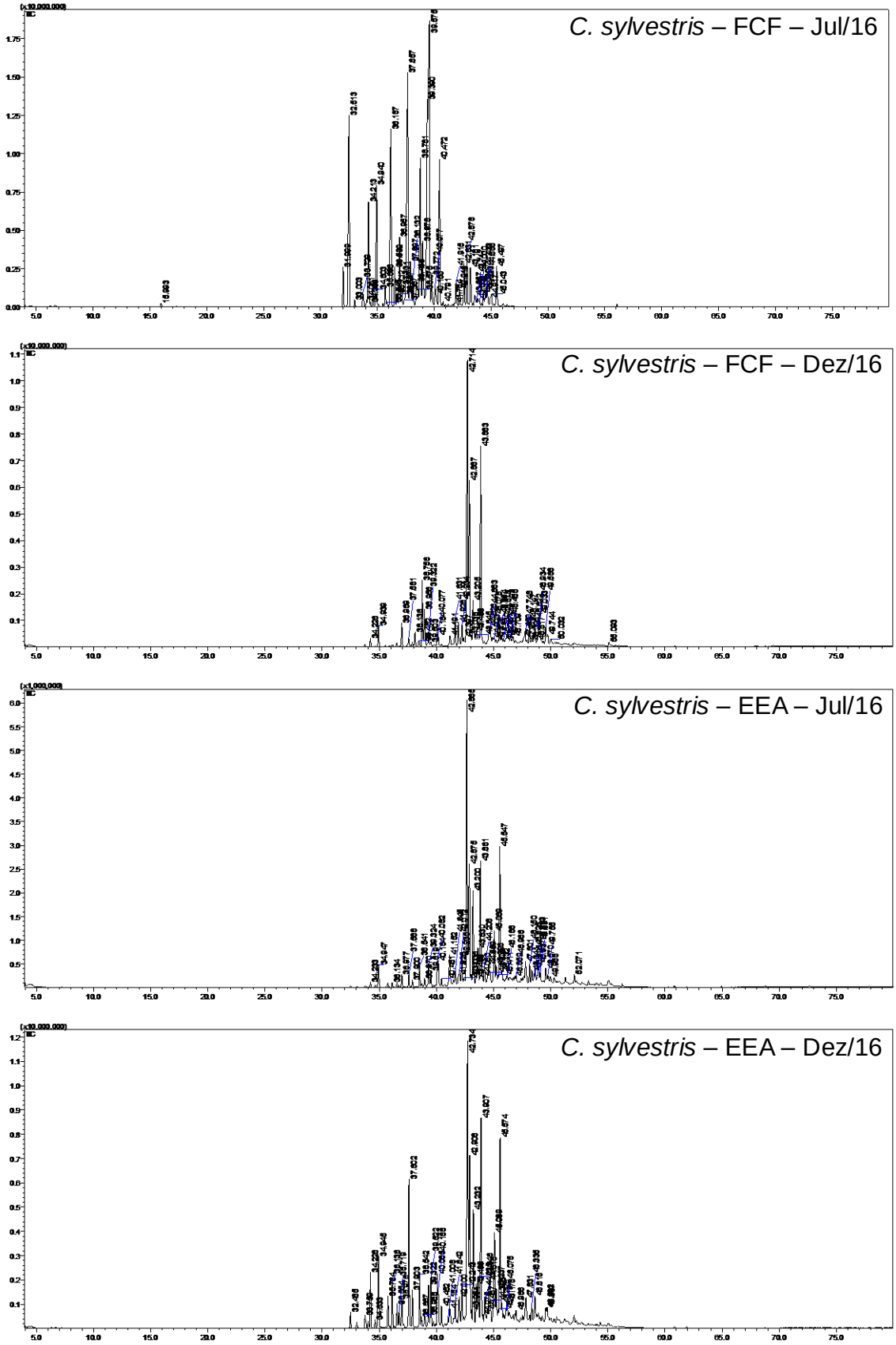
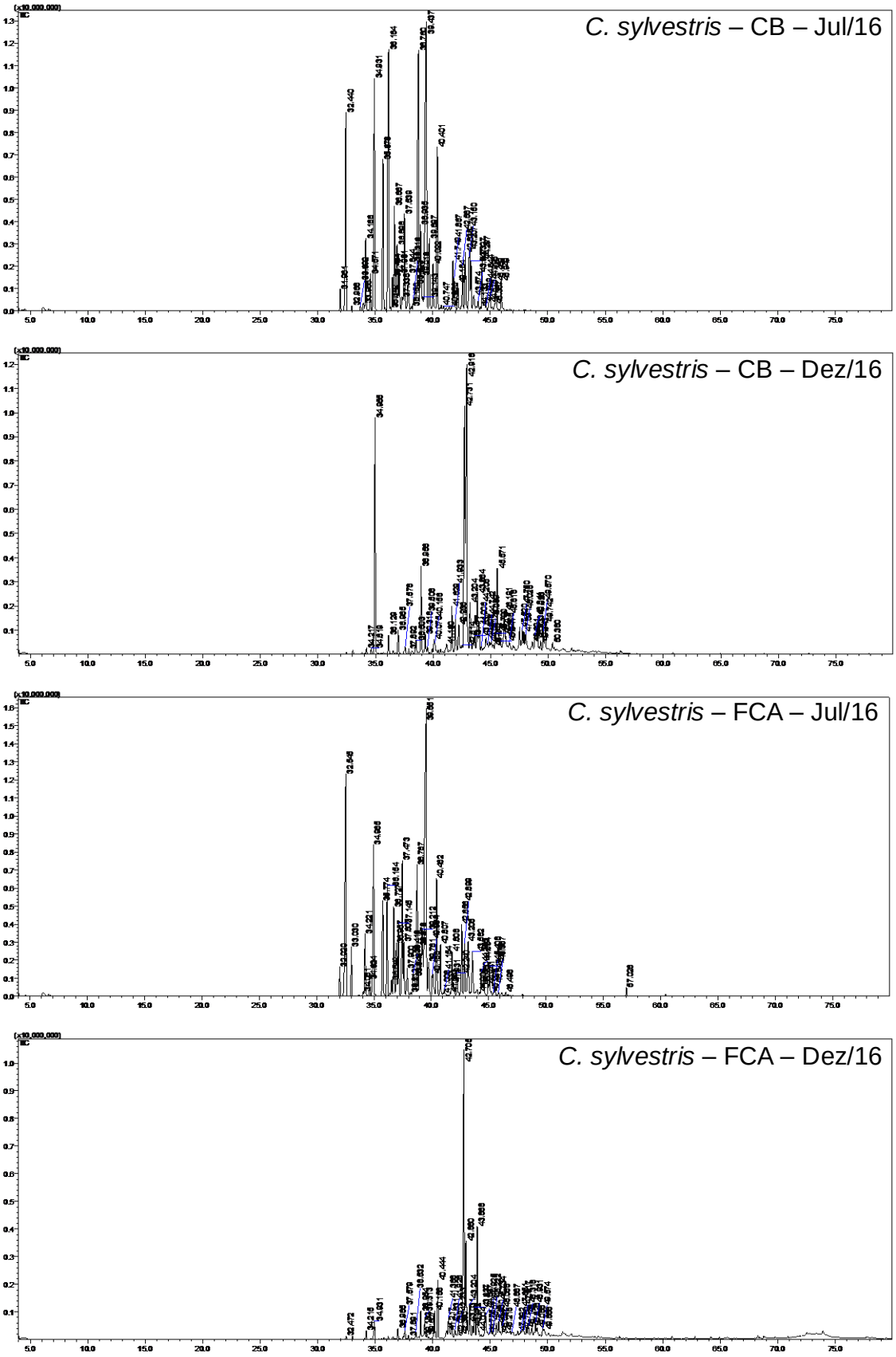


Figura 2. CG-EM do OE de folhas de *C. sylvestris* das populações CB e FCA (julho e dezembro de 2016).



APÊNDICE 5

Tabela 1. Composição química dos componentes voláteis das folhas *in natura* de *C. sylvestris* da população FCF.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
δ-elemeno	29,765	1337	1338	90	0,40
α-cubebeno	30,348	1350	1348	96	1,05
ciclosativeno	30,998	1364	1371	93	0,50
α-copaeno	31,604	1377	1376	97	13,83
-----	31,917	1384	-----	-----	0,30
β-cubebeno	32,191	1390	1388	93	0,73
β-elemeno	32,289	1392	1390	97	0,96
E-cariofileno	33,555	1422	1419	98	18,65
β-copaeno	33,869	1429	1432	92	0,68
-----	34,767	1451	-----	-----	0,20
α-humuleno	34,910	1454	1544	95	2,21
alloaromadendreno	35,222	1462	1460	96	2,06
-----	35,767	1475	-----	-----	0,07
γ-muuroleno	35,933	1479	1479	94	0,59
germacreno D	36,107	1483	1485	96	3,92
β-selineno	36,304	1487	1390	95	1,80
α-selineno	36,739	1498	1492	93	10,87
-----	36,909	1502	-----	-----	0,32
γ-cadineno	37,450	1516	1513	94	0,37
-----	37,579	1519	-----	-----	0,86
δ-cadineno	38,023	1530	1523	97	26,81
-----	38,236	1536	-----	-----	0,46
-----	38,653	1546	-----	-----	2,43
-----	39,433	1566	-----	-----	1,09
germacreno D-4-ol	39,939	1579	1575	92	0,54
espatulenol	40,057	1582	1578	95	1,15
óxido de cariofileno	40,218	1586	1583	95	1,39
-----	41,066	1608	-----	-----	1,55
-----	41,731	1626	-----	-----	0,46
-----	41,982	1633	-----	-----	1,54
-----	42,278	1641	-----	-----	0,44
-----	42,435	1645	-----	-----	0,21
-----	42,955	1659	-----	-----	0,71
-----	43,150	1664	-----	-----	0,33
-----	44,134	1691	-----	-----	0,52
Identificado					**88,5**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 2. Composição química do OE de folhas frescas de *C. sylvestris* da população FCF.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
δ-elemeno	32,261	1339	1338	93	0,30
ciclosativeno	33,536	1366	1371	94	0,66
α-copaeno	34,007	1376	1376	96	1,85
-----	34,167	1379	-----	-----	0,26
-----	34,413	1384	-----	-----	0,20
β-elemeno	34,728	1391	1390	97	3,69
-----	35,642	1412	-----	-----	0,46
E-cariofileno	35,924	1419	1419	95	3,21
β-copaeno	36,333	1430	1432	93	0,90
-----	36,568	1435	-----	-----	0,34
aromadendreno	36,755	1440	1440	96	1,80
E-*β*-farneseno	37,430	1457	1456	92	9,02
-----	37,567	1463	-----	-----	0,21
alloaromadendreno	37,675	1466	1460	91	0,67
-----	37,811	1469	-----	-----	0,21
-----	37,922	1477	-----	-----	1,53
-----	38,250	1484	-----	-----	1,10
curcumeno	38,545	1489	1480	95	4,10
β-selineno	38,744	1499	1490	95	2,44
α-selineno	39,114	1503	1498	93	4,67
E-*β*-guaieno	39,274	1503	1502	91	0,60
-----	39,587	1510	-----	----	0,19
γ-cadineno	39,860	1517	1513	91	0,47
-----	39,971	1520	-----	-----	0,89
-----	40,224	1526	-----	-----	0,22
-----	41,412	1556	-----	-----	0,67
E-nerolidol	41,777	1565	1563	92	1,77
palustrol	42,025	1571	1567	90	0,83
-----	42,159	1574	-----	-----	0,47
espatulenol	42,529	1583	1578	96	29,24
óxido de cariofileno	42,678	1587	1583	93	9,47
viridiflorol	43,014	1595	1592	92	2,90
-----	43,270	1602	-----	-----	1,75
-----	43,425	1606	-----	-----	0,48
epóxido de humuleno II	43,656	1613	1608	90	4,26
-----	44,242	1629	-----	-----	0,32
-----	44,410	1634	-----	-----	0,81
-----	44,745	1643	-----	-----	1,48
-----	45,336	1660	-----	-----	0,96
-----	47,450	1718	-----	-----	0,25
-----	47,717	1726	-----	-----	0,21
-----	48,399	1745	-----	-----	0,35
-----	48,799	1756	-----	-----	0,44
-----	58,198	2045	-----	-----	0,93
-----	63,039	2473	-----	-----	0,66
-----	63,177	2517	-----	-----	1,26
-----	63,916	2620	-----	-----	0,42
-----	78,050	2970	-----	-----	0,00
-----	78,092	2971	-----	-----	0,00
-----	78,550	2976	-----	-----	0,08
Identificado					**83,3**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 3. Composição química do OE de folhas secas de *C. sylvestris* da população FCF.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
α-copaeno	34,017	1376	1376	94	0,77
β-elemeno	34,734	1391	1390	95	3,35
E-cariofileno	35,927	1420	1419	95	0,60
β-copaeno	36,344	1430	1432	89	0,25
aromadendreno	36,764	1440	1441	95	1,06
α-humuleno	37,377	1456	1454	98	6,04
alloaromadendreno	37,688	1463	1460	89	0,37
γ-muuroleno	38,325	1479	1479	90	0,65
curcumeno	38,564	1485	1480	89	0,24
β-selineno	38,747	1490	1490	95	1,94
α-selineno	39,117	1499	1498	90	1,47
E-*β*-guaieno	39,291	1503	1502	89	0,64
γ-cadineno	39,869	1520	1513	89	0,46
-----	39,990	1527	-----	-----	0,83
-----	40,267	1544	-----	-----	0,13
-----	40,950	1556	-----	-----	0,54
E-nerolidol	41,421	1563	1563	89	1,31
maliol	41,727	1571	1567	93	1,56
palustrol	42,025	1577	1568	90	1,84
-----	42,273	1582	-----	-----	0,42
espatulenol	42,453	1582	1578	95	17,85
óxido de cariofileno	42,644	1586	1583	92	13,74
viridiflorol	43,000	1595	1592	94	5,28
-----	43,150	1599	-----	-----	0,61
-----	43,246	1601	-----	-----	1,93
-----	43,409	1606	-----	-----	1,29
epóxido de humuleno II	43,653	1613	1608	90	20,01
-----	43,985	1622	-----	-----	0,11
-----	44,403	1634	-----	-----	1,58
-----	44,856	1646	-----	-----	1,41
-----	45,012	1651	-----	-----	0,21
α-cadinol	45,353	1660	1654	88	2,86
-----	45,526	1665	-----	-----	0,22
-----	45,878	1675	-----	-----	0,14
-----	46,498	1692	-----	-----	0,11
-----	47,468	1719	-----	-----	0,24
-----	47,500	1720	-----	-----	0,24
-----	47,633	1724	-----	-----	0,23
-----	47,817	1729	-----	-----	0,84
-----	48,317	1743	-----	-----	0,72
-----	48,650	1752	-----	-----	0,26
-----	48,758	1755	-----	-----	0,77
-----	49,258	1769	-----	-----	0,37
-----	51,733	1842	-----	-----	0,12
-----	58,133	2242	-----	-----	0,90
-----	62,950	2405	-----	-----	0,72
-----	63,108	2495	-----	-----	1,55
-----	63,920	2752	-----	-----	0,79
-----	66,284	2721	-----	-----	0,32
-----	72,340	2714	-----	-----	0,11
Identificado					**81,6**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 4. Composição química dos componentes voláteis das folhas *in natura* de *C. sylvestris* da população FCF.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
δ-elemeno	29,783	1337	1338	95	0,71
α-cubebeno	30,360	1350	1348	92	0,34
α-copaeno	31,536	1376	1376	96	1,51
β-cubebeno	32,198	1390	1388	92	0,31
β-elemeno	32,297	1393	1390	96	0,96
E-cariofileno	33,470	1420	1419	96	7,85
β-copaeno	33,877	1430	1432	93	1,02
aromadendreno	34,286	1439	1441	95	0,38
α-humuleno	35,008	1457	1453	96	22,24
alloaromadendreno	35,235	1462	1460	91	0,75
-----	35,333	1464	-----	-----	0,20
germacreno D	36,226	1486	1485	97	30,94
-----	36,550	1493	-----	-----	0,29
biciclogermacreno	36,785	1499	1500	93	7,05
α-muuroleno	36,925	1502	1500	93	0,35
-----	37,192	1509	-----	-----	0,67
γ-cadineno	37,463	1516	1513	95	0,70
δ-cadineno	37,855	1526	1523	94	1,92
-----	38,209	1535	-----	-----	0,66
espatulenol	40,074	1582	1578	94	5,49
-----	40,636	1597	-----	-----	0,64
-----	41,234	1613	-----	-----	0,86
-----	41,375	1616	-----	-----	0,36
-----	41,902	1631	-----	-----	0,59
-----	42,137	1637	-----	-----	1,18
-----	42,306	1642	-----	-----	1,17
-----	42,686	1652	-----	-----	0,44
-----	42,812	1655	-----	-----	0,42
-----	42,939	1659	-----	-----	1,28
-----	43,927	1685	-----	-----	0,52
-----	44,210	1693	-----	-----	8,20
Identificado					**82,5**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 5. Composição química do OE de folhas frescas de *C. sylvestris* da população EEA.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
-----	31,835	1329	-----	-----	0,26
δ-elemeno	32,315	1340	1338	94	5,43
α-copaeno	34,031	1376	1376	96	0,13
-----	34,440	1385	-----	-----	0,14
β-elemeno	34,762	1392	1390	97	2,00
α-gurjuneno	35,570	1411	1409	96	0,48
E-cariofileno	35,952	1420	1419	94	3,04
-----	36,196	1426	-----	-----	0,15
β-copaeno	36,368	1430	1432	95	0,82
γ-elemeno	36,574	1436	1436	95	6,02
aromadendreno	36,784	1441	1441	95	0,25
-----	37,010	1446	-----	-----	0,39
α-humuleno	37,461	1458	1454	97	8,14
alloaromadendreno	37,717	1464	1460	93	0,37
-----	37,801	1466	-----	-----	0,17
-----	38,250	1477	-----	-----	0,14
germacreno D	38,699	1488	1485	97	22,32
β-selineno	38,831	1492	1490	94	0,12
γ-selineno	39,009	1496	1492	93	0,83
biciclogermacreno	39,312	1504	1500	96	14,19
-----	39,607	1511	-----	-----	0,50
γ-cadineno	39,896	1518	1513	96	0,50
-----	39,995	1520	-----	-----	0,41
δ-cadineno	40,270	1527	1523	96	2,89
-----	40,616	1536	-----	-----	0,18
-----	40,829	1541	-----	-----	0,34
elemol	41,326	1554	1549	96	0,62
-----	41,475	1557	-----	-----	0,09
germacreno B	41,641	1561	1561	97	3,14
E-nerolidol	41,807	1565	1563	95	1,89
palustrol	42,047	1571	1568	90	0,53
-----	42,355	1579	-----	-----	0,41
espatulenol	42,480	1582	1578	95	1,08
globulol	42,731	1588	1590	93	1,79
viridiflorol	43,040	1596	1592	94	2,24
-----	43,219	1601	-----	-----	0,24
rosifoliol	43,421	1606	1600	94	3,31
-----	43,751	1615	-----	-----	0,39
-----	43,857	1618	-----	-----	0,17
-----	44,090	1625	-----	-----	1,59
-----	44,283	1630	-----	-----	0,42
-----	44,355	1632	-----	-----	0,49
γ-eudesmol	44,513	1637	1632	94	1,12
α-muurolol	44,905	1648	1646	94	2,81
cubenol	45,074	1652	1646	93	0,77
α-cadinol	45,401	1661	1654	89	5,89
-----	45,827	1673	-----	-----	0,24
-----	46,895	1703	-----	-----	0,13
-----	47,593	1722	-----	-----	0,28
-----	62,074	2175	-----	-----	0,15
Identificado					**92,7**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.

Tabela 6. Composição química do OE de folhas secas de *C. sylvestris* da população EEA.

Componentes	t_R (min)	[1]IR (calculado)	[2]IR (literatura)	[3]Similaridade EM (%)	Teor (%)
α-copaeno	34,022	1376	1376	95	0,27
β-elemeno	34,738	1391	1390	95	0,91
α-gurjuneno	35,557	1410	1409	91	0,25
E-cariofileno	35,928	1420	1419	91	0,25
aromadendreno	36,768	1440	1439	94	0,45
α-humuleno	37,381	1456	1454	96	1,69
-----	37,583	1461	-----	-----	0,30
-----	37,688	1463	-----	-----	0,46
E-cadina-1(6),4-dieno	38,332	1479	1476	95	1,11
epi-cubebol	39,124	1499	1494	89	1,63
α-muuroleno	39,311	1504	1500	94	0,94
γ-cadineno	39,871	1517	1513	96	1,07
-----	39,977	1527	-----	-----	1,95
-----	40,238	1544	-----	-----	0,26
-----	40,926	1553	-----	-----	1,05
elemol	41,313	1556	1459	89	0,26
-----	41,433	1565	-----	-----	0,55
E-nerolidol	41,785	1571	1563	92	1,27
globulol	42,024	1583	1590	91	1,30
espatulenol	42,503	1588	1578	96	21,60
óxido de cariofileno	42,707	1588	1583	90	10,87
viridiflorol	43,019	1596	1592	93	5,05
-----	43,256	1602	-----	-----	0,50
rosifoliol	43,432	1607	1600	89	2,01
epóxido de humuleno II	43,681	1613	1608	90	12,97
-----	43,875	1619	-----	-----	0,49
-----	44,007	1623	-----	-----	0,89
-----	44,408	1634	-----	-----	2,32
γ-eudesmol	44,500	1636	1632	89	0,36
α-muurolol	44,879	1647	1646	91	4,15
cubenol	45,038	1651	1646	92	1,13
-----	45,209	1656	-----	-----	0,70
α-cadinol	45,360	1660	1654	93	9,87
-----	45,533	1665	-----	-----	0,43
-----	45,875	1675	-----	-----	0,27
-----	46,753	1699	-----	-----	0,31
-----	47,448	1718	-----	-----	0,44
-----	47,578	1722	-----	-----	0,93
-----	47,722	1726	-----	-----	0,45
-----	47,936	1732	-----	-----	1,34
-----	48,400	1745	-----	-----	1,67
-----	48,583	1750	-----	-----	0,33
-----	48,718	1754	-----	-----	0,81
-----	48,888	1759	-----	-----	0,45
-----	49,343	1771	-----	-----	0,93
-----	49,986	1789	-----	-----	0,28
-----	51,812	1844	-----	-----	0,72
-----	53,041	1882	-----	-----	0,28
-----	54,701	1933	-----	-----	1,07
-----	54,993	1942	-----	-----	0,41
Identificado					**79,4**

[1]Índice de retenção calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963).
[2]Índice de retenção obtido de Adams (2007).
[3]Similaridade entre os espectros de massas do metabólito e da base de dados Wiley 7,0.