



DENSIDADE DE TRICOMAS GLANDULARES,
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia* DC.)

PAULO HENRIQUE FURLAN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do campus de Botucatu e Instituto de Biociências do campus de Rio Claro.

BOTUCATU, SP

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DENSIDADE DE TRICOMAS GLANDULARES,
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia* DC.)

PAULO HENRIQUE FURLAN

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do campus de Botucatu e Instituto de Biociências do campus de Rio Claro.

BOTUCATU, SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Furlan, Paulo Henrique.

Densidade de tricomas glandulares, composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.) / Paulo Henrique Furlan. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques

Capes: 20306008

1. Plantas - Composição. 2. Cromatografia a gás.
3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Estações do ano. 5. Óleos essenciais.

Palavras-chave: Composição química; Cromatografia gasosa bidimensional abrangente; Microscopia eletrônica de varredura; Sazonalidade; Substâncias voláteis.

Dedicatória:

“Dedico este trabalho aos meus amados pais, Valdenir Furlan e Cleonice Palmira Queiroz Furlan, que me apoiaram em todas as decisões da minha vida e sempre estiveram ao meu lado.

A minha família, que sempre me incentivou a buscar pelos meus sonhos.

A minha namorada e companheira Ketillen, que me deu amor, apoio e compreensão durante todo o processo e me incentivou a ser a melhor versão de mim.

Aos meus amigos Joao, Eduardo, Luís, Marcos, Danielle, Caffer, Yane, Rodolfo, Jaque e tantos outros que não consegui lembrar devido à ansiedade que foi escrever essa dissertação, dedico esta conquista, pois sem o companheirismo, a amizade e o apoio de vocês, essa jornada teria sido muito mais difícil. Obrigado por todo o incentivo e por me mostrar o quão importante é o meu trabalho.”

Agradecimentos:

“Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro direcionado a minha pesquisa, por meio do processo 130402/2021-4.

Agradeço também à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Instituto de Biociências de Botucatu e pelo suporte financeiro e institucional que possibilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Marcia Ortiz Mayo Marques, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), por todo o seu apoio e orientação ao longo desta jornada e por me permitir usar o seu laboratório em Campinas-SP. Sem sua orientação, conhecimento e conselhos, minha dissertação não seria possível.

Agradeço ao professor Eduardo Micotti da Gloria, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), e à professora Aline Redondo Martins, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), por cederem seus laboratórios para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

Gostaria de agradecer também à Dr^a. Roselaine, que me auxiliou em diversos momentos da pesquisa com ajudas e sugestões que foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

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

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório pelo suporte, incentivo e troca de conhecimentos, sem os quais essa pesquisa não seria possível.

Aos professores do curso de Pós-graduação que me deram aulas.

Aos funcionários da sessão de pós-graduação, que sempre foram extremamente solícitos.

Todos vocês foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui, e sou profundamente grato por todo o suporte, incentivo e amor que recebi ao longo desta jornada. Muito obrigado!"

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	7
3. CAPÍTULO I - “Avaliação da influência das estações (seca e chuvosa) na composição química dos óleos essenciais de <i>Baccharis dracunculifolia</i> ”	10
3.1. RESUMO	11
3.2. ABSTRACT	12
3.3. INTRODUÇÃO	13
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.4.1. Coleta do material vegetal	14
3.4.2. Dados climatológicos	15
3.4.3. Extração dos óleos essenciais	15
3.4.4. Rendimento em óleos essenciais	16
3.4.5. Composição química do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	16
3.4.6. Composição química do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CG×CG-EM).....	17
3.4.7. Análises estatísticas	18
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.5.1. Dados climatológicos	18
3.5.2. Rendimento em óleo essencial.....	19
3.5.3. Composição química dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	21
3.5.4. Composição química dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CG×CG-EM)	36
3.6. CONCLUSÃO	44
3.7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	44
4. CAPÍTULO II - Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>Baccharis dracunculifolia</i> contra <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium verticillioides</i>	46
4.1. RESUMO	47
4.2. ABSTRACT	48
4.3. INTRODUÇÃO	49

4.4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.4.1. Coleta do material vegetal e extração dos óleos essenciais	50
4.4.2. Composição química do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	51
4.4.3. Avaliação preliminar da atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> a concentração de 2 mL/L contra <i>A. nomius</i> ; <i>F. graminearum</i> e <i>F. verticillioides</i>	52
4.4.4. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> em diferentes concentrações (2; 4; 6; 8 mL/L) contra <i>A. nomius</i> ; <i>F. graminearum</i> e <i>F. verticillioides</i>	54
4.4.5. Análises estatísticas	55
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.5.1. Avaliação preliminar da atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> a concentração de 2 mL/L contra <i>A. nomius</i> ; <i>F. graminearum</i> e <i>F. verticillioides</i>	56
4.5.2. Composição química dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i>	62
4.5.3. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> em diferentes concentrações (2; 4; 6; 8 mL/L) contra <i>A. nomius</i> ; <i>F. graminearum</i> e <i>F. verticillioides</i>	64
4.6. CONCLUSÃO	70
4.7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	70
5. CAPÍTULO III – Avaliação da influência das estações (seca e chuvosa) na densidade de tricomas glandulares em folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Asteraceae)	74
5.1. RESUMO	75
5.2. ABSTRACT	76
5.3. INTRODUÇÃO	77
5.4. MATERIAL E MÉTODOS	78
5.4.1. Coleta do material vegetal	78
5.4.2. Densidade de tricomas glandulares de <i>B. dracunculifolia</i>	79
5.4.3. Análises estatísticas	80
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.5.1. Densidade de tricomas glandulares	80
5.6. CONCLUSÃO	85
5.7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	85
6. CONCLUSÃO GERAL	87

RESUMO GERAL

Os óleos essenciais de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.) apresentam potencial bactericida, anti-inflamatório e antifúngico. Fatores abióticos podem afetar, quantitativamente e qualitativamente, a produção dos óleos essenciais, bem como as estruturas que os secretam. O estudo teve como objetivos avaliar a influência da estação seca e chuvosa no rendimento e na composição química dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, bem como na densidade de tricomas glandulares das folhas e a atividade dos óleos essenciais contra fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*. Para isso, foram realizadas coletas das partes aéreas de 15 indivíduos de uma população de *B. dracunculifolia* nos meses de setembro de 2021 e março de 2022, respectivamente. Os óleos essenciais das folhas foram extraídos por hidrodestilação em aparato Clevenger e a análise da composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e a cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CG×CG-EM). A densidade dos tricomas glandulares das folhas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Os óleos essenciais foram testados contra fungos *Aspergillus nomius*; *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*, através de diluição em diferentes concentrações em meio de cultura BDA contendo emulsificante, para a determinação das porcentagens de inibição. O rendimento dos óleos essenciais foi maior na estação chuvosa (0,70%) quando comparado com a estação seca (0,53%). Os principais constituintes nos óleos essenciais foram *trans*-nerolidol, β -pineno, limoneno e espatulenol, com porcentagens que variaram de indivíduo para indivíduo e de acordo com a estação coletada dando indícios de variabilidade química intraespecífica e de influências sazonais na composição. Análises estatísticas multivariadas indicaram variação na composição química dos óleos essenciais entre os indivíduos de uma mesma população de *B. dracunculifolia*, tanto entre as estações de coleta, quanto na mesma coleta. Não foram observadas variações significativas na contagem de tricomas glandulares entre as estações seca e chuvosa, porém foram detectadas diferenças entre as superfícies abaxiais e adaxiais dos indivíduos. Foi observado que os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* apresentaram potenciais inibitórios contra os fitopatógenos. Alguns indivíduos de *B. dracunculifolia* apresentaram maior potencial antifúngico, destacando-se 1BD02 (25,30% contra *A. nomius* e 24,42% contra *F. verticillioides*), 1BD05 (19,67% contra *F. verticillioides*), 1BD06 (40,24% contra *F. graminearum*), 2BD06 (28,40% contra *F. graminearum*) e 2BD13 (contra *F. verticillioides*), 72 horas após a inoculação dos esporos.

Palavras chave: sazonalidade; substâncias voláteis; composição química; cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG×CG-EM); microscopia eletrônica de varredura (MEV); antifúngicos naturais

GENERAL ABSTRACT

The essential oils of *Baccharis dracunculifolia* DC., commonly known as "alecrim-do-campo," exhibit bactericidal, anti-inflammatory, and antifungal potential. Abiotic factors can quantitatively and qualitatively affect the production of essential oils, as well as the structures that secrete them. The objectives of this study were to evaluate the influence of the dry and rainy seasons on the yield and chemical composition of *B. dracunculifolia* essential oils, as well as on the density of glandular trichomes on the leaves and the activity of the essential oils against fungi of the *Aspergillus* and *Fusarium* genera. To accomplish this, aerial parts were collected from 15 individuals of a *B. dracunculifolia* population in September 2021 and March 2022, respectively. The essential oils from the leaves were extracted by hydrodistillation using a Clevenger apparatus, and the chemical composition was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC×GC-MS). The density of glandular trichomes on the leaves was evaluated using scanning electron microscopy. The essential oils were tested against fungi of the *Aspergillus* and *Fusarium* genera by diluting them at different concentrations in potato dextrose agar medium containing an emulsifier to determine the inhibition percentages. The yield of essential oils was higher during the rainy season (0.70%) compared to the dry season (0.53%). The main detected constituents were trans-nerolidol, β -pinene, limonene, and spathulenol, with percentages varying among individuals and according to the season of collection, indicating intra-specific chemical variability and seasonal influences on composition. Multivariate statistical analyses indicated variation in the chemical composition of essential oils among individuals within the same *B. dracunculifolia* population, both between collection seasons and within the same collection. No significant variations in the count of glandular trichomes were observed between the dry and rainy seasons, but differences were detected between the abaxial and adaxial surfaces of the individuals. It was observed that the essential oils of *B. dracunculifolia* exhibited inhibitory potential against phytopathogens. Some individuals of *B. dracunculifolia* showed higher antifungal potential, notably 1BD02 (25.30% against *A. nomius* and 24.42% against *F. verticillioides*), 1BD05 (19.67% against *F. verticillioides*), 1BD06 (40.24% against *F. graminearum*), 2BD06 (28.40% against *F. graminearum*), and 2BD13 (against *F. verticillioides*), 72 hours after spore inoculation.

Keywords: seasonality; volatile substances; chemical composition; comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC-MS); scanning electron microscopy (SEM); natural antifungals.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é reconhecido como um dos países com maior biodiversidade do mundo, graças à sua ampla variedade de biomas e ecossistemas. A flora brasileira apresenta a maior diversidade genética vegetal do planeta, o que confere ao país um enorme potencial para o desenvolvimento socioeconômico através da produção de corantes, óleos vegetais, gorduras, fitoterápicos e compostos com propriedades terapêuticas, como os óleos essenciais, que possuem atividades antioxidantes e antimicrobianas. Esses recursos naturais são de grande importância para a economia e para a saúde humana, destacando a relevância da preservação e da utilização sustentável da biodiversidade brasileira.

O clima da região do Cerrado é composto por longos períodos de seca, que vão de abril a setembro, seguido de longos períodos de chuva, que vão de outubro até março. O Cerrado é uma das regiões mais biodiversas do Brasil, com grande variedade de espécies de fauna e flora, o que o torna um importante patrimônio natural do país. Entretanto, a importância desse bioma ainda é pouco conhecida pela sociedade e sua preservação enfrenta desafios, como a expansão agropecuária e a falta de políticas públicas efetivas de conservação (KLINK e MACHADO, 2005). Apesar disso, é fundamental reconhecer e valorizar a biodiversidade do Cerrado, não apenas pela sua relevância científica e ecológica, mas também pelos benefícios econômicos que podem ser gerados a partir dela, como a produção de alimentos, medicamentos e outros produtos.

A família das Asteraceae representa cerca de 8 a 10% de toda a flora global, abrigando aproximadamente 22.750 espécies em 1.620 gêneros, possuindo diversas espécies de interesse econômico, suprimindo interesses farmacêuticos, agrícolas, industriais e ornamentais (DEL VITTO & PETENATTI, 2009; DEL VITTO & PETENATTI, 2015). Somente no Brasil, ocorrem mais de 2.000 espécies desta família distribuídos em mais de 270 gêneros distribuídos por todo o território nacional (ROQUE et al., 2017).

Baccharis é um dos maiores gêneros desta família, compreendendo cerca de 500 espécies, cuja maioria se encontra na América Latina. Em geral, as espécies deste gênero apresentam, formas arbustivas, que variam de 0.5 a 4 m de altura, sendo que no Brasil podemos citar como exemplo a “carqueja” (*B. trimera*) e o “alecrim-do-campo” (*B. dracunculifolia*), que são espécies muito utilizadas na medicina popular. Este gênero possui aspectos econômicos importantes para as indústrias farmacêuticas, de perfumaria e de cosméticos (VERDI et al., 2005).

Baccharis dracunculifolia DC. é uma espécie nativa do Brasil, conhecida popularmente como “alecrim-do-campo” ou “vassourinha”, muito utilizada na medicina popular para combater distúrbios gastrointestinais, febre e fadiga (BUDEL et al., 2004). Esta espécie se localiza em biomas como o Pampa, Cerrado e Mata Atlântica (HEIDEN; SCHNEIDER, 2015), com altura variando entre 2 e 3 m (GOMES & FERNANDES, 2002), as folhas são simples e alternas, medindo cerca de 30 mm de comprimento, possuem uma grande quantidade de tricomas pluricelulares glandulares na epiderme, responsáveis pela secreção de resinas e óleos essenciais de composição química variada (OLIVEIRA & BASTOS, 1999).

B. dracunculifolia é a principal fonte de própolis verde produzido por *Apis mellífera* na região sudeste do Brasil. Estudos realizados por Bankova et al., (1999), indicaram que essas abelhas têm preferência por essa espécie de planta na produção deste produto, que é muito utilizado para a proteção contra fungos e bactérias na colmeia, além de ser muito utilizado como um medicamento natural pelo ser humano, devido as suas ações antivirais, antitumorais, antibióticas, entre outras (PARK et al., 2004).

Estudos com os extratos e óleos essenciais de *B. dracunculifolia* demonstraram propriedades antiparasitárias (PARREIRA et al., 2010), antibacterianas (BONIN et al., 2020), antioxidantes (TOMAZZOLI et al., 2021), antimicrobianas (VEIGA et al., 2017), antivirais (BUFALO et al., 2009), antiulcerogênicas (MASSIGNANI et al., 2009), anti-inflamatórias (BRADENBURG et al., 2020) e antifúngicas (SILVA FILHO et al., 2008).

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CAZELLA et al., 2019; SALAZAR et al., 2018). Além disso, o óleo essencial demonstrou potencial no combate de parasitas, incluindo *Leishmania donovani* e *Schistosoma mansoni*, responsáveis por causar doenças como a leishmaniose e a esquistossomose, respectivamente (PARREIRA et al., 2010). O óleo essencial também se mostrou eficaz contra as larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus*, um dos principais vetores da filariose, e as pré-pupas da mosca-da-bicheira *Cochliomyia hominivorax*, uma das principais causadoras de miiases (ALVES et al., 2018; SEUGLING, 2019).

Estudos constataram a atividade antifúngica do óleo essencial de *B. dracunculifolia* contra fungos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C.*

parapsilosis e *C. tropicalis*) isolados das cavidades orais de crianças em período de amamentação (PEREIRA et al., 2011). Testes realizados em fungos da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, principal causador da antracnose em frutos de interesse comercial, demonstraram bom efeito inibitório do óleo essencial de *B. dracunculifolia* nesta espécie (BONETT, 2012), assim como, para os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia minor*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, (FONSECA et al., 2015). A crescente resistência das cepas tem demandado a busca de novos medicamentos e defensivos agrícolas com ação antifúngica, constituindo uma oportunidade para o potencial uso dos óleos essenciais como alternativa.

Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* são conhecidos por causar danos significativos à indústria agropecuária, afetando o plantio, colheita e armazenamento de grãos e cereais, bem como por produzir micotoxinas prejudiciais à saúde humana e animal. O fungo *Aspergillus nomius* é capaz de produzir a aflatoxina, uma micotoxina extremamente prejudicial capaz de causar problemas como hepatite, cirrose e câncer, enquanto *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum* são produtores de fumonisinas e deoxinivalenol, respectivamente, que podem contaminar grãos e cereais, como milho, trigo e arroz e causar doenças hepáticas, câncer, problemas imunológicos e reprodutivos e até mesmo a morte em humanos, em casos extremos (CASTRO et al., 2014; DEEPA & SREENIVASA, 2017; PRESTES et al., 2019). A utilização de óleos essenciais como uma alternativa para o controle desses fungos é promissora.

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* é rico em sesquiterpenos, incluindo o *trans*-nerolidol, o germacreno D, o biciclogermacreno, o *trans*-cariofileno e o espatulenol, que foram encontrados como constituintes majoritários em um estudo realizado por Massignani et al. (2009) com partes aéreas da planta coletadas em Franca (SP). Populações naturais de *B. dracunculifolia*, coletadas em Campos do Jordão, Ubatuba e Campinas, apresentaram como composto majoritário o *trans*-nerolidol, com percentuais relativos variando de 21,6% a 40,8% (BELINI, 2015). Sesquiterpenos, como o β -cariofileno, o β -selineno, o globulol, o viridiflorol e o α -cadinol, também já foram relatados em grandes abundâncias em óleo essencial de *B. dracunculifolia* (FERRACINI et al., 1995; AGOSTINI et al., 2005). Frizzo et al. (2008) compararam o óleo essencial de amostras de *B. dracunculifolia* coletadas no Brasil, Bolívia e Uruguai e verificaram diferenças significativas na sua composição química, destacando que as amostras

coletadas no Brasil apresentaram grande quantidade de *trans*-nerolidol, enquanto na Bolívia ou Uruguai a concentração desta substância foi considerada baixa ou inexistente. Rigotti (2011) também constatou diversidade genética e química em diferentes populações de *B. dracunculifolia* no território brasileiro, o mesmo foi observado por Belini (2015).

Além dos fatores genéticos e epigenéticos, fatores abióticos, como altitude, ritmo circadiano, propriedades físicas do solo, incidência luminosa, disponibilidade hídrica, temperatura e sazonalidade podem interferir na concentração e composição de metabólitos especializados nas plantas (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; SELMAR & KLEINWÄCHTER, 2013). Dentre estes metabólitos, estão os óleos essenciais, como observado por Ferracini et al. (1995), que revelaram que o rendimento de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* é maior durante o período chuvoso, e que a proporção relativa entre os monoterpenos e sesquiterpenos varia de acordo com os diferentes períodos do ano. Isso também foi demonstrado por Oliveira et al. (2017), que avaliaram a influência de diferentes temperaturas e disponibilidades hídricas na produção de óleo essencial de *Mentha piperita*, constatando um aumento na concentração de mentol em temperaturas mais baixas e um maior rendimento, dependendo da disponibilidade hídrica.

Os tricomas glandulares, estruturas especializadas presentes nas folhas, flores e frutos de muitas plantas, são responsáveis pela síntese e armazenamento de óleos essenciais e outros metabólitos especializados (GONÇALVES et al., 2007). A densidade e distribuição de tricomas glandulares também podem ser afetadas por vários fatores, como a temperatura, a luminosidade, a umidade do solo e do ar, bem como a presença de herbívoros e patógenos (DUDAREVA et al., 2013; MARTINEZ-NATARÉN et al., 2011; TOZIN, et al., 2015).

Embora existam relatos abordando a composição química dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, estudos sobre a influência da sazonalidade no rendimento e composição química dos óleos essenciais desta espécie, em especial na estação seca e chuvosa, são escassos. Até o momento, não foram identificados estudos sobre a ação antifúngica de óleos essenciais de indivíduos de uma população *B. dracunculifolia* contra *Aspergillus nomius*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*, a fim de constatar se existem diferenças nas atividades antifúngicas dependem dos indivíduos avaliados. Estudos sobre a influência da sazonalidade na densidade dos tricomas glandulares em folhas da espécie também são inexistentes.

Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a densidade dos tricomas glandulares das folhas, composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia*. Como objetivos específicos foram avaliadas: 1) a densidade dos tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia* em função das épocas de coleta (estação seca e chuvosa), 2) influência das estações seca e chuvosa no rendimento e composição química dos óleos essenciais e 3) a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente a *Aspergillus nomius*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

Agostini, F.; Santos, A C. A.; Rossato, M.; Pansera, M. R.; Zattera, F.; Wasum, R.; Serafini, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil, 2005. Revista Brasileira de Farmacognosia, 15 (3), pp. 215-220.

Belini, C. M. B. (2015). *Baccharis dracunculifolia* DC.(Asteraceae): Composição do óleo essencial, diversidade e parâmetros genéticos.

Bonin, E., Carvalho, V.M., Avila, V.D., dos Santos, N.C.A., Benassi-Zanqueta, É., Lancheros, C.A.C., Previdelli, I.T.S., Ueda-Nakamura, T., de Abreu Filho, B.A. and do Prado, I.N., 2020. *Baccharis dracunculifolia*: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. LWT, 120, p.108920.

Brandenburg, M.M., Rocha, F.G., Pawloski, P.L., da Silva Soley, B., Rockenbach, A., Scharf, D.R., Heiden, G., Ascari, J., Cabrini, D.A. and Otuki, M.F., 2020. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil displays anti-inflammatory activity in models of skin inflammation. Journal of ethnopharmacology, 259, p.112840.

Bankova, Vassya et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. Zeitschrift für Naturforschung C, v. 54, n. 5-6, p. 401-405, 1999.

Budel, J.M., Duarte, M.D.R., Santos, C.D.M. and Farago, P.V., 2004. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. Acta Farm. Bonaerense, 23(4), pp.477-483.

Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., De Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K. and Sforcin, J.M., 2009. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. Journal of applied microbiology, 107(5), pp.1669-1680.

Deepa, N.; Sreenivasa, M. Y. *Fusarium verticillioides*, a globally important pathogen of agriculture and livestock: a review. Journal of Veterinary Medicine and Research, v. 4, n. 4, 2017.

- Del Vitto, L.A. and Petenatti, E.M., 2009. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. Multequina, (18), pp.87-115.
- Del Vitto, L.A. and Petenatti, E.M., 2015. Asteráceas de importancia económica y ambiental Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. Multequina, (24), pp.47-74.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. New Phytologist, 198(1), 16-32.
- Esper, Renata H. et al. Potential of essential oils for protection of grains contaminated by aflatoxin produced by *Aspergillus flavus*. Frontiers in microbiology, v. 5, p. 269, 2014.
- Ferracini, V., L. Óleos Essenciais de *Baccharis* e sua interação com insetos polinizadores. 1995, 205f. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Gobbo-Neto, L. and Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química nova, 30(2), pp.374-381
- Gomes, V. and Fernandes, G.W., 2002. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). Acta Botanica Brasilica, 16(4), pp.421-427.
- Gonçalves, E.G.; Lorenzi, H., 2007. Morfologia Vegetal: Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 446p.
- Goswami, Rubella S.; KISTLER, H. Corby. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular plant pathology, v. 5, n. 6, p. 515-525, 2004.
- Heiden, G.; Schneider, A. *Baccharis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: Acesso em: 20 jun. 2021.
- Klink, Carlos A.; Machado, Ricardo B. A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.
- Martínez-Natarén, Daniela A. et al. Morphology and density of glandular trichomes in populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK, *Verbenaceae*), and the relationship between trichome density and climate¹. The Journal of the Torrey Botanical Society, v. 138, n. 2, p. 134-144, 2011.
- Massignani, J.J., Lemos, M., Maistro, E.L., Schaphauser, H.P., Jorge, R.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K. and de Andrade, S.F., 2009. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 23(10), pp.1355-1360
- Oliveira, R. A. D., Nogueira, P. C. L., & Marques, M. O. M. (2017). Effects of temperature and water availability on the essential oil production of *Mentha piperita* L. Journal of Essential Oil Research, 29(4), 305-311

- Parreira, N.A., Magalhães, L.G., Moraes, D.R., Caixeta, S.C., de Sousa, J.P., Bastos, J.K., Cunha, W.R., Silva, M.L., Nanayakkara, N.P.D., Rodrigues, V. and da Silva Filho, A.A., 2010. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(4), pp.993-1001.
- Prestes, Isabele D. et al. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. *Scientia Agropecuaria*, v. 10, n. 4, p. 559-570, 2019.
- Rigotti, M. (2011). *Baccharis dracunculifolia* DC: diversidade genética e química de populações.
- Roque, N.; Teles, A.M.; Nakajima, J.N., 2017. A família *Asteraceae* no Brasil: classificação e diversidade [online]. Salvador: EDUFBA, 2017, 260 p. ISBN: 978-85-232-1999-4.
- Selmar, D.; Kleinwächter, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, v. 42, n. 1, p. 558–566, 2013.
- Silva Filho, A.A., de Sousa, J.P., Soares, S., Furtado, N.A., e Silva, M.L.A., Cunha, W.R., Gregório, L.E., Nanayakkara, N.D. and Bastos, J.K., 2008. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(1-2), pp.40-46.
- Tomazzoli, M.M., Amaral, W.D., Cipriano, R.R., Tomasi, J.D.C., Gomes, E.N., Ferriani, A.P., Maia, B.H. and Deschamps, C., 2021. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Populations of *Baccharis dracunculifolia* DC. in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64.
- Tozin, L. R. S.; Marques, M.O. M; Rodrigues, T. M., 2015. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth (*Verbenaceae*) in the Brazilian Cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (Online), 87, pp. 943-953.
- Veiga, R.S., De Mendonça, S., Mendes, P.B., Paulino, N., Mimica, M.J., Lagareiro Netto, A.A., Lira, I.S., López, B.C., Negrão, V. and Marcucci, M.C., 2017. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), pp.911-920.
- Verdi, L.G., Brighente, I.M.C. and Pizzolatti, M.G., 2005. Gênero *Baccharis* (*Asteraceae*): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química nova*, 28(1), pp.85-94.
- Oliveira, C. and Bastos, E.M., 1998. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (*Asteraceae*) visando a identificação da origem botânica da própolis. *Acta bot. bras.*, 12(3), pp.431-439.

3. CAPITULO I

“Avaliação da influência das estações (seca e chuvosa) na composição química dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia*”

3.1. RESUMO

Baccharis dracunculifolia é uma planta nativa muito utilizada pela medicina popular que se localiza em biomas como o Cerrado, Mata Atlântica e Pampa. Esta planta possui tricomas glandulares nas superfícies de suas folhas, que são capazes de sintetizar óleos essenciais com propriedades farmacêuticas. Fatores genéticos, epigenéticos e abióticos, como sazonalidade, podem afetar o rendimento e o perfil químico de óleos essenciais. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a composição química dos óleos essenciais de uma população nativa em períodos de chuva e de seca. Para tal, duas coletas de partes aéreas de 15 indivíduos de uma população de *B. dracunculifolia* foram realizadas nos meses de setembro de 2021 e em março de 2022, estação seca e chuvosa, respectivamente, no município de Águas de Santa Barbara – SP. Em seguida, foram realizadas as extrações dos óleos essenciais das folhas por meio de hidrodestilação em aparato Clevenger e realizadas análises por meio de cromatografia gasosa unidimensional (CG-EM) e bidimensional abrangente acopladas a espectrometria de massas (CG×CG-EM). O rendimento da coleta na estação chuvosa foi significativamente maior do que o da na estação seca, sendo 0,70% e 0,53%, respectivamente. Para CG-EM todos os óleos essenciais apresentaram sesquiterpenos oxigenados como a principal classe de substâncias (variando entre 40,83 e 69,36%), com exceção dos indivíduos 1BD IAC 11 e 2BD IAC 12, que apresentaram os hidrocarbonetos monoterpênicos como principal classe. As substâncias mais abundantes encontradas nos óleos essenciais para os dois períodos de coleta foram *trans*-nerolidol (11,43 a 46,64%); espatulenol (5,46 a 18,67%); limoneno (2,02 a 17,72%), β -pineno (3,09 a 30,66%), biciclogermacreno (2,32 a 9,37%), germacreno D (0,42 a 7,50%), α -pineno (0,42 a 5,86%), *trans*-cariofileno (0,87 a 7,50%), δ -cadineno (1,89 a 5,27%) e α -cadinol (1,43 a 5,01%). Análises estatísticas multivariadas demonstraram que existe diversidade química intraespecífica nos óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* e que a sazonalidade interferiu – qualitativamente e quantitativamente – no perfil químico destes óleos essenciais, separando-os em grupos bem definidos (estação seca e chuvosa), indicando a importância de considerar este fator na produção dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*.

Palavras chave: Cromatografia gasosa bidimensional abrangente; diversidade química; fatores abióticos; alecrim-do-campo, constituintes voláteis

3.2. ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia is a native plant widely used in traditional medicine, found in biomes such as the Cerrado, Atlantic Forest, and Pampa. This plant possesses glandular trichomes on the surfaces of its leaves, which are capable of synthesizing essential oils with pharmaceutical properties. Genetic, epigenetic, and abiotic factors, such as seasonality, can affect the yield and chemical profile of essential oils. The present study aimed to evaluate the chemical composition of essential oils from a native population during rainy and dry periods. For this purpose, two collections of aerial parts were carried out on 15 individuals of a *B. dracunculifolia* population in September 2021 and March 2022, corresponding to the dry and rainy seasons, respectively, in Águas de Santa Barbara – SP municipality. Subsequently, the essential oils were extracted from the leaves using hydrodistillation with a Clevenger apparatus, and the analysis was performed using one-dimensional gas chromatography (GC-MS) and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCxGC-MS). The yield of the rainy season collection was significantly higher than that of the dry season, with values of 0.70% and 0.53%, respectively. Regarding GC-MS analysis, all essential oils exhibited oxygenated sesquiterpenes as the main class of substances (ranging from 40.83% to 69.36%), except for individuals 1BD IAC 11 and 2BD IAC 12, which presented monoterpene hydrocarbons as the main class. The most abundant substances found in the essential oils for both collection periods were trans-nerolidol (11.43% to 46.64%), spathulenol (5.46% to 18.67%), limonene (2.02% to 17.72%), β -pinene (3.09% to 30.66%), bicyclogermacrene (2.32% to 9.37%), germacrene D (0.42% to 7.50%), α -pinene (0.42% to 5.86%), trans-caryophyllene (0.87% to 7.50%), δ -cadinene (1.89% to 5.27%), and α -cadinol (1.43% to 5.01%). Multivariate statistical analyses demonstrated the existence of intra-specific chemical diversity in the essential oils of *B. dracunculifolia* individuals and the influence of seasonality, both qualitatively and quantitatively, on the chemical profile of these essential oils, separating them into well-defined groups (dry and rainy seasons), indicating the importance of considering this factor in the production of *B. dracunculifolia* essential oils.

Keywords: Comprehensive two-dimensional gas chromatography; chemical diversity; abiotic factors; alecrim-do-campo; volatile constituents.

3.3. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são compostos por substâncias voláteis, sintetizadas pelo metabolismo especializado, capazes de dar aroma e sabor específico às plantas, além de apresentarem importantes propriedades e funções biológicas, podendo atrair agentes polinizadores, repelir organismos e evitar patógenos macro e microscópicos (MOGHADDAM & MEHDIZADEH, 2017). Constituem um dos grupos de matérias-primas ou produtos derivados de vegetais mais importantes para as indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticas e de perfumaria (REHMAN et al., 2016).

Baccharis dracunculifolia é uma planta pertencente à família Asteraceae, que segundo Del Vitto & Petenatti, (2009; 2015), representa cerca de 8 a 10% de toda a flora global, abrigando aproximadamente 22.750 espécies em 1.620 gêneros. Os metabólitos especializados dessas espécies são objetos de muitos estudos devido a suas propriedades medicinais e farmacológicas. O gênero *Baccharis* ocorre predominantemente na América Latina, correspondendo a cerca de 500 espécies, algumas das quais com importante interesse comercial (VERDI et al., 2005). Esta espécie é nativa do Brasil, podendo ocorrer em biomas como o Pampa, Cerrado e Mata Atlântica, sendo a constituinte principal da própolis verde de *Apis mellífera* e muito utilizada pela medicina popular (BUDEL et al., 2004).

Os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* são ricos em sesquiterpenos, geralmente apresentam grande abundância de *trans*-nerolidol, germacreno D, biciclogermacreno, *trans*-cariofileno, espatulenol, globulol, viridiflorol, β -selineno, entre outros (FERRACINI et al, 1995; AGOSTINI et al., 2005; MASSIGNANI et al., 2009). Porém, a composição química pode variar em função da região de coleta. O estudo realizado por Frizzo et al. (2008) comparou a composição química dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* encontrados na Bolívia, Brasil e Uruguai, demonstrando que os óleos essenciais encontrados no Brasil apresentavam grandes quantidades de *trans*-nerolidol, enquanto no Uruguai e Bolívia, as proporções relativas desta substância eram baixas ou até mesmo inexistentes. Rigotti (2011) e Belini (2015) também constataram grande diversidade genética e química em populações de *B. dracunculifolia*.

Fatores abióticos, como as propriedades físicas do solo, incidência luminosa, altitude, ritmo circadiano, disponibilidade hídrica e sazonalidade podem interferir na concentração e composição de metabólitos especializados nas plantas (GOBBO-NETO & LOPES,

2007; SELMAR & KLEINWÄCHTER, 2013), incluindo os conteúdos de óleos essenciais de diversas plantas (REHMAN et al., 2016). Ferracini et al. (1995), demonstraram que o rendimento em óleos essenciais de *B. dracunculifolia* é maior no período chuvoso e que a proporção relativa entre os monoterpenos e sesquiterpenos modificavam de acordo com os períodos do ano.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da estação seca e chuvosa no rendimento e composição química dos óleos essenciais de de uma população nativa de *B. dracunculifolia*, de ocorrência no Estado de São Paulo.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Coleta do material vegetal

A coleta de *Baccharis dracunculifolia* DC. foi realizada no município de Águas de Santa Barbara, Estado de São Paulo (coordenadas geográficas: 22° 59' 46" S e 49° 18' 32" O). O material vegetal foi coletado com autorização do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (Cadastro nº A4C3B2F). O clima dessa região é denominado Cwa – Clima temperado úmido, com inverno frio e seco e verão quente, segundo a classificação Köppen-Geiger. A coleta foi feita em duas estações, sendo elas seca (06/09/2021) e chuvosa (21/03/2022), respectivamente. Para tal, 15 indivíduos de uma população foram sorteados em blocos casualizados e marcados com etiquetas plásticas. As partes aéreas de cada indivíduo foram coletados (Figura 1), totalizando 30 amostras para as duas coletas. Os indivíduos de 1 a 15 receberam uma nomenclatura específica para cada estação coletada (Tabela 1).



Figura 1: A: Arbusto de *Baccharis dracunculifolia*; B: Coleta de partes aéreas; C: Ramo de *B. dracunculifolia* coletado

Tabela 1: Nomenclatura dada aos indivíduos da população de *B. dracunculifolia* coletadas nas estações seca e chuvosa, Águas de Santa Barbara, SP

Indivíduos	Estação seca (06/09/2021)	Estação chuvosa (21/03/2022)
Bd - 01	1BD IAC 01	2BD IAC 01
Bd - 02	1BD IAC 02	2BD IAC 02
Bd - 03	1BD IAC 03	2BD IAC 03
Bd - 04	1BD IAC 04	2BD IAC 04
Bd - 05	1BD IAC 05	2BD IAC 05
Bd - 06	1BD IAC 06	2BD IAC 06
Bd - 07	1BD IAC 07	2BD IAC 07
Bd - 08	1BD IAC 08	2BD IAC 08
Bd - 09	1BD IAC 09	2BD IAC 09
Bd - 10	1BD IAC 10	2BD IAC 10
Bd - 11	1BD IAC 11	2BD IAC 11
Bd - 12	1BD IAC 12	2BD IAC 12
Bd - 13	1BD IAC 13	2BD IAC 13
Bd - 14	1BD IAC 14	2BD IAC 14
Bd - 15	1BD IAC 15	2BD IAC 15

3.4.2. Dados climatológicos

Os dados climatológicos foram obtidos em banco de dados NASA Power, onde temperatura (°C), umidade do solo na área da raiz (com um metro de profundidade), precipitação (mm) e radiação fotossintética ativa (PAR total), que indica a incidência luminosa de luzes do espectro visível que atingem uma superfície plana, expressa em W/m², foram consultados por um período de 10 meses, entre os dias 01 de junho de 2021 e 31 de março de 2022.

3.4.3. Extração dos óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação, em aparato Clevenger, com aproximadamente 50 g de folhas frescas por 2 h. Os óleos essenciais foram separados da fase aquosa, pesados e acondicionados em frascos de vidro de 5 mL, mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração a 4°C (Figura 2).

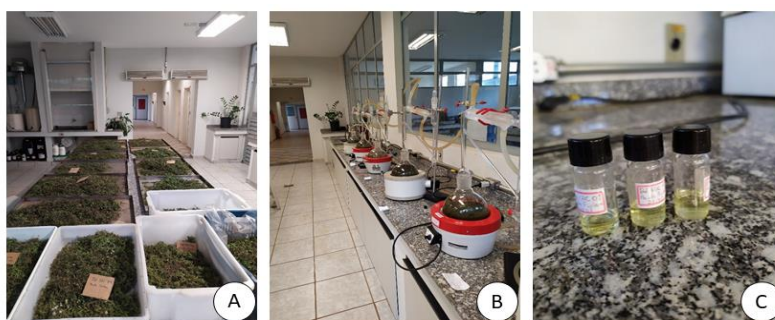


Figura 2: A: Amostras coletadas; B: Extração do óleo essencial por hidrodestilação em aparato Clevenger; C: Óleo essencial de *B. dracunculifolia*

3.4.4. Rendimento em óleos essenciais

O óleo essencial foi extraído a partir da matéria fresca e o rendimento em óleos essenciais foi expresso com base na massa seca. Para tanto, cerca de 3 g do material vegetal fresco foi separado, acondicionado em placa de Petri e seco em estufa a 60 °C, até atingir massa constante. A secagem da matéria-prima para cada indivíduo foi realizada em triplicata. O rendimento dos óleos essenciais das diferentes amostras foi determinado a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{massa do óleo essencial (g)}}{\text{massa da matéria seca (g)}} \cdot 100$$

3.4.5. Composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As análises dos óleos essenciais foram conduzidas em cromatógrafo a gás Thermo (GC TRACE 1310) equipado com detector de ionização em chamas (DIC) e espectrômetro de massas (EM), com divisão de fluxo de 3:7, para o EM e DIC, respectivamente. O injetor foi mantido a 220 °C, com vazão do gás de arraste (hélio, 99,9999% de pureza) de 0.5 mL.min⁻¹ na razão (split) de 1:20. O espectrômetro de massas operou no modo *full scan*, por impacto de elétrons (70 eV), e faixa de aquisição de 40 a 450 m/z. A temperatura da interface foi mantida em 230°C e do detector de ionização em chamas a 250°C. As amostras de óleos essenciais foram diluídas em acetato de etila (grau cromatográfico, 1mg.mL⁻¹) e injetado 1 µL de solução. A separação das substâncias foi realizada em coluna capilar Rtx-5 MS (20 m x 0,18 mm x 0,2 µm), e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 240°C (3°C.min⁻¹).

O software *Chromeleon* (Thermo Scientific-Waltham, MA, EUA) foi usado para aquisição e processamento dos dados. A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com as bibliotecas *National Institute of Standards and Technology* (NIST 14); *Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds* (FFNSC3) e dos índices de retenção linear com a literatura (Adams, 2017). O índice de retenção linear das substâncias foi obtido a partir da injeção da mistura de *n*-alcanos (C₉-C₂₄, Sigma-Aldrich, 99%, USA) nas mesmas condições cromatográficas das amostras, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

A proporção relativa das substâncias foi obtida por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC) pelo método de normalização de área. As análises dos óleos essenciais foram feitas em triplicata.

3.4.6. Composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia* por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CG×CG-EM)

As amostras de óleos essenciais foram diluídas em acetato de etila (grau cromatográfico, 1mg.mL⁻¹) e injetado 1 µL de solução em cromatógrafo a gás Thermo (GC TRACE 1310) equipado com detector de ionização em chamas (DIC) e espectrômetro de massas (EM), com divisão de fluxo de 3:7, para o EM e DIC, respectivamente. O injetor foi mantido a 220 °C, com divisão de vazão do gás de arraste (hélio, 99,9999% de pureza) na razão (*split*) de 1:20. A separação das substâncias foi realizada em coluna capilar Rtx-5 MS (20 m x 0,18 mm x 0,2 µm) na primeira dimensão (¹D) e em coluna Rtx Wax (5 m x 0,25 mm x 0,25 µm) na segunda dimensão (²D), com vazão de gás de arraste de 0,5 e 10,0 mL.min⁻¹ e seguindo a programação de temperatura de 60°C - 240°C (3 °C.min⁻¹) e vazão de gás de arraste de 0.5 mL.min⁻¹. O espectrômetro de massas (EM) operou no modo *full scan* por impacto de elétrons (70 eV), e faixa de aquisição de 40 a 450 *m/z*. A temperatura da interface foi mantida em 230°C e do detector de ionização em chamas a 250°C. O período de modulação foi definido a 6,0 s com um pulso de reinjeção (*flush*) de 250 ms. O software Chromeleon (Thermo Scientific-Waltham, MA, EUA) foi usado para aquisição de dados e processamento foi realizado usando o *software* GC Image (Zoex-Houston, TX, EUA).

A identificação das substâncias foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas com as bibliotecas *National Institute of Standards and Technology* (NIST 14); *Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds* (FFNSC3) e os índices de retenção linear das substâncias (IRL) com a literatura (Adams, 2017). Os índices de retenção linear calculado (IRL) foram obtidos a partir da injeção de uma série de *n*-alcanos (C₉-C₂₄, Sigma-Aldrich, 99%) nas mesmas condições cromatográficas das amostras, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

3.4.7. Análises estatísticas

Para avaliar a diferença no rendimento médio dos óleos essenciais entre as coletas foi realizado um teste-t de duas amostras pareadas com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O teste foi utilizado para comparar as médias dos rendimentos obtidos em cada período. Os dados de composição química dos óleos essenciais foram submetidos a análises multivariadas com o auxílio da plataforma estatística *MetaboAnalystR*. (XIA et al. 2015). As informações referentes às amostras (*scores*) foram normalizadas e os valores das variáveis (picos cromatográficos) autoescalados, sendo aplicadas análises de componentes principais (ACP); análises de agrupamentos hierárquicos (AAH) e mapas de calor (*Heatmaps*) com base na distância Euclidiana, indicando a dissimilaridade dos indivíduos.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Dados climatológicos

Os dados climatológicos (precipitação, umidade do solo, radiação fotossintética ativa e temperatura) obtidos na região de coleta por um período de 10 meses estão ilustrados nas Figuras 3 e 4. É possível notar que a precipitação de chuva mensal variou de 14,22 a 267,71 mm, havendo baixa na pluviosidade nos meses de junho, julho e agosto. No mês de setembro, a precipitação foi de 38,95 mm, resultando em baixa disponibilidade hídrica no solo, com 57,67% de saturação (Figura 3). A temperatura média no mês da primeira coleta foi de 23,90 °C, enquanto em julho e agosto as temperaturas atingiram 15,60 e 20,29 °C, respectivamente. A radiação fotossintética ativa total, expressa em W/m², na estação seca (primeira coleta) foi de aproximadamente 2.835 W/m² (Figura 4).

Na segunda coleta (período chuvoso), a precipitação foi de 134,93 mm e os índices de umidade do solo de 68,22%, indicando uma melhora na disponibilidade hídrica do solo. A pluviosidade e a umidade do solo dos dois meses anteriores a segunda coleta também foram elevados, chegando a atingir 267,71 mm de chuva em janeiro de 2022 e uma umidade de 69,61%, em fevereiro de 2022 (Figura 3). A temperatura média do mês da segunda coleta foi de 24,24 °C e a radiação fotossintética ativa total foi de aproximadamente 3.182 W/m² (Figura 4).

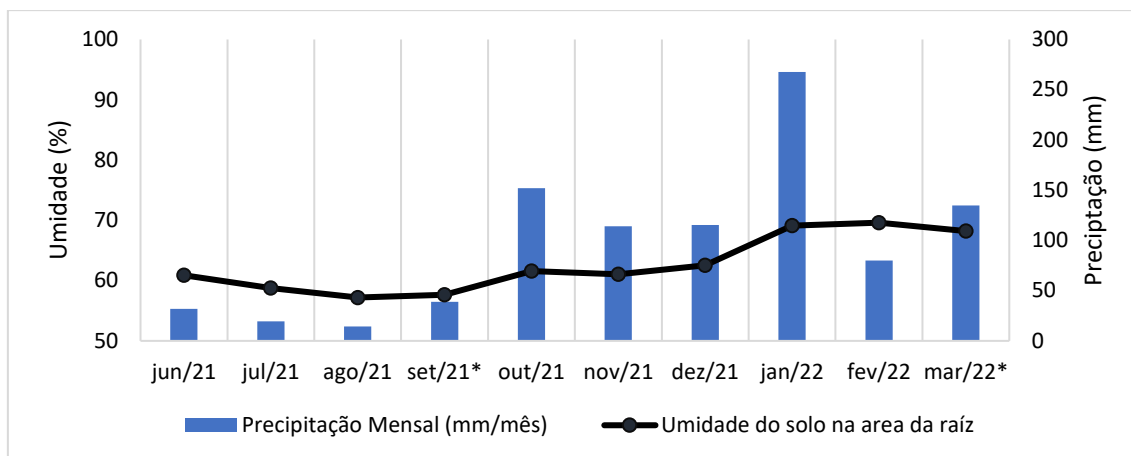


Figura 3: Precipitação mensal (mm) e Umidade média mensal do solo a 1 metro de profundidade (%) no período de junho de 2021 a março de 2022. Dados compilados do NASA Power, em dezembro de 2022. * = mês das coletas

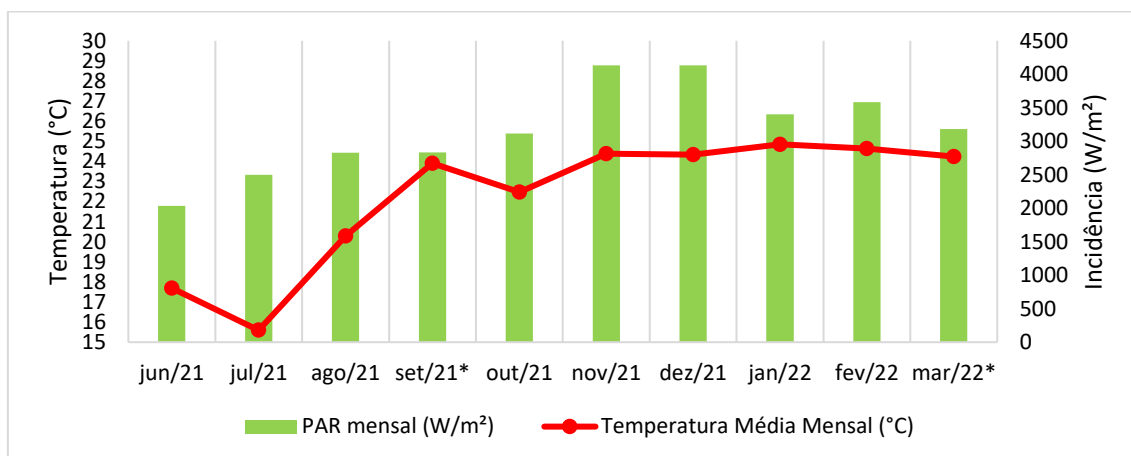


Figura 4: Temperatura Média Mensal (°C) e Radiação Fotossintética Ativa Mensal – PAR Mensal (W/m²) no período de junho de 2021 a março de 2022. Dados compilados do NASA Power, em dezembro de 2022. * = mês das coletas

3.5.2. Rendimento do óleo essencial

O rendimento dos óleos essenciais para a população de *B. dracunculifolia* na estação seca variou de 0,38% a 0,74%, sendo o maior observado para o indivíduo Bd-12 e o menor para Bd-09 (Figura 5). Na estação chuvosa o rendimento variou de 0,46% a 0,97%, sendo o maior valor observado para o indivíduo Bd-13 e o menor para Bd-08 (Figura 5). O rendimento médio dos óleos essenciais nas estações seca e chuvosa foram de 0,53% e 0,70%, com desvios padrões de 0,10% e 0,16%, respectivamente (Figura 6). O rendimento médio de óleos essenciais coletados na estação chuvosa foi significativamente maior que na estação seca, assim como o observado por Ferracini et al. (1995). Este

resultado sugere que o período de chuva é favorável a produção de óleos essenciais para a espécie *B. dracunculifolia*.

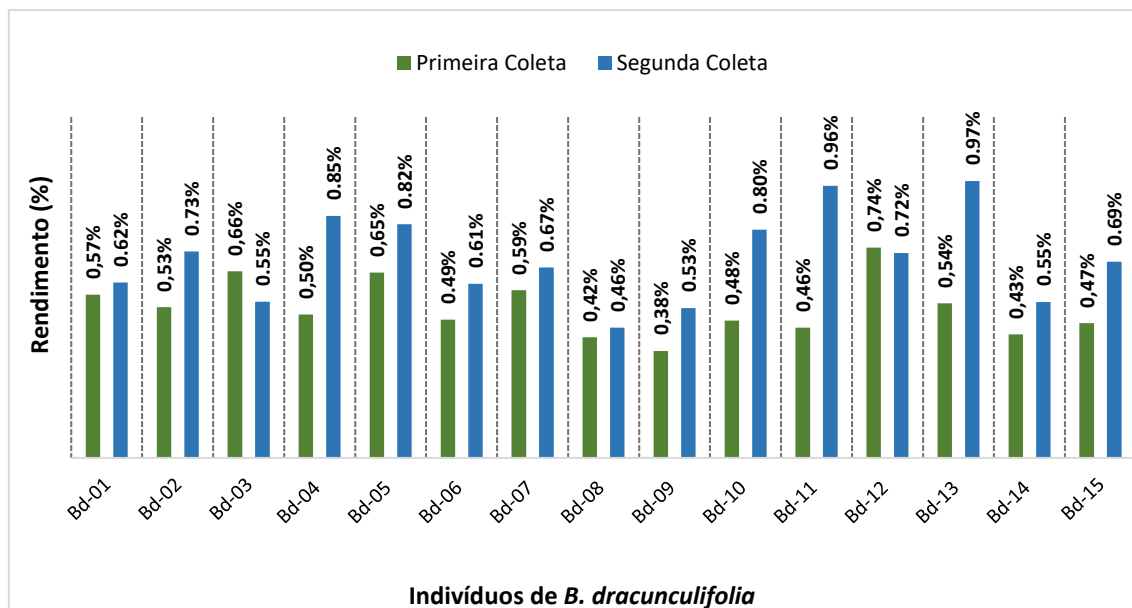


Figura 5: Rendimento dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados setembro/2021 e março/2022 (estação seca e chuvosa, respectivamente); Teste-t (pareado) < 0,005; Águas de Santa Barbara- SP

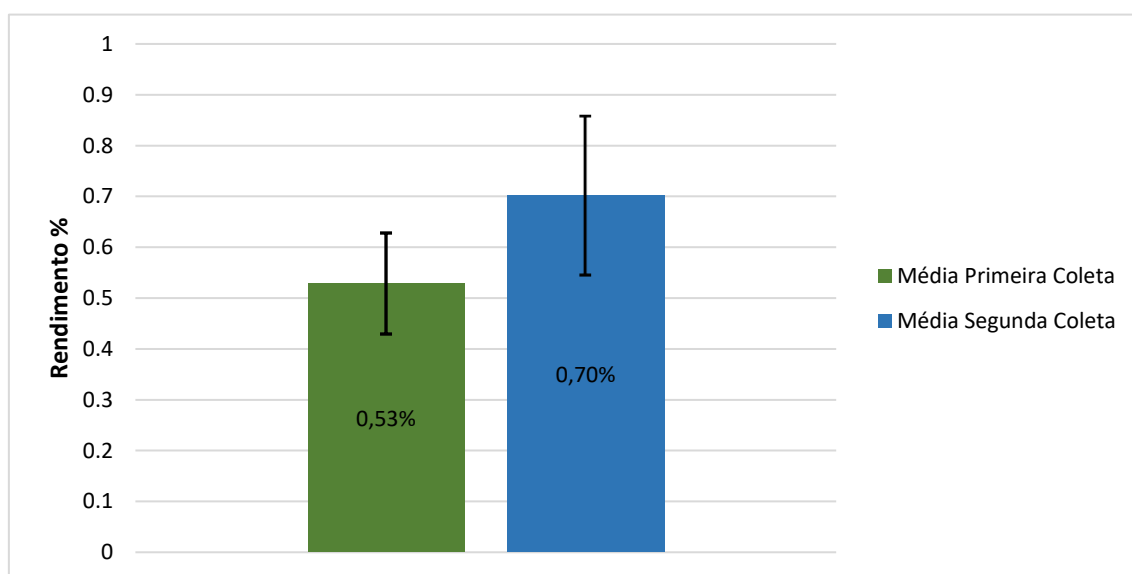


Figura 6: Rendimento médio dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados na estação seca (primeira coleta: setembro/2021) e chuvosa (segunda coleta: março/2022) Águas de Santa Barbara- SP; Desvio Padrão = 0,10% para a primeira coleta e 0,16% para a segunda coleta

3.5.3. Composição química dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A composição química dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) está demonstrada nas Tabelas 2 e 3. Independente da estação do ano, com exceção do indivíduo 12, o constituinte majoritário foi o *trans*-nerolidol, com proporção relativa variando de 14,95 a 40,11% na estação seca e de 11,43 a 46,64% para a chuvosa. Para o indivíduo 12, o constituinte mais abundante foi o espatulenol na estação seca e o β - pineno na estação chuvosa (Tabelas 2 e 3, Figuras 8 e 10).

Na estação seca, a porcentagem relativa do α -pineno, β - pineno, limoneno variou de 0,42 a 5,86%; 3,09 a 17,51% e 3,35 a 17,72%, respectivamente. Os hidrocarbonetos sesquiterpenos *trans*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno e δ -cadineno variaram de 0,89 a 4,74%; 0,42 a 7,50%; 2,32 a 8,52% e 2,17 a 5,22%, respectivamente. Dentre os sesquiterpenos oxigenados os óleos essenciais apresentaram, além do *trans*-nerolidol, alta abundância de espatulenol (7,23 a 18,67%) e α -cadinol (1,43 a 5,01%), como pode ser observado na Tabela 2 e na Figura 8.

Observou-se que os sesquiterpenos oxigenados foram as substâncias químicas mais abundantes em todos os indivíduos, em termos de proporções relativas, variando de 41,3 a 62,47%, com exceção de 1BD IAC 11, cuja proporção relativa de hidrocarbonetos monoterpênicos foi maior, atingindo 44,16% (Figura 7).

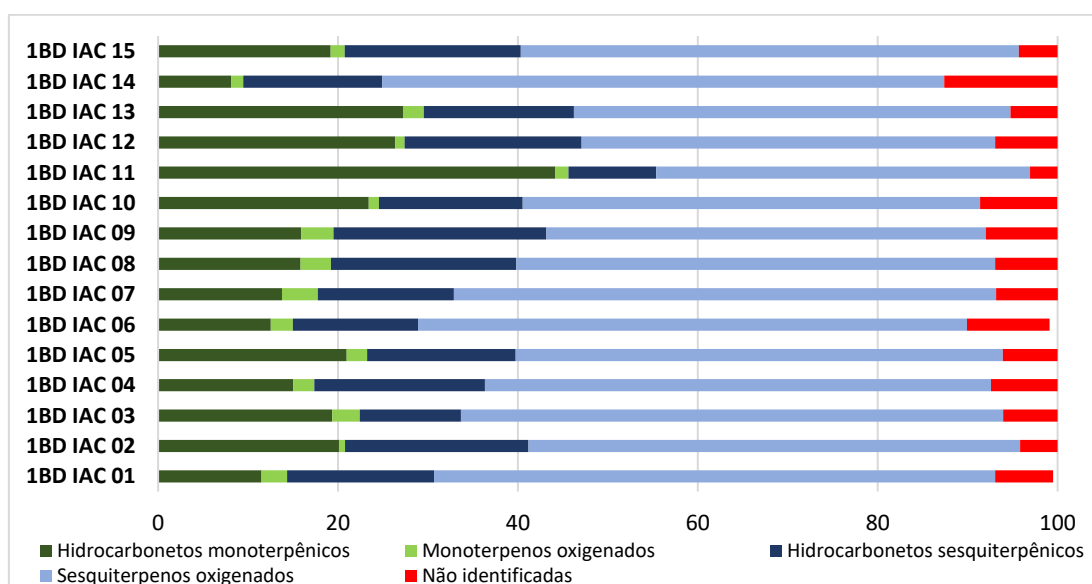


Figura 7: Classes das substâncias químicas e suas proporções relativas nos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* extraídos no período de seca (primeira coleta); Águas de Santa Barbara – SP

Tabela 2: Composição química média (%) dos óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* por cromatografia gasosa unidimensional acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), coletados na estação seca, Águas de Santa Barbara – SP

N º	Substância	IRL exp.	IRL lit	1BD IAC 01	1BD IAC 02	1BD IAC 03	1BD IAC 04	1BD IAC 05	1BD IAC 06	1BD IAC 07	1BD IAC 08	1BD IAC 09	1BD IAC 10	1BD IAC 11	1BD IAC 12	1BD IAC 13	1BD IAC 14	1BD IAC 15
1	α - tujeno	927	924	0,15 $\pm$ 0,02	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,51 $\pm$ 0,01
2	α - pineno	935	932	1,8 $\pm$ 0,06	5,65 $\pm$ 0,2	0,42 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,02	2,05 $\pm$ 0,06	1,46 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,01	1,36 $\pm$ 0,06	2,38 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,02	5,86 $\pm$ 0,2	3,14 $\pm$ 0,02	2,96 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,05	1,3 $\pm$ 0,02
3	β - pineno	980	974	5,48 $\pm$ 0,11	6,13 $\pm$ 0,17	9,45 $\pm$ 0,16	9,38 $\pm$ 0,12	9,98 $\pm$ 0,02	5,58 $\pm$ 0,12	4,95 $\pm$ 0,08	7,12 $\pm$ 0,17	9,23 $\pm$ 0,11	8,98 $\pm$ 0,12	17,51 $\pm$ 0,42	16,56 $\pm$ 0,15	8,65 $\pm$ 0,03	3,09 $\pm$ 0,06	5,1 $\pm$ 0,04
4	mirreno	994	988	1,01 $\pm$ 0,02	2,49 $\pm$ 0,13	0,41 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,02	1,52 $\pm$ 0,01	3,06 $\pm$ 0,12	1,64 $\pm$ 0,03	1,77 $\pm$ 0,01	tr	1,37 $\pm$ 0,02
5	limoneno	1031	1024	3,07 $\pm$ 0,09	5,85 $\pm$ 0,2	9,09 $\pm$ 0,07	3,56 $\pm$ 0,06	7,59 $\pm$ 0,09	4,9 $\pm$ 0,01	7,08 $\pm$ 0,08	6,56 $\pm$ 0,13	3,35 $\pm$ 0,03	11,49 $\pm$ 0,07	17,72 $\pm$ 0,3	5,03 $\pm$ 0,09	13,83 $\pm$ 0,05	3,76 $\pm$ 0,04	10,89 $\pm$ 0,12
6	(E)- β - ocimeno	1050	1044	0,42 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01	1,07 $\pm$ 0,02	1 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01	tr	tr	tr	tr	tr
7	acetofenona	1097	1065	0,69 $\pm$ 0,03	tr	0,67 $\pm$ 0,03	tr	tr	tr	0,68 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,07	0,7 $\pm$ 0,05	tr	tr	tr	0,86 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,04
8	linalol	1115	1095	0,67 $\pm$ 0,05	tr	0,72 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,03	0,8 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,01	tr	0,66 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,07	tr
9	(E)-4,8-dimetilnona-1,3,7- trieno	1120	-	0,61 $\pm$ 0,06	tr	0,56 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,04	1,46 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,1	tr	tr	tr	tr	0,74 $\pm$ 0,01
10	α - terpineol	1210	1186	0,44 $\pm$ 0,04	tr	0,49 $\pm$ 0,02	tr	tr	tr	tr	0,33 $\pm$ 0,01	tr	tr	0,8 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,04	tr	tr
11	trans - cariofileno	1424	1417	2,19 $\pm$ 0,02	2,82 $\pm$ 0,09	1,37 $\pm$ 0,04	4,74 $\pm$ 0,06	1,88 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,04	2,01 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,08	4,11 $\pm$ 0,02	1,82 $\pm$ 0,02	1,45 $\pm$ 0,08	1,48 $\pm$ 0,03	1,62 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,09	2,56 $\pm$ 0,05
12	aromadendreno	1443	1439	0,84 $\pm$ 0,08	tr	0,79 $\pm$ 0,07	tr	tr	tr	0,55 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,02	1,32 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,05	1,62 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,02
13	α - humuleno	1459	1452	0,9 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,04	1,65 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,03	tr	0,74 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,02
14	óxido de cabreuva B	1466	1462	1,89 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,06	1,54 $\pm$ 0,15	1,8 $\pm$ 0,06	1,63 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,07	1,43 $\pm$ 0,04	1,92 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,11	1,45 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,05	1,94 $\pm$ 0,1	1,34 $\pm$ 0,03
15	γ -muuroleno	1482	1478	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,45 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,05	tr	tr	tr	tr	tr	tr
16	óxido de cabreuva D	1484	1479	0,55 $\pm$ 0,07	tr	0,86 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,24	tr	2,01 $\pm$ 0,1	1,03 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,12	tr	1,11 $\pm$ 0,11	tr	tr	tr	1,12 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,02
17	germacreno D	1487	1480	2,69 $\pm$ 0,14	7,5 $\pm$ 0,11	2,29 $\pm$ 0,11	5,05 $\pm$ 0,26	4,21 $\pm$ 0,14	0,42 $\pm$ 0,04	3 $\pm$ 0,02	4,17 $\pm$ 0,13	4,11 $\pm$ 0,07	3,23 $\pm$ 0,08	1,88 $\pm$ 0,12	4,83 $\pm$ 0,06	2,83 $\pm$ 0,04	2,73 $\pm$ 0,2	4,33 $\pm$ 0,1
18	viridifloreno	1501	1496	tr	tr	0,63 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,02	tr	1,33 $\pm$ 0,32	0,69 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,03	1,38 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,09	tr	tr	1,05 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,09
19	biciclogermacreno	1503	1500	2,62 $\pm$ 0,06	5,4 $\pm$ 0,1	3,18 $\pm$ 0,03	4,47 $\pm$ 0,06	5,42 $\pm$ 0,21	5,36 $\pm$ 0,28	2,82 $\pm$ 0,14	7,72 $\pm$ 0,22	7,48 $\pm$ 0,04	4,24 $\pm$ 0,02	2,32 $\pm$ 0,03	8,52 $\pm$ 0,14	4,85 $\pm$ 0,04	4,06 $\pm$ 0,02	5,92 $\pm$ 0,09
20	α - muuroleno	1506	1500	0,78 $\pm$ 0,04	tr	0,22 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,11	tr	0,53 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,11	0,59 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,05
21	γ - cadineno	1521	1513	1,08 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,05	tr	tr	0,75 $\pm$ 0,02	tr	0,73 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,01	tr	0,52 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,02	tr	0,67 $\pm$ 0,01
22	δ - cadineno	1530	1522	5,22 $\pm$ 0,1	3,38 $\pm$ 0,07	2,17 $\pm$ 0,06	2,73 $\pm$ 0,17	3,61 $\pm$ 0,09	3,72 $\pm$ 0,03	3,78 $\pm$ 0,04	2,2 $\pm$ 0,04	2,73 $\pm$ 0,08	3,27 $\pm$ 0,09	2,45 $\pm$ 0,12	2,36 $\pm$ 0,09	3,42 $\pm$ 0,03	3,48 $\pm$ 0,13	3,12 $\pm$ 0,1
23	ni	1551	-	3,1 $\pm$ 0,08	2,6 $\pm$ 0,07	2,85 $\pm$ 0,12	3,04 $\pm$ 0,14	2,49 $\pm$ 0,08	2,04 $\pm$ 0,06	2,46 $\pm$ 0,08	1,5 $\pm$ 0,09	1,7 $\pm$ 0,09	2,99 $\pm$ 0,03	1,48 $\pm$ 0,14	1,73 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,01	3,59 $\pm$ 0,03	1,79 $\pm$ 0,02
24	ni	1573	-	tr	0,59 $\pm$ 0,01	0,9 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,08	3,77 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,03	0,61 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,11	0,52 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,02	1,32 $\pm$ 0,03	1,45 $\pm$ 0,16	0,64 $\pm$ 0,01
25	trans - nerolidol	1581	1561	35,89 $\pm$ 0,5	34,63 $\pm$ 0,27	33,04 $\pm$ 0,69	33,67 $\pm$ 0,44	35,77 $\pm$ 0,48	40,11 $\pm$ 0,76	38,73 $\pm$ 0,12	33,91 $\pm$ 0,14	17,59 $\pm$ 0,29	30,89 $\pm$ 0,14	27,6 $\pm$ 0,42	14,95 $\pm$ 0,1	17,22 $\pm$ 0,11	30,38 $\pm$ 0,11	35,52 $\pm$ 0,39
26	espatulenol	1595	1577	9,19 $\pm$ 0,22	7,23 $\pm$ 0,26	12,86 $\pm$ 0,19	9,87 $\pm$ 0,1	7,98 $\pm$ 0,02	9,28 $\pm$ 0,22	9,99 $\pm$ 0,21	9,66 $\pm$ 0,05	14,8 $\pm$ 0,16	8,77 $\pm$ 0,12	9,12 $\pm$ 0,09	17 $\pm$ 0,09	14,98 $\pm$ 0,13	18,67 $\pm$ 0,28	8,69 $\pm$ 0,11
27	ni	1600	1590	1,45 $\pm$ 0,21	tr	tr	1,85 $\pm$ 0,16	1,52 $\pm$ 0,03	1,93 $\pm$ 0,03	1,66 $\pm$ 0,13	1,22 $\pm$ 0,03	tr	0,95 $\pm$ 0,09	tr	tr	tr	2,75 $\pm$ 0,17	tr
28	ni	1603	-	0,95 $\pm$ 0,1	0,98 $\pm$ 0,09	1,63 $\pm$ 0,33	0,69 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,1	0,78 $\pm$ 0,04	3,46 $\pm$ 0,08	3,2 $\pm$ 0,37	3,11 $\pm$ 0,15	1,09 $\pm$ 0,09	2,98 $\pm$ 0,03	2,17 $\pm$ 0,02	3,84 $\pm$ 0,04	tr
29	ni	1604	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,43 $\pm$ 0,09
30	globulol	1608	1590	1,11 $\pm$ 0,06	1,87 $\pm$ 0,11	2,95 $\pm$ 0,03	1,1 $\pm$ 0,1	1,02 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,05	tr	0,81 $\pm$ 0,01	4,14 $\pm$ 0,27	1,02 $\pm$ 0,02	1,71 $\pm$ 0,05	1,29 $\pm$ 0,08	3,53 $\pm$ 0,08	0,97 $\pm$ 0,06	2,82 $\pm$ 0,14

N ^o	Substância	IRL exp.	IRL lit	1BD IAC 01	1BD IAC 02	1BD IAC 03	1BD IAC 04	1BD IAC 05	1BD IAC 06	1BD IAC 07	1BD IAC 08	1BD IAC 09	1BD IAC 10	1BD IAC 11	1BD IAC 12	1BD IAC 13	1BD IAC 14	1BD IAC 15
31	ni	1611	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,55 ± 0,05	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	viridiflorol	1616	1592	tr	tr	1,07 ± 0,08	tr	tr	tr	tr	0,44 ± 0,02	1,92 ± 0,15	tr	tr	1,75 ± 0,05	2,17 ± 0,1	tr	0,97 ± 0,06
33	rosifoliol	1618	1600	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,46 ± 0,02	0,58 ± 0,17	tr	tr	tr	tr	tr	tr
34	ni	1624	-	0,95 ± 0,15	tr	0,68 ± 0,03	0,59 ± 0,04	0,49 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,65 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,94 ± 0,06	0,48 ± 0,01	tr	0,96 ± 0,1	0,77 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,45 ± 0,03
35	1- <i>epi</i> -cubenol	1642	1627	0,35 ± 0,04	0,57 ± 0,06	0,99 ± 0,06	tr	tr	0,51 ± 0,02	tr	0,74 ± 0,04	tr	0,73 ± 0,02	tr	tr	1,02 ± 0,02	tr	tr
36	<i>epi-alpha</i> -cadinol	1659	1638	1,79 ± 0,02	0,84 ± 0,01	0,7 ± 0,05	1,62 ± 0,09	1,14 ± 0,02	0,56 ± 0,07	1 ± 0,03	1,06 ± 0,06	0,95 ± 0,02	0,8 ± 0,04	tr	0,88 ± 0,02	1,22 ± 0,05	1,06 ± 0,06	0,79 ± 0,05
37	<i>epi-alpha</i> - muurolol	1661	1640	2,73 ± 0,06	1,58 ± 0,01	1,31 ± 0,03	1,64 ± 0,04	1,73 ± 0,02	1,1 ± 0,06	1,59 ± 0,12	1,47 ± 0,1	1,91 ± 0,01	1,44 ± 0,04	tr	1,67 ± 0,08	2 ± 0,02	2,02 ± 0,04	1,31 ± 0,03
38	α -muurolol	1665	1644	1,55 ± 0,04	0,99 ± 0,04	1,14 ± 0,07	1,13 ± 0,06	0,96 ± 0,09	1,37 ± 0,07	1,17 ± 0,12	0,81 ± 0,07	1,04 ± 0,01	1,13 ± 0,04	tr	1,17 ± 0,08	1,1 ± 0,03	1,56 ± 0,02	0,79 ± 0,02
39	α - cadinol	1675	1652	5,01 ± 0,07	2,66 ± 0,16	1,75 ± 0,07	2,48 ± 0,09	2,98 ± 0,1	1,63 ± 0,17	2,69 ± 0,02	2,22 ± 0,09	2,77 ± 0,1	2,01 ± 0,05	1,43 ± 0,03	2,42 ± 0,08	2,87 ± 0,04	2,55 ± 0,1	1,87 ± 0,05
40	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1717	1685	2,31 ± 0,31	2,9 ± 0,46	2,05 ± 0,35	1,93 ± 0,19	0,96 ± 0,35	2,49 ± 0,58	2,3 ± 0,13	tr	1,71 ± 0,09	1,05 ± 0,25	0,61 ± 0,17	2,83 ± 0,22	1,32 ± 0,21	2,19 ± 0,33	0,84 ± 0,2
41	eremofilona	1754	1734	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,55 ± 0,03	tr	tr	tr
	Hidrocarbonetos monoterpênicos			11,51 ± 0,28	20,11 ± 0,7	19,37 ± 0,26	15,01 ± 0,22	20,95 ± 0,19	12,53 ± 0,19	13,77 ± 0,24	15,85 ± 0,38	15,92 ± 0,19	23,43 ± 0,23	44,16 ± 1,04	26,37 ± 0,28	27,21 ± 0,1	8,1 ± 0,15	19,17 ± 0,21
	Monoterpenos oxigenados			2,84 ± 0,2	0,69 ± 0,05	3,06 ± 0,11	2,37 ± 0,04	2,28 ± 0,03	2,47 ± 0,08	3,99 ± 0,1	3,38 ± 0,17	3,57 ± 0,09	1,12 ± 0,11	1,46 ± 0,06	1,05 ± 0,11	2,34 ± 0,08	1,38 ± 0,08	1,57 ± 0,05
	Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			16,34 ± 0,61	20,36 ± 0,48	11,23 ± 0,7	18,95 ± 1,03	16,51 ± 0,61	13,9 ± 0,93	15,14 ± 0,63	20,61 ± 0,88	23,68 ± 0,43	15,98 ± 0,55	9,77 ± 0,54	19,68 ± 0,43	16,67 ± 0,35	15,45 ± 0,83	19,57 ± 0,55
	Sesquiterpenos oxigenados			62,36 ± 1,32	54,67 ± 1,37	60,27 ± 1,61	56,26 ± 1,11	54,16 ± 1,11	61,04 ± 1,99	60,27 ± 0,75	53,23 ± 0,59	48,84 ± 1,26	50,87 ± 0,7	41,53 ± 0,76	45,96 ± 0,85	48,53 ± 0,79	62,47 ± 0,99	55,39 ± 1,04
	Não identificadas			6,45 ± 0,53	4,17 ± 0,16	6,06 ± 0,53	7,42 ± 0,4	6,1 ± 0,26	9,18 ± 0,34	6,85 ± 0,3	6,93 ± 0,24	8 ± 0,66	8,57 ± 0,39	3,09 ± 0,27	6,94 ± 0,2	5,24 ± 0,08	12,6 ± 0,42	4,31 ± 0,15

IRL. exp. = índice de retenção linear experimental; IRL. Lit = índice de retenção linear da literatura (Adams, 2017); ni = substância não identificada; tr = traços (<0,12%); ± = Desvio Padrão (triplicatas)

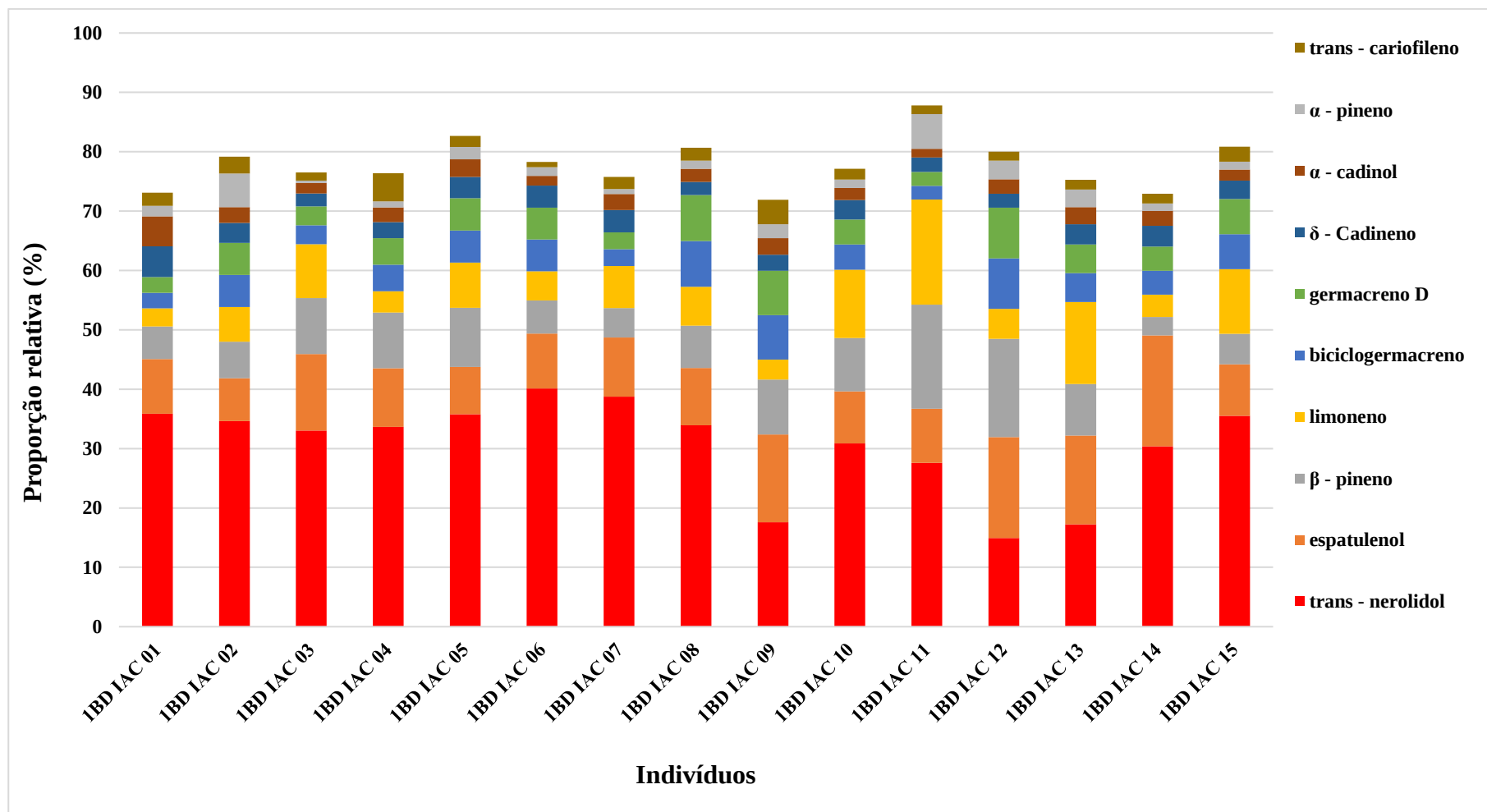


Figura 8: Proporção relativa média dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* na estação seca (primeira coleta); Águas de Santa Barbara – SP

Assim como observado na estação seca, o β -pineno e o limoneno foram as substâncias mais abundantes dentre a classe dos hidrocarbonetos monoterpênicos nos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* na estação chuvosa, variando de 3,60 a 30,66% e 2,02 a 14,04%, respectivamente, bem como, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos *trans*-cariofileno (0,87 a 7,50%), germacreno D (1,44 a 6,36%), biciclogermacreno (2,29 a 9,37%) e δ -cadineno (1,89 a 5,27%) e os sesquiterpenos oxigenados espatulenol (5,46 a 15,07%), α -cadinol (0,74 a 4,39%) juntamente com *trans*-nerolidol (11,43 a 46,64%), como demonstrado na Tabela 3 e Figura 10.

Na segunda coleta (estação chuvosa), as proporções relativas de sesquiterpenos oxigenados variaram de 40,83 e 69,36%, com exceção do indivíduo 2BD IAC 12, onde os hidrocarbonetos monoterpênicos atingiram proporções relativas de 48,21% (Tabela 3). Tais resultados indicam que, para alguns indivíduos, a variação sazonal entre os períodos de coleta interferiu no perfil químico dos óleos essenciais e na proporção entre monoterpênicos/sesquiterpenos, assim como foi constatado por Ferracini et al. (1995). Independente do período de coleta, a classe dos sesquiterpenos oxigenados foi a mais abundante para a maioria dos indivíduos, com exceção dos indivíduos 11 e 12, na primeira e segunda coleta, respectivamente (Figuras 7 e 9).

Como demonstrado nas Figuras 7, 8, 9 e 10 a proporção relativa das classes de compostos entre os indivíduos de *B. dracunculifolia* divergiu, indicando diversidade química intraespecífica na população.

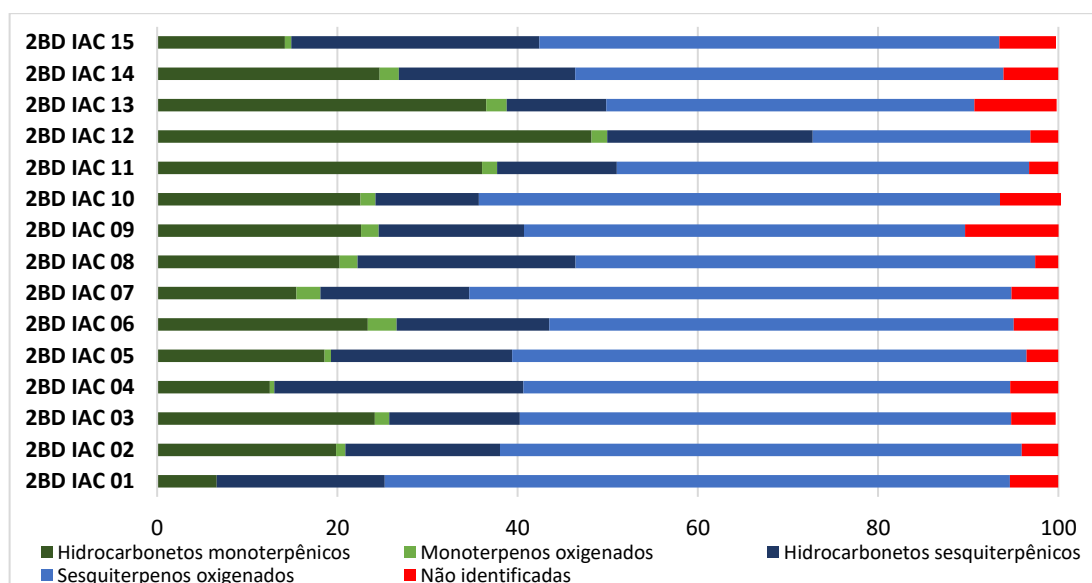


Figura 9: Classes das substâncias químicas e suas proporções relativas nos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* na estação chuvosa (segunda coleta); Águas de Santa Barbara – SP

Tabela 3: Composição química média (%) dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* por cromatografia gasosa unidimensional acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), coletados na estação chuvosa, Águas de Santa Barbara – SP

N ^o	Substância	IRL exp.	IRL lit	2BD IAC 01	2BD IAC 02	2BD IAC 03	2BD IAC 04	2BD IAC 05	2BD IAC 06	2BD IAC 07	2BD IAC 08	2BD IAC 09	2BD IAC 10	2BD IAC 11	2BD IAC 12	2BD IAC 13	2BD IAC 14	2BD IAC 15
1	α -tujeno	929	924	tr	0,33 $\pm$ 0,02	tr	tr	0,21 $\pm$ 0,02	tr	0,33 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	tr	0,46 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	tr	0,36 $\pm$ 0,01	tr	0,34 $\pm$ 0,01
2	α -pineno	936	932	0,97 $\pm$ 0,07	4,94 $\pm$ 0,09	0,6 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,02	2,19 $\pm$ 0,03	2,5 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,02	2,28 $\pm$ 0,02	3,14 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,03	5,06 $\pm$ 0,02	6,97 $\pm$ 0,08	4,47 $\pm$ 0,02	5,3 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,02
3	sabineno	977	969	tr	0,31 $\pm$ 0,02	tr	tr	0,17 $\pm$ 0,04	tr	tr	tr	tr	tr	0,42 $\pm$ 0	0,41 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,02	tr	tr
4	β -pineno	981	974	3,61 $\pm$ 0,06	5,27 $\pm$ 0,05	11,92 $\pm$ 0,15	8,16 $\pm$ 0,07	8,41 $\pm$ 0,03	7,63 $\pm$ 0,07	4,62 $\pm$ 0,02	8,13 $\pm$ 0,02	13,04 $\pm$ 0,31	6,95 $\pm$ 0,11	12,74 $\pm$ 0,09	30,66 $\pm$ 0,08	13,23 $\pm$ 0,02	9,03 $\pm$ 0,06	3,6 $\pm$ 0,03
5	mirreno	994	988	tr	2,31 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,03	1,19 $\pm$ 0,03	1,1 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,01	1,35 $\pm$ 0,05	1,41 $\pm$ 0,04	2,58 $\pm$ 0,03	2,76 $\pm$ 0,04	2,52 $\pm$ 0,03	2,14 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,01
6	limoneno	1032	1024	2,02 $\pm$ 0,04	5,55 $\pm$ 0,1	10,78 $\pm$ 0,14	2,11 $\pm$ 0,09	5,72 $\pm$ 0,02	11,04 $\pm$ 0,17	7,63 $\pm$ 0,02	7,5 $\pm$ 0,03	4,17 $\pm$ 0,07	11,09 $\pm$ 0,12	13,75 $\pm$ 0,04	6,78 $\pm$ 0,05	14,04 $\pm$ 0,17	6,93 $\pm$ 0,05	7,6 $\pm$ 0,05
7	(E)- β -ocimeno	1051	1044	tr	0,53 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,02	1,29 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01
8	γ -terpineno	1062	1054	tr	0,21 $\pm$ 0,01	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,32 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,01	tr	0,29 $\pm$ 0,02	tr	0,17 $\pm$ 0,01
9	terpinoleno	1094	1086	tr	0,4 $\pm$ 0,01	tr	0,38 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,01	tr	tr	0,41 $\pm$ 0,01	tr	0,65 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02	tr	0,65 $\pm$ 0,01	tr	0,42 $\pm$ 0,01
10	acetofenona	1099	1065	tr	0,16 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,01	tr	0,19 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,02	tr	0,26 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,02
11	linalool	1116	1095	tr	0,58 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01	tr	tr	0,77 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0	0,43 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,01	tr
12	(E)-4,8-dimethylnona-1,3,7- triena	1120	1113	tr	0,29 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02	1,34 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,01
13	terpinen-4-ol	1191	1174	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,29 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,01	tr	tr
14	α -terpineol	1211	1186	tr	tr	0,36 $\pm$ 0,1	tr	tr	0,47 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,01	tr
15	α -cubebeno	1353	1348	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,15 $\pm$ 0,01
16	α -copaeno	1379	1374	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,18 $\pm$ 0,01
17	β -elemeno	1396	1389	tr	0,26 $\pm$ 0,03	tr	0,44 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,01	tr	0,29 $\pm$ 0	0,39 $\pm$ 0,03	tr	tr	tr	0,38 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,02	tr	0,44 $\pm$ 0,02
18	α -gurjuneno	1414	1409	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,2 $\pm$ 0,01	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,14 $\pm$ 0,01
19	trans-cariofileno	1424	1417	2,47 $\pm$ 0,02	2,8 $\pm$ 0,03	1,82 $\pm$ 0,02	7,5 $\pm$ 0,08	2,7 $\pm$ 0,04	2,44 $\pm$ 0,03	2,24 $\pm$ 0,03	2,94 $\pm$ 0,02	2,77 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,01	1,76 $\pm$ 0,02	2,05 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,01	1,84 $\pm$ 0,03	4,29 $\pm$ 0,02
20	β -gurjeneno	1434	1431	tr	tr	tr	tr	0,12 $\pm$ 0,03	tr	tr	0,2 $\pm$ 0,01	tr	0,53 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01
21	aromadendreno	1443	1439	0,93 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0	0,43 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,12	0,8 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,07
22	α -humuleno	1459	1452	0,78 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,05	1,41 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,23	1,43 $\pm$ 0,08	0,85 $\pm$ 0,19
23	ni	1467		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,21 $\pm$ 0,04	tr	tr	tr	0,55 $\pm$ 0,38	tr	0,46 $\pm$ 0,32
24	óxido de cabreuva B	1467	1462	1,49 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,13	1,57 $\pm$ 0,13	1,37 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,11	tr	0,1 $\pm$ 0
25	γ -muuroleno	1482	1478	0,6 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,03	tr	0,69 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0	tr	tr	tr	tr
26	óxido de cabreuva D	1485	1479	0,48 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,13	0,45 $\pm$ 0,08	tr	0,3 $\pm$ 0,13	0,56 $\pm$ 0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,25 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,01
27	germacreno D	1487	1480	2,48 $\pm$ 0,12	4,41 $\pm$ 0,12	2,9 $\pm$ 0,1	6,36 $\pm$ 0,05	4,19 $\pm$ 0,19	3,82 $\pm$ 0,1	3,15 $\pm$ 0,06	4,01 $\pm$ 0,14	2,22 $\pm$ 0,16	1,83 $\pm$ 0,03	1,83 $\pm$ 0,1	4,17 $\pm$ 0,06	1,44 $\pm$ 0,07	4,05 $\pm$ 0,02	5,62 $\pm$ 0,04
28	ni	1489		tr	0,33 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,07	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,26 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,04	tr	0,31 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,02
29	ni	1497		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,18 $\pm$ 0,02	tr	0,2 $\pm$ 0,01
30	viridifloreno	1501	1496	1,25 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,06	1,48 $\pm$ 0,1	1,13 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,07
31	biciclogermacreno	1503	1500	2,6 $\pm$ 0,07	3,48 $\pm$ 0,03	4,05 $\pm$ 0,06	6,4 $\pm$ 0,1	6,28 $\pm$ 0,07	3,81 $\pm$ 0,02	3,13 $\pm$ 0,03	8,04 $\pm$ 0,11	5,04 $\pm$ 0,21	2,29 $\pm$ 0,01	3,71 $\pm$ 0,06	9,07 $\pm$ 0,18	3,36 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0,08	9,37 $\pm$ 0,07
32	α -muuroleno	1507	1500	0,85 $\pm$ 0,08	0,49 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,04

N ^o	Substância	IRL exp.	IRL lit	2BD IAC 01	2BD IAC 02	2BD IAC 03	2BD IAC 04	2BD IAC 05	2BD IAC 06	2BD IAC 07	2BD IAC 08	2BD IAC 09	2BD IAC 10	2BD IAC 11	2BD IAC 12	2BD IAC 13	2BD IAC 14	2BD IAC 15
33	ni	1513		0,88 ± 0,05	tr	0,25 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,66 ± 0,04	0,23 ± 0,01	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,26 ± 0,01
34	ni	1515		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,27 ± 0,03	0,3 ± 0,05	tr	0,45 ± 0,01	0,38 ± 0	0,19 ± 0,01	0,62 ± 0,06	0,26 ± 0,01
35	γ-cadineno	1521	1513	1,42 ± 0,05	0,78 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,72 ± 0,04	0,53 ± 0,02	0,88 ± 0,01	0,71 ± 0,02	0,61 ± 0,07	0,4 ± 0	0,52 ± 0,01	0,5 ± 0,05	0,49 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,77 ± 0,01
36	δ-cadineno	1530	1522	5,27 ± 0,06	2,97 ± 0,01	2,25 ± 0,08	2,31 ± 0,14	2,4 ± 0,13	2,27 ± 0,05	3,53 ± 0,03	2,73 ± 0,06	2,28 ± 0,14	2,03 ± 0,01	2,38 ± 0,04	1,89 ± 0,05	2,21 ± 0,02	3,12 ± 0,04	2,88 ± 0,02
37	trans-cadina-1,4-dieno	1539	1533	tr	tr	tr	tr	0,1 ± 0,02	tr	tr	0,12 ± 0,01	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,12 ± 0,02
38	α-cadineno	1545	1537	tr	tr	tr	tr	0,16 ± 0,01	tr	tr	0,16 ± 0,01	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,13 ± 0,02
39	ni	1551		2,14 ± 0,11	1,54 ± 0,05	1,6 ± 0,14	1,13 ± 0,09	1,2 ± 0,03	1,83 ± 0,1	1,53 ± 0,05	0,75 ± 0,04	1,33 ± 0,09	2,77 ± 0,09	0,82 ± 0,09	0,68 ± 0,02	0,8 ± 0,05	1,96 ± 0,02	0,57 ± 0,02
40	ni	1574		tr	1,05 ± 0,04	0,74 ± 0,02	0,97 ± 0,03	0,78 ± 0,04	1 ± 0,03	0,97 ± 0,02	0,46 ± 0	1,13 ± 0,06	0,97 ± 0,01	0,47 ± 0,01	tr	0,79 ± 0,04	1,06 ± 0,02	0,37 ± 0
41	trans-nerolidol	1581	1561	46,64 ± 0,21	41,7 ± 0,2	33,41 ± 0,28	40,91 ± 0,37	42,92 ± 0,3	37,59 ± 0,31	41,5 ± 0,17	34,41 ± 0,06	23,26 ± 0,66	37,67 ± 0,58	33,44 ± 0,15	11,43 ± 0,11	19,55 ± 0,13	28,75 ± 0,1	38,33 ± 0,1
42	espatulenol	1597	1577	9,76 ± 0,07	8,27 ± 0,13	13,65 ± 0,05	5,46 ± 0,2	7,73 ± 0,09	8,76 ± 0,07	11,08 ± 0,15	8,49 ± 0,02	15,07 ± 0,1	10,17 ± 0,07	7,88 ± 0,05	10,32 ± 0,07	11,83 ± 0,08	12,34 ± 0,02	7,49 ± 0,06
43	ni	1601		1,47 ± 0,05	tr	tr	1,6 ± 0,3	tr	tr	tr	tr	tr	0,39 ± 0,09	tr	tr	tr	tr	0,87 ± 0,05
44	ni	1604		0,89 ± 0,11	1,13 ± 0,09	1,29 ± 0,06	0,96 ± 0,06	1,02 ± 0,06	1,47 ± 0,06	1,54 ± 0,11	0,85 ± 0,12	2,86 ± 0,37	1,13 ± 0,06	0,82 ± 0,05	1,57 ± 0,06	5,25 ± 0,1	1,49 ± 0,04	2,19 ± 0,04
45	globulol	1608	1590	tr	1,73 ± 0,07	2,42 ± 0,1	0,74 ± 0,11	0,57 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,5 ± 0,02	2,33 ± 0,16	3,33 ± 0,16	2,89 ± 0,05	1,4 ± 0,04	0,65 ± 0,03	2,16 ± 0,06	2,34 ± 0,07	0,3 ± 0,02
46	ni	1612		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,69 ± 0,04	0,38 ± 0,03	tr	tr	0,43 ± 0,03	tr	0,46 ± 0,03
47	ni	1616		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,87 ± 0,06	0,53 ± 0,05	tr	tr	tr	tr	tr
48	viridiflorol	1616	1592	0,73 ± 0,03	tr	0,27 ± 0,09	0,82 ± 0,11	0,41 ± 0,07	0,37 ± 0,04	0,28 ± 0,04	0,39 ± 0,01	tr	0,68 ± 0,07	0,23 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,23 ± 0,05	tr	0,24 ± 0,01
49	rosifolol	1619	1600	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,71 ± 0,04	0,58 ± 0,03	tr	tr	0,71 ± 0,1	tr	0,29 ± 0,02
50	ni	1625		tr	tr	0,54 ± 0,03	0,32 ± 0,06	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,5 ± 0,1	tr	0,98 ± 0,13	0,45 ± 0,06	0,33 ± 0,03	0,45 ± 0,01	0,66 ± 0,06	0,52 ± 0,02	0,31 ± 0,05
51	1-epi-cubenol	1642	1627	0,72 ± 0,1	0,46 ± 0,05	tr	tr	0,24 ± 0,04	tr	0,37 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0,51 ± 0	0,62 ± 0,03	0,37 ± 0,03	tr	tr	0,48 ± 0,01	0,39 ± 0,02
52	epi-α-cadinol	1660	1638	1,27 ± 0,1	0,43 ± 0,02	0,55 ± 0,03	1 ± 0,14	0,47 ± 0,03	tr	0,5 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,58 ± 0,08	0,51 ± 0,02	0,31 ± 0,04	tr	0,78 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,44 ± 0,02
53	epi-α-muurolol	1662	1640	2,5 ± 0,06	1,06 ± 0,1	0,64 ± 0,3	1,29 ± 0,06	1,03 ± 0,05	0,82 ± 0,15	1,11 ± 0,02	1,23 ± 0,04	1,6 ± 0,1	1,17 ± 0,05	0,68 ± 0,03	0,21 ± 0,03	1,58 ± 0,02	0,92 ± 0,05	0,99 ± 0,08
54	α-muurolol	1667	1644	1,37 ± 0,06	1,12 ± 0,15	0,79 ± 0,08	0,92 ± 0,2	0,77 ± 0,07	0,64 ± 0,16	0,77 ± 0,02	0,6 ± 0,02	1,02 ± 0,11	1,24 ± 0,08	0,44 ± 0,04	tr	0,91 ± 0,03	0,96 ± 0,02	0,61 ± 0,08
55	α-cadinol	1676	1652	4,39 ± 0,12	1,47 ± 0,23	0,74 ± 0,2	1,89 ± 0,34	1,46 ± 0,05	0,6 ± 0,14	1,35 ± 0,03	1,63 ± 0,02	1,94 ± 0,29	1,61 ± 0,09	0,79 ± 0,01	0,48 ± 0,03	2,18 ± 0,01	0,85 ± 0,04	1,16 ± 0,13
56	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	1717	1685	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,72 ± 0,15	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
57	eremofilona	1756	1734	tr	0,37 ± 0,1	0,66 ± 0,1	tr	0,27 ± 0,04	tr	0,61 ± 0,08	tr	0,51 ± 0,21	0,43 ± 0,02	tr	tr	0,46 ± 0,02	tr	0,22 ± 0,03
Hidrocarbonetos monoterpênicos				6,6 ± 0,17	19,84 ± 0,37	24,15 ± 0,35	12,49 ± 0,27	18,57 ± 0,2	23,37 ± 0,32	15,46 ± 0,13	20,26 ± 0,11	22,61 ± 0,45	22,54 ± 0,35	36,07 ± 0,22	48,21 ± 0,29	36,51 ± 0,31	24,69 ± 0,13	14,17 ± 0,15
Monoterpenos oxigenados				0 ± 0	1,04 ± 0,03	1,6 ± 0,17	0,5 ± 0,02	0,71 ± 0,04	3,19 ± 0,15	2,64 ± 0,12	1,96 ± 0,06	1,97 ± 0,12	1,7 ± 0,13	1,67 ± 0,11	1,73 ± 0,08	2,27 ± 0,15	2,13 ± 0,12	0,71 ± 0,02
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				18,65 ± 0,73	17,15 ± 0,54	14,49 ± 0,6	27,64 ± 0,63	20,13 ± 0,96	16,94 ± 0,61	16,54 ± 0,32	24,2 ± 0,65	16,14 ± 0,76	11,47 ± 0,22	13,25 ± 0,43	22,8 ± 0,62	11,07 ± 0,65	19,56 ± 0,35	27,52 ± 0,63
Sesquiterpenos oxigenados				69,36 ± 0,75	57,91 ± 1,05	54,53 ± 1,22	54,04 ± 1,54	57,05 ± 0,79	51,54 ± 0,89	60,16 ± 0,71	51,02 ± 0,38	48,93 ± 1,75	57,81 ± 1,07	45,77 ± 0,41	24,17 ± 0,28	40,83 ± 0,5	47,52 ± 0,32	51,04 ± 0,56
Não identificadas				5,38 ± 0,32	4,04 ± 0,22	4,95 ± 0,33	5,33 ± 0,56	3,52 ± 0,17	4,95 ± 0,2	5,21 ± 0,31	2,56 ± 0,2	10,36 ± 0,84	6,87 ± 0,4	3,23 ± 0,23	3,08 ± 0,09	9,14 ± 0,75	6,1 ± 0,19	6,31 ± 0,55

IRL. exp. = índice de retenção linear experimental; IRL. Lit = índice de retenção linear da literatura (Adams, 2017); ni = substância não identificada. tr = traços (<0,09%); ± = Desvio Padrão (triplicatas)

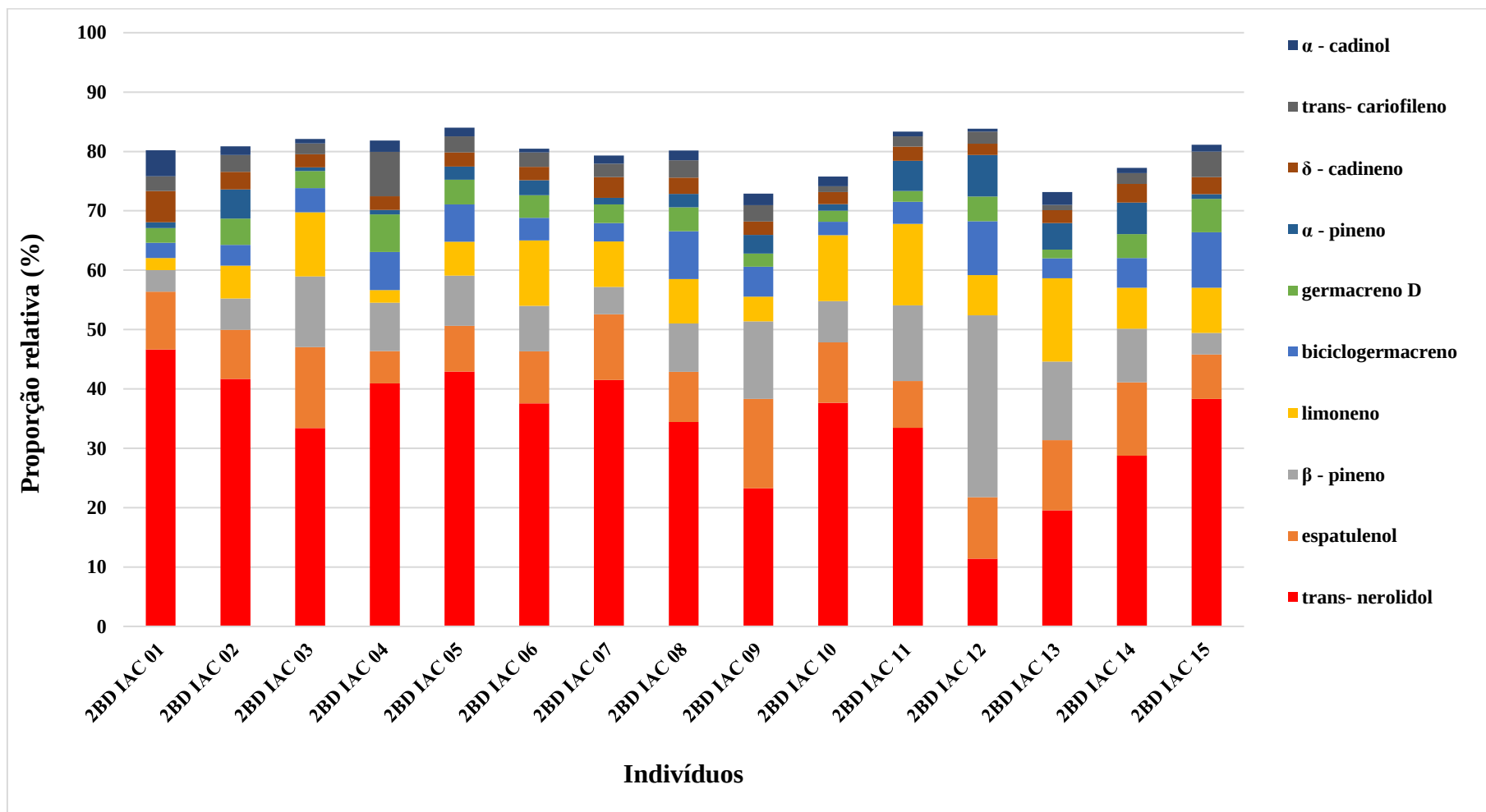


Figura 10: Proporção relativa média dos constituintes majoritários dos óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia*, estação chuvosa (segunda coleta); Águas de Santa Barbara - SP

A seguir a estrutura química das 10 substâncias majoritárias dos óleos essenciais para o período seco e chuvoso (Figura 11).

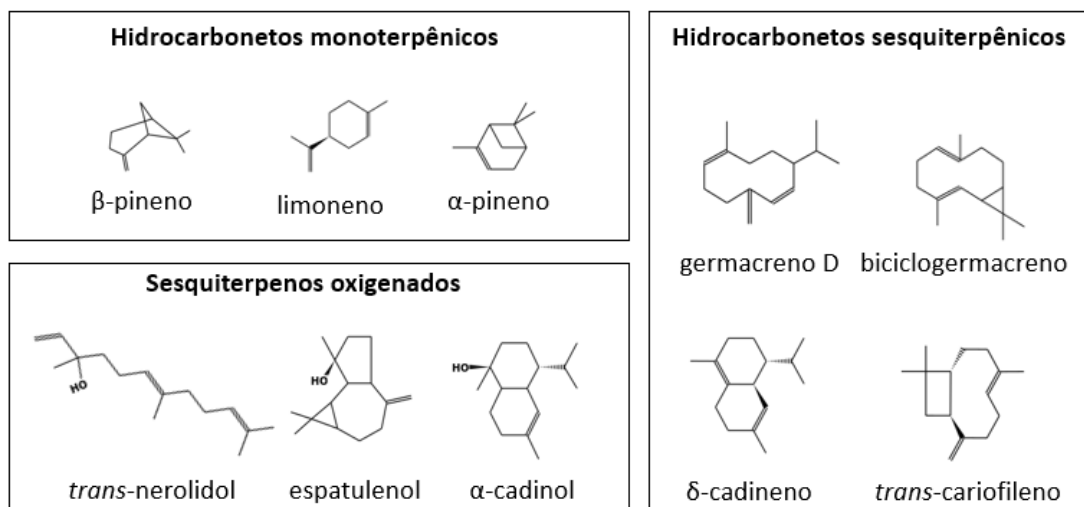


Figura 11: Dez principais substâncias encontradas nos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* coletadas no período de seca e no período chuvoso; Águas de Santa Barbara – SP.

Para compreender melhor as divergências da composição química dos óleos essenciais entre os indivíduos de *B. dracunculifolia*, foi empregada a análise de componentes principais (ACP). Gráficos bidimensionais de *scores* e *biplot* para a estação de seca são apresentados (Figura 12). Em conjunto, as duas componentes principais explicam cerca de 29,3% da variação dos dados onde é possível observar a separação de alguns indivíduos dos demais com destaque para 1BD IAC 11 e 1BD IAC 12

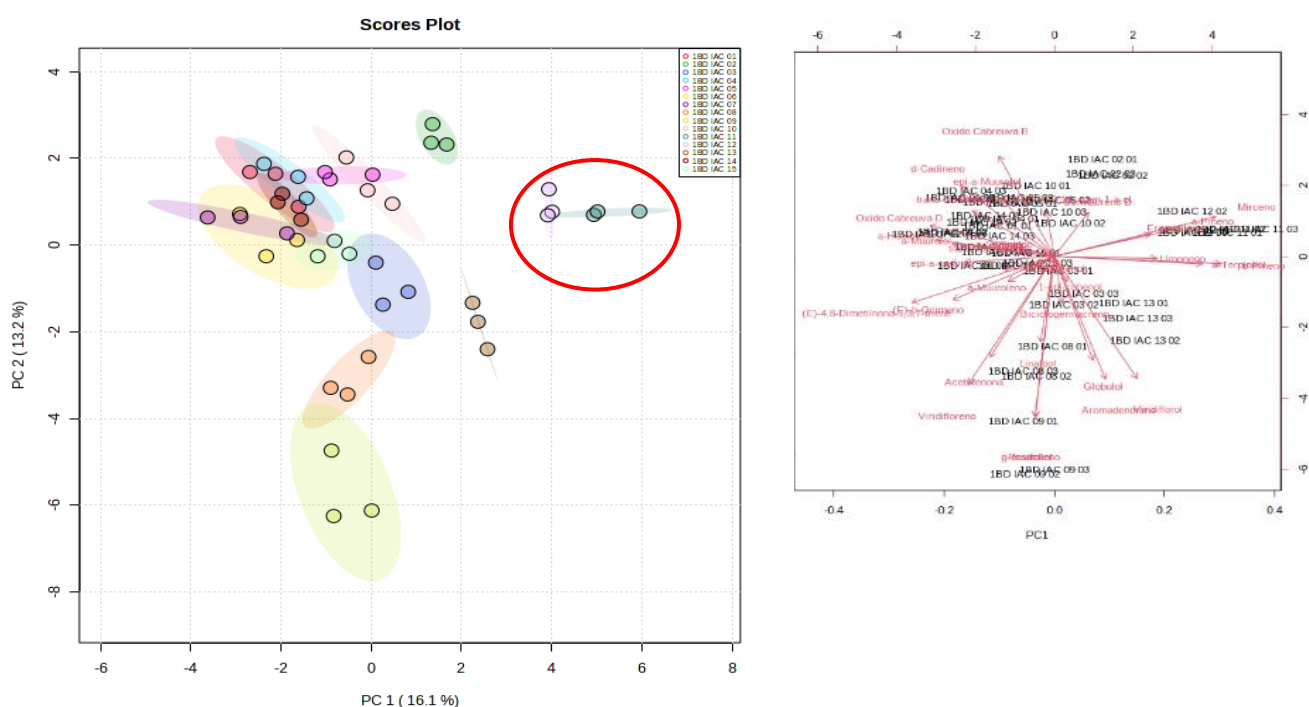


Figura 12: Gráficos da análise de componentes principais (ACP), com gráfico de *scores* e gráfico *biplot* em função da composição química dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados na estação seca, Águas de Santa Barbara – SP.

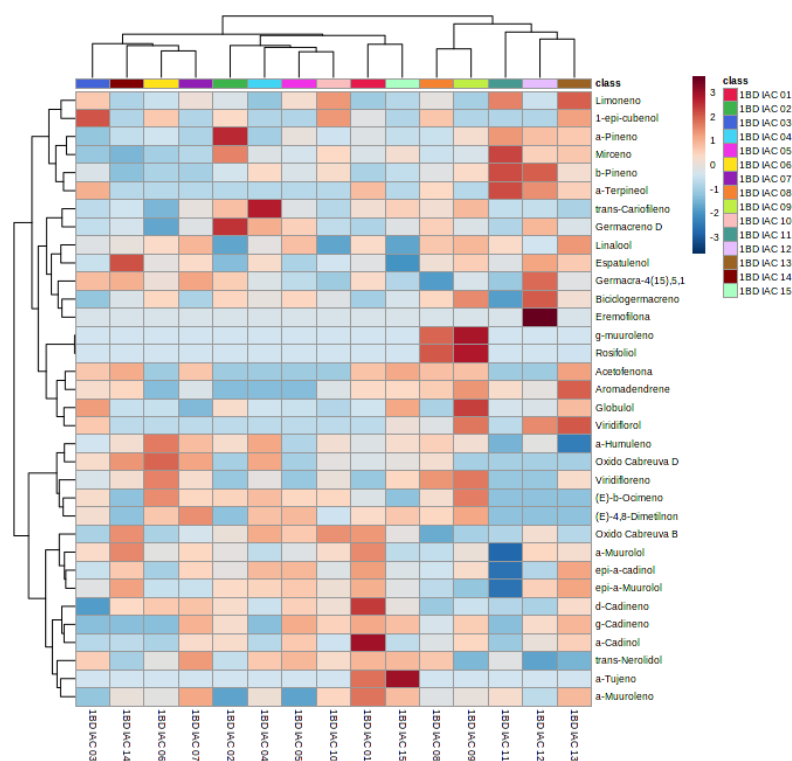


Figura 14: Mapa de Calor (Heatmap) com base na composição química dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* da coleta na estação seca (primeira coleta), Águas de Santa Barbara – SP.

Para a estação chuvosa (segunda coleta) as duas componentes principais (PC1 e PC 2) explicaram 31,4% da variação dos dados da composição química dos óleos essenciais (Figura 14). É possível observar a separação dos indivíduos 2BD IAC 10; 2BD IAC 11; 2BD IAC 12 e 2BD IAC 13 dos demais.

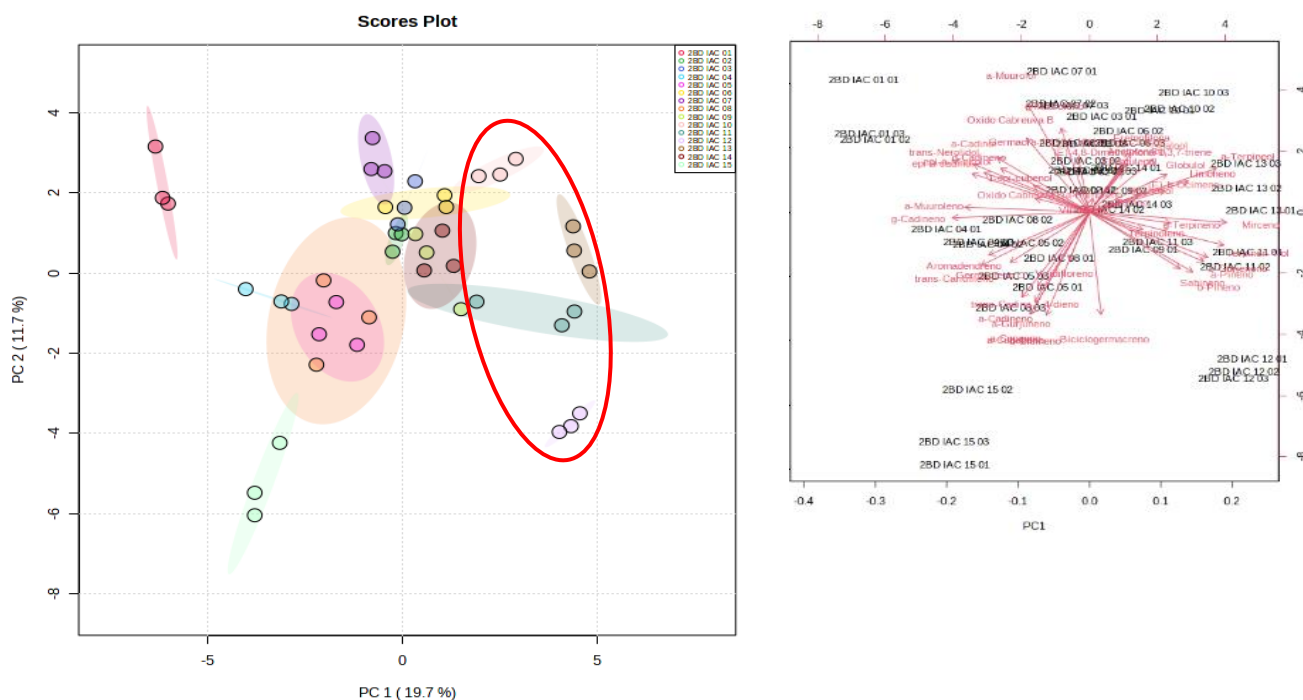


Figura 15: Gráficos da análise de componentes principais (ACP), com gráfico de scores e gráfico biplot em função da composição química dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados na estação chuvosa, Águas de Santa Barbara – SP.

A análise de agrupamentos hierárquicos (AAH) apresentou a formação de dois grupos com 30% de dissimilaridade, sendo o grupo I formado por 2BD IAC 10; 2BD IAC 11; 2BD IAC 12 e 2BD IAC 13 e o grupo II formado pelos demais indivíduos (Figura 16), indo de encontro ao que foi observado pela ACP acima (Figura 15). Tanto a AAH da primeira coleta quanto a AAH da segunda coleta mostraram a formação de agrupamentos, indicando diversidade química intraespecífica dos indivíduos da população independente das estações do ano (Figuras 12 e 15).

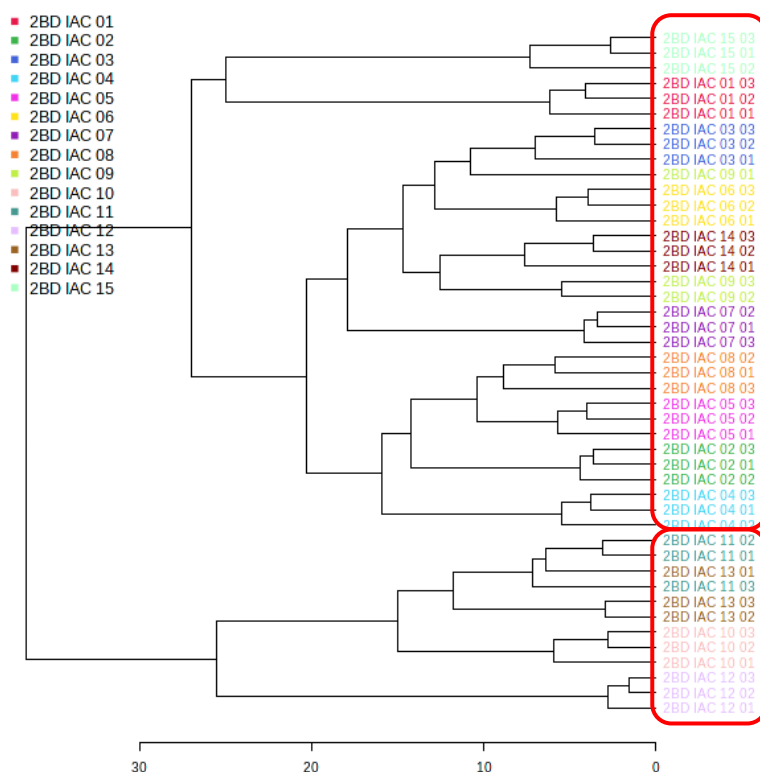


Figura 16: Análise de agrupamentos hierárquicos de acordo com a distância euclidiana dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados na estação seca, Águas de Santa Barbara – SP.

O mapa de calor (*Heatmap*) da segunda coleta indicou a formação de dois grupos, baseados na distância euclidiana, que os separa por dissimilaridade. O grupo I (a direita) é formado pelos indivíduos 2BD IAC 10; 11; 12; 13; 02; 07; 09; 14; 03 e 06 e o grupo II formado pelos indivíduos 2BD IAC 01, 15, 04, 05 e 08. As substâncias α -muuroleno, aromadendreno, viridifloreno, α -cadineno entre outras, contribuíram para a separação do grupo II (Figura 17).

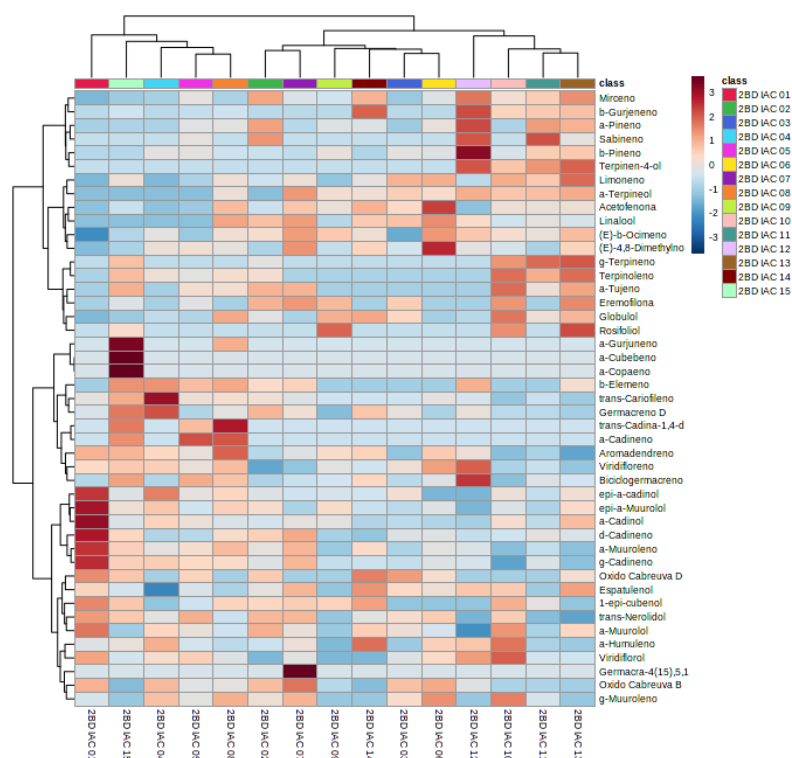


Figura 17: Mapa de Calor (Heatmap) com base na composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* da coleta na estação chuvosa (segunda coleta), Águas de Santa Barbara – SP.

Para observar se houve variação química entre os períodos de coleta, os dados das duas coletas foram submetidos a análise de agrupamentos hierárquicos (AAH). A análise AAH demonstrou a formação de dois agrupamentos com 50% de dissimilaridade, onde um dos grupos apresentou os indivíduos da segunda coleta, com exceção de 2BD IAC 01, e o segundo grupo os indivíduos da primeira coleta, com exceção de 1BD IAC 11, indicando que os períodos em que as plantas foram coletadas influenciaram a composição química dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* (Figura 18).

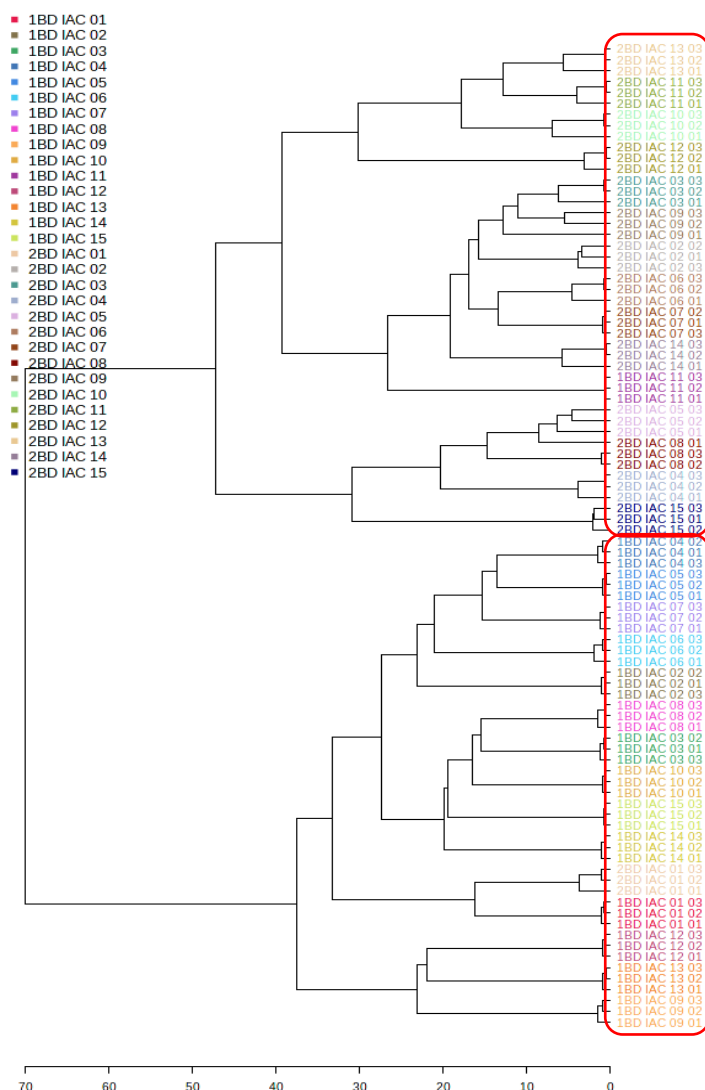


Figura 18: Análise de agrupamentos hierárquicos (AAH) de acordo com a distância Euclidiana dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados nas estações seca e chuvosa, Águas de Santa Barbara – SP.

O mapa de calor (*Heatmap*) contendo os indivíduos coletados das duas estações (seca e chuvosa), apresentou a formação de dois agrupamentos baseados na distancia euclidiana, que os separa por dissimilaridade, onde o grupo I possui o indivíduo 2BD IAC 01 e os demais da primeira coleta, com exceção de 1BD IAC 15 e 1BD IAC 11, os quais estão presentes no Grupo II com os demais indivíduos da segunda coleta. Tais resultados indicam que a sazonalidade interferiu na composição química dos óleos essenciais dos indivíduos da população, separando-os de acordo com o período de coleta. No primeiro agrupamento (a esquerda), é possível observar que os indivíduos possuem uma maior similaridade entre si devido as substancias óxido de cabreuva B, *epi- α -cadinol*, *epi- α -muurolol*, *α -cadinol*, δ -cadineno, entre outros, no segundo agrupamento (a direita), é possível observar uma maior similaridade entre os indivíduos devido a substâncias como o *α -tujeno*, *eremofilona*, *terpinoleno*, *mirceno*, *terpinen-4-ol*, entre outras (Figura 19).

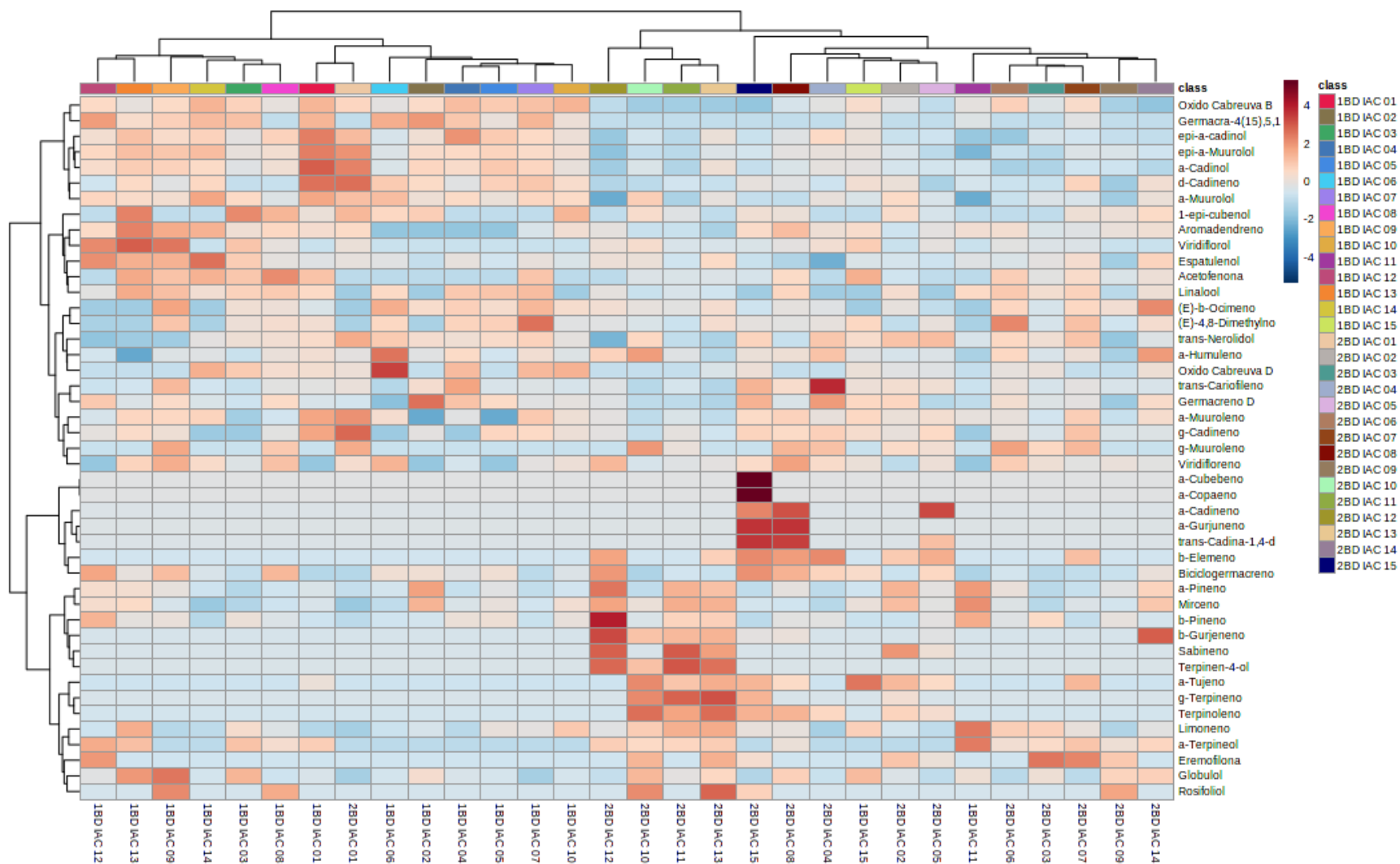


Figura 19: Mapa de calor (*Heatmap*) com base na composição química dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados nas estações seca e chuvosa, Águas de Santa Barabara – SP.

3.5.4. Composição química dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CG×CG-EM)

A partir da técnica de cromatografia bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CG×CG-EM) foi possível detectar e identificar um maior número de substâncias nos óleos essenciais para cada indivíduo. Para a técnica unidimensional (CG-EM) o número de substâncias identificadas nos óleos essenciais, nas duas estações do ano, variou de 19 a 39, enquanto na bidimensional (CG×CG-EM) esse número variou de 57 a 68 substâncias (Figura 20).

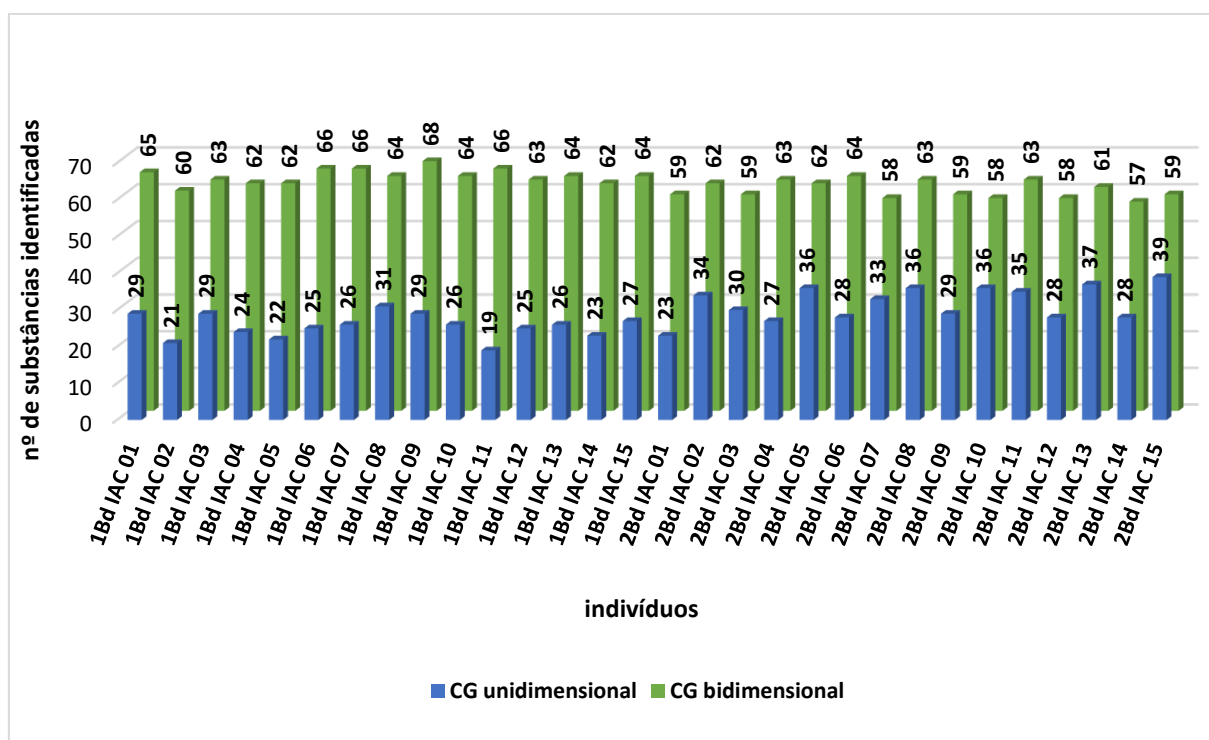


Figura 20: Número de substâncias identificadas nos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* por Cromatografia gasosa unidimensional (1D-CG) e bidimensional (2D-CG) nas estações seca e chuvosa; Águas de Santa Barbara – SP.

A Figura 21 ilustra o maior poder de resolução da cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG × CG) frente a cromatografia gasosa unidimensional (1D-CG). Nela é possível observar que picos sobrepostos na 1D-CG foram resolvidos na segunda dimensão da 2D-CG. As substâncias β -elemeno e aromadendreno, que aparecem como um único pico na 1D-CG foram desdobradas em dois picos na 2D-CG, sendo possível identificar as substâncias β -cubebeno e óxido de cabreuva A, revelando um ganho na resolução devido ao aumento da capacidade de pico que a cromatografia gasosa bidimensional proporcionou.

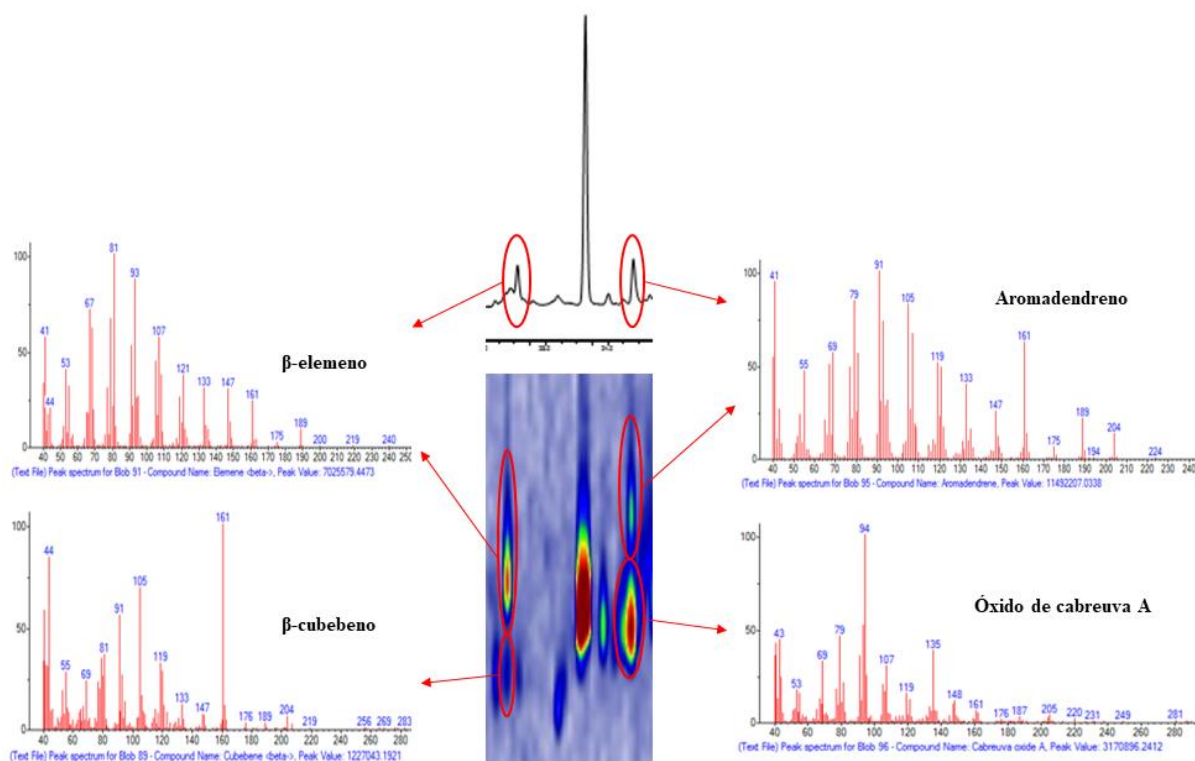


Figura 21: Exemplo de picos das substâncias β -elemeno, aromadendreno, β -cubebeno e óxido de cabreuva A do óleo essencial de *B. dracunculifolia* coeluidas na primeira dimensão (1D) e resolvidos na segunda dimensão (2D).

A composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados nas estações seca e chuvosa esta demonstrada nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. As substâncias identificadas somente por CG $\times$ CG- EM foram destacadas em negrito.

Tabela 4: Composição química (%) dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia*, coletados na estação seca, obtida por meio de cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CGxCG-EM)

n°	Substância	IRL exp.	IRL Lit	1Bd IAC 01	1Bd IAC 02	1Bd IAC 03	1Bd IAC 04	1Bd IAC 05	1Bd IAC 06	1Bd IAC 07	1Bd IAC 08	1Bd IAC 09	1Bd IAC 10	1Bd IAC 11	1Bd IAC 12	1Bd IAC 13	1Bd IAC 14	1Bd IAC 15
1	α -tujeno	928	924	0,10	0,39	0,03	0,57	0,34	0,08	0,33	0,26	0,05	0,72	0,41	0,03	0,36	tr	0,49
2	α -pineno	936	932	1,46	4,16	0,46	1,29	2,53	2,01	1,17	1,94	3,48	1,87	7,02	2,24	2,83	1,29	1,04
3	canfeno	956	946	tr	0,05	0,02	0,02	0,05	0,07	tr	0,03	0,10	0,03	0,13	0,04	0,03	tr	tr
4	sabineno	978	969	tr	tr	tr	0,11	0,19	0,11	0,14	0,07	0,18	0,15	0,13	tr	tr	0,09	0,03
5	β -pineno	983	974	4,97	5,91	7,11	7,72	8,42	5,51	6,30	6,85	13,90	9,03	13,37	17,99	7,82	4,27	5,83
6	mirreno	992	989	0,99	2,51	0,35	0,77	0,97	0,51	1,19	0,70	1,45	1,38	2,17	1,71	1,55	1,02	1,55
7	2-pentil-furano	992	990	tr	tr	tr	tr	tr	0,02	tr	0,03	tr	tr	0,03	tr	0,02	tr	0,04
8	α-felandreno	1010	1002	0,03	tr	tr	tr	0,06	0,02	tr	tr	0,02	0,04	0,03	0,02	tr	tr	0,06
9	δ-3-careno	1014	1008	0,11	tr	0,18	tr	0,12	0,13	0,32	0,19	0,24	0,04	tr	0,02	0,18	0,04	0,07
10	α-terpineno	1021	1014	0,07	0,04	0,03	0,14	0,11	0,10	0,14	0,05	0,14	0,18	0,03	0,07	0,13	0,12	0,13
11	orto-cimeno	1029	1022	0,68	0,14	0,03	0,18	0,76	0,16	0,29	0,13	0,12	0,22	0,15	tr	0,18	0,08	0,27
12	limoneno	1033	1024	2,43	4,84	7,41	3,72	8,11	5,76	8,81	7,88	5,06	13,45	15,82	4,32	12,1	4,3	11,15
13	<i>trans</i> - β -ocimeno	1048	1044	0,45	0,69	0,73	0,87	0,60	0,90	0,71	0,64	0,91	0,61	0,86	0,46	0,68	0,65	0,52
14	fenilacetaldéido	1055	1045	0,06	tr	0,15	0,09	0,36	0,11	0,12	0,32	0,29	0,12	0,46	tr	0,33	0,22	0,11
15	γ -terpineno	1062	1054	0,21	0,20	0,19	0,42	0,26	0,14	0,17	0,20	0,19	0,40	0,68	0,22	0,41	0,19	0,5
16	acetofenona	1079	1059	0,81	0,40	0,85	0,35	0,52	0,77	0,71	1,31	0,86	0,42	0,89	0,47	1,17	0,98	1,17
17	terpinoleno	1093	1086	0,35	0,38	0,17	0,56	0,31	0,11	0,22	0,19	0,15	0,45	0,57	0,17	0,43	0,1	0,57
18	linalool	1104	1095	0,69	0,54	0,42	0,80	0,74	0,98	1,85	0,70	1,29	0,61	0,56	0,49	0,99	0,92	0,33
19	<i>trans</i> -4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno	1118	1113	0,73	0,59	0,62	0,57	0,62	0,62	0,93	0,63	1,01	0,58	0,61	0,52	0,51	tr	0,85
20	pinocarvona	1173	1160	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,05	tr	tr	tr	tr
21	terpinen-4-ol	1187	1174	0,43	0,36	0,21	0,32	0,29	0,73	0,24	0,17	0,36	0,32	0,61	0,38	0,34	0,4	0,35
22	α -terpineol	1202	1186	0,55	0,21	0,69	0,45	0,40	0,66	0,69	0,50	0,73	0,58	1,20	0,63	0,52	0,64	0,38
23	metil-citronelato	1261	1257	tr	0,07	tr	tr	tr	0,03	tr	0,03	tr	tr	0,10	0,08	0,03	tr	tr
24	teaspirano	1326	1299	tr	tr	0,03	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,02	0,03	tr	0,09	tr	tr
25	(3E)-hexenil tiglat	1330	1315	0,06	0,12	tr	0,14	0,03	tr	0,08	tr	tr	tr	0,09	tr	tr	tr	tr
26	δ-elemeno	1347	1335	0,04	0,03	0,05	tr	0,04	tr	tr	0,03	0,02	tr	tr	0,03	0,03	0,03	0,07
27	α-cubebeno	1358	1348	0,04	0,05	0,05	0,06	0,10	0,06	0,06	0,04	0,06	tr	0,07	0,03	0,12	0,08	0,1
28	etil-hidrocinnamato	1360	1352	0,07	0,04	tr	tr	0,05	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,05	0,06
29	α-ylangeno	1384	1373	0,13	0,03	0,05	0,08	0,02	0,03	0,03	0,08	0,04	0,13	0,04	0,09	0,07	0,05	0,09
30	α-copaeno	1388	1374	0,13	0,09	0,13	0,08	0,14	0,13	0,15	0,07	0,42	0,17	0,13	0,08	0,07	0,11	0,14
31	<i>trans</i>-β-damascenone	1398	1383	0,04	0,04	0,02	0,07	0,02	0,05	0,03	0,05	0,10	0,03	0,03	0,07	0,04	0,06	0,03
32	β-cubebeno	1402	1389	tr	0,07	0,09	0,04	0,03	0,07	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	tr	tr	tr	tr
33	β-elemeno	1402	1389	0,26	0,15	tr	0,07	0,17	0,19	0,20	0,10	0,27	0,19	0,15	0,24	0,11	0,18	0,22
34	metil-eugenol	1417	1403	tr	tr	0,06	0,05	0,03	tr	0,02	tr	0,03	0,02	tr	tr	tr	tr	tr
35	α-gurjuneno	1424	1409	0,12	0,05	0,03	0,05	0,06	0,03	0,16	0,07	0,14	0,13	0,19	0,19	0,22	0,11	0,14
36	<i>trans</i> -cariofileno	1434	1417	1,88	2,67	1,29	4,50	1,35	1,24	1,40	1,85	3,53	1,29	1,29	1,33	1,56	1,45	2,48
37	β-copaeno	1444	1430	0,10	0,06	0,05	0,06	0,35	0,12	0,17	0,18	0,26	0,10	0,07	0,15	0,13	0,2	0,11
38	aromadendreno	1454	1439	0,59	0,43	0,71	0,10	0,57	0,39	0,50	1,07	1,64	0,79	0,85	0,97	1,7	1,24	0,96
39	óxido cabreuva A	1456	1444	0,11	0,13	0,08	0,62	0,13	0,22	0,20	0,15	0,13	0,23	0,17	0,13	tr	0,29	0,07
40	guaia-6,9-dieno	1461	1447	0,05	tr	0,05	0,07	0,05	tr	0,04	0,06	0,05	0,04	0,05	0,07	0,06	tr	tr
41	<i>trans</i>-muurola-3,5-dieno	1466	1451	0,10	0,09	0,04	0,06	0,14	0,10	0,10	0,05	0,17	0,11	0,07	0,06	0,03	0,09	0,08
42	α -humuleno	1468	1452	0,36	0,63	0,71	1,17	0,60	0,83	0,63	1,07	0,64	tr	0,73	0,60	0,66	0,47	0,75
43	alloaromadendreno	1471	1458	0,05	tr	tr	0,02	tr	tr	0,07	tr	0,13	0,72	0,07	0,13	tr	tr	tr
44	óxido cabreuva B	1473	1462	1,70	1,40	1,23	1,12	1,12	1,54	1,35	0,42	1,32	1,44	0,64	1,05	0,54	2,14	1,01
45	9-epi-<i>trans</i>-cariofileno	1478	1464	0,17	0,10	0,06	0,05	0,11	0,07	0,17	0,24	0,35	0,08	0,09	0,15	0,14	0,31	0,14
46	óxido cabreuva C	1478	1466	0,10	0,10	0,06	0,09	tr	0,10	0,11	tr	0,09	0,14	tr	0,04	0,07	0,24	0,11
47	γ-gurjuneno	1488	1475	0,15	0,12	0,14	0,06	0,10	0,08	0,21	0,07	0,23	0,11	0,08	0,12	0,07	0,19	0,06
48	γ -muuroleno	1490	1478	0,63	0,33	0,19	0,17	0,35	0,29	0,49	0,42	0,74	0,47	0,20	0,39	0,54	0,61	0,5

n°	Substância	IRL exp.	IRL Lit	1Bd IAC 01	1Bd IAC 02	1Bd IAC 03	1Bd IAC 04	1Bd IAC 05	1Bd IAC 06	1Bd IAC 07	1Bd IAC 08	1Bd IAC 09	1Bd IAC 10	1Bd IAC 11	1Bd IAC 12	1Bd IAC 13	1Bd IAC 14	1Bd IAC 15
49	óido cabreuva D	1490	1479	1,20	0,94	1,02	0,96	0,68	1,05	0,94	0,44	0,81	0,97	0,48	0,78	0,39	1,51	0,89
50	germacreno D	1498	1480	2,04	4,46	1,68	3,43	3,05	4,02	2,33	3,28	3,11	2,98	1,10	2,24	1,84	1,66	2,55
51	β-selineno	1503	1489	0,14	tr	0,05	tr	tr	0,03	0,10	0,04	0,15	0,04	tr	0,09	0,24	0,18	0,08
52	α-vetispireno	1505	1489	tr	tr	0,02	0,11	0,03	0,02	0,03	tr	0,19	0,08	0,04	0,13	0,15	0,06	0,03
53	viridifloreno	1510	1496	0,28	0,28	0,55	0,34	0,57	0,30	0,17	1,26	1,25	0,52	0,70	1,04	0,81	0,96	0,61
54	biciclogermacreno	1513	1500	4,22	6,61	3,34	4,30	4,50	3,17	3,12	6,46	8,10	3,70	1,88	8,66	5,57	4,75	7,12
55	δ-amorfenol	1521	1511	0,16	0,11	0,26	0,18	0,20	0,28	0,11	0,21	0,20	0,14	0,13	0,19	0,1	0,18	0,2
56	γ-cadineno	1531	1513	0,64	0,37	0,28	0,52	0,59	0,25	0,46	0,43	0,50	0,47	0,24	0,03	0,09	0,06	0,53
57	δ-cadineno	1536	1522	3,55	2,48	1,37	2,19	2,93	1,55	2,76	1,91	2,35	2,55	2,11	1,59	2,91	2,33	2,37
58	trans-calameneno	1538	1528	0,08	0,05	0,03	tr	tr	0,02	0,05	tr	0,18	tr	tr	tr	0,2	0,08	0,05
59	α-cadineno	1554	1537	0,09	tr	tr	tr	0,25	0,09	0,14	0,15	0,16	0,12	0,07	0,14	0,12	0,08	tr
60	α-calacoreno	1562	1544	0,12	0,02	0,13	0,03	tr	tr	0,06	0,23	0,43	0,05	0,12	0,40	0,28	0,98	0,09
61	<i>trans</i> -nerolidol	1574	1561	36,72	29,11	33,50	35,55	34,08	39,45	33,66	32,09	14,40	27,38	23,23	13,38	15,89	24,96	29,26
62	β-calacoreno	1582	1564	0,04	tr	tr	tr	tr	0,21	0,22	0,24	0,15	0,12	tr	0,12	0,23	0,24	tr
63	palustrol	1587	1567	0,53	0,42	0,92	0,12	0,25	0,20	0,73	0,36	0,88	0,26	0,29	0,77	0,87	0,38	0,4
64	espatulenol	1600	1577	5,07	5,23	7,96	6,17	5,26	6,76	8,28	5,72	3,75	6,93	7,12	13,35	9,15	17,3	6,41
65	óxido cariofileno	1605	1582	0,41	tr	tr	1,62	0,43	0,43	tr	0,40	tr	tr	0,46	tr	tr	0,17	0,5
66	cubeban-11-ol	1616		0,18	0,16	0,02	0,61	tr	0,74	0,77	0,23	0,32	0,08	0,10	1,07	0,22	0,36	0,14
67	rosifoliol	1624	1600	0,26	0,29	0,97	0,08	tr	0,23	0,17	0,27	2,00	0,13	0,14	0,22	0,23	0,54	0,34
68	1,10-di-epi-cubebol	1634	1618	0,12	0,19	0,06	0,14	0,19	0,22	0,36	0,10	0,24	0,24	0,08	0,23	tr	0,18	0,08
69	eremoligenol	1642	1629	0,32	0,35	0,19	0,07	tr	0,21	0,14	0,40	0,49	0,24	0,21	0,36	0,17	0,29	0,15
70	epicubebol	1647	1627	0,53	0,10	0,64	0,28	0,30	0,33	0,30	0,35	0,28	tr	0,50	0,07	0,66	0,26	0,29
71	cubebol	1653	1642	0,19	0,27	0,26	0,22	0,34	0,28	0,20	tr	0,27	0,19	tr	0,04	0,04	0,06	0,12
72	α-muurolol	1661	1644	3,60	2,02	1,79	2,57	1,54	0,38	0,43	0,78	2,42	1,03	0,25	1,51	2,47	0,67	1,68
73	α-cadinol	1674	1652	5,62	3,61	2,40	2,89	3,24	1,63	2,73	1,83	0,44	1,64	1,36	2,97	3,33	0,57	2,44
74	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	1711	1685	tr	0,63	1,46	tr	0,31	2,17	0,44	0,37	0,80	0,65	0,31	0,30	0,78	1,06	0,35
75	eremofilona	1760	1734	0,12	0,40	0,18	0,37	0,17	0,17	0,16	0,12	0,06	0,15	0,33	0,32	0,36	0,29	0,07
Hidrocarbonetos monoterpênicos				11,85	19,31	16,71	16,37	22,83	15,63	19,79	19,16	25,99	28,57	41,40	27,29	26,72	12,15	22,25
Monoterpenos oxigenados				3,32	2,29	2,97	2,72	2,96	3,90	4,62	3,66	4,54	2,65	4,60	2,57	3,98	3,16	3,19
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				16,23	19,36	11,43	17,86	16,40	13,41	13,79	19,45	25,46	15,05	10,52	19,21	17,86	16,55	19,56
Sesquiterpenos oxigenados				56,80	45,35	52,74	53,48	48,04	56,32	51,19	44,27	28,85	41,82	35,67	36,71	35,40	51,51	44,31
Não identificados				11,80	13,69	16,15	9,57	9,77	10,74	10,61	13,46	15,16	11,91	7,81	14,22	16,04	16,63	10,69
Total Identificado				88,20	86,31	83,85	90,43	90,23	89,26	89,39	86,54	84,84	88,09	92,19	85,78	83,96	83,37	89,31

IRLexp. = índice de retenção linear experimental; IRL. Lit = índice de retenção linear da literatura (Adams, 2017); tr = traços (<0,005%)

Tabela 5: Composição química (%) dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia*, coletados na estação chuvosa, obtida por meio de cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CGxCG-EM)

Nº	Substâncias	IRL exp.	IRL Lit	2Bd IAC 01	2Bd IAC 02	2Bd IAC 03	2Bd IAC 04	2Bd IAC 05	2Bd IAC 06	2Bd IAC 07	2Bd IAC 08	2Bd IAC 09	2Bd IAC 10	2Bd IAC 11	2Bd IAC 12	2Bd IAC 13	2Bd IAC 14	2Bd IAC 15
1	α -tujeno	928	924	0,45	0,36	0,02	0,22	0,36	0,14	0,49	0,25	0,03	0,60	0,39	0,09	0,59	0,04	0,5
2	α -pineno	936	932	3,85	4,39	0,53	0,77	2,71	2,99	1,27	1,86	2,32	1,23	6,09	5,49	5,96	4,63	0,96
3	canfeno	953	946	0,09	0,03	0,06	tr	0,05	0,08	0,05	0,06	0,04	0,03	0,05	0,14	0,09	0,1	tr
4	sabineno	975	969	0,17	0,39	tr	0,16	0,19	0,14	0,15	tr	tr	0,07	0,53	tr	0,33	tr	0,09
5	β -pineno	981	974	8,67	6,39	11,59	10,03	8,37	9,74	3,78	9,60	12,28	5,54	13,85	28,68	14,1	11,62	2,92
6	mirreno	989	988	1,39	2,94	0,50	0,87	1,15	1,47	0,85	1,47	1,33	1,05	2,85	2,49	2,82	2,73	0,72
7	α-felandreno	1007	1002	tr	0,02	tr	tr	tr	0,04	tr	0,02	tr	0,03	0,05	tr	0,04	0,04	tr
8	δ-3-careno	1014	1008	0,19	tr	0,19	tr	0,08	0,23	0,37	0,18	0,27	0,03	tr	0,05	0,1	0,13	0,05
9	α-terpineno	1019	1014	0,19	0,13	tr	0,09	0,11	0,23	0,13	0,08	0,08	0,09	0,17	0,17	0,21	0,12	0,11
10	orto-cimeno	1026	1022	0,05	0,22	tr	0,12	0,08	0,25	0,16	0,14	tr	tr	0,11	tr	0,19	tr	0,07
11	limoneno	1031	1024	4,68	5,31	9,27	2,43	7,56	14,03	8,97	7,03	3,87	11,86	17,49	6,72	18,99	7,3	8,34
12	<i>trans</i> - β -ocimeno	1045	1032	0,73	0,47	0,54	0,52	0,43	0,88	0,83	0,60	1,10	0,55	0,41	0,87	0,61	1,68	0,36
13	fenilacetaldéido	1055	1036	0,14	0,22	tr	tr	0,10	0,23	0,09	0,16	tr	0,20	0,13	tr	0,4	0,13	0,04
14	γ -terpineno	1060	1054	0,30	0,36	0,12	0,38	0,21	0,29	0,29	0,33	0,30	0,42	0,38	0,44	0,38	0,28	0,26
15	acetofenona	1079	1059	0,34	0,33	0,41	0,07	0,29	1,28	0,65	0,65	0,40	0,25	0,22	0,31	0,4	0,79	0,28
16	terpinoleno	1090	1086	0,34	0,34	0,16	0,33	0,30	0,16	0,20	0,36	0,21	0,52	0,29	0,31	0,42	0,18	0,37
17	linalool	1102	1095	0,55	0,38	0,26	0,23	0,21	1,82	0,90	0,36	0,99	0,29	0,29	0,23	1,18	0,59	0,12
18	<i>trans</i> -4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno	1116	1113	0,61	0,59	0,46	0,70	0,64	0,97	0,63	0,73	0,43	0,40	0,41	0,37	0,41	0,58	0,48
19	terpinen-4-ol	1184	1174	0,13	0,16	0,21	0,14	0,19	0,67	0,12	0,34	0,39	0,23	0,51	0,46	0,36	0,47	0,09
20	α -terpineol	1198	1186	0,39	0,07	0,39	0,09	0,32	0,76	0,68	0,54	0,79	0,47	0,41	0,52	0,64	0,54	0,11
21	metil nerolato	1280	1280	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,06	tr	tr	tr	tr	tr	tr
22	δ-elemeno	1344	1335	0,06	0,04	0,05	0,07	0,15	0,10	0,08	0,07	0,12	0,06	0,04	0,11	0,07	0,1	0,16
23	α -cubebeno	1356	1348	0,08	0,24	0,13	0,24	0,23	0,22	0,10	0,15	0,15	0,10	0,13	0,13	0,15	0,19	0,2
24	α-ylangeno	1379	1373	0,05	0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	tr	0,11	0,05	0,06	0,04	0,1	0,04	0,1	tr
25	α -copaeno	1384	1374	0,11	0,21	0,21	0,33	0,15	0,27	0,25	0,20	0,32	0,09	0,10	0,24	0,03	0,25	0,35
26	β-bourboneno	1393	1387	tr	0,05	0,11	0,05	0,07	0,02	0,11	0,01	0,07	0,03	0,01	0,13	tr	0,07	0,07
27	β-cubebeno	1398	1387	tr	0,07	tr	0,02	tr	0,01	tr	0,05	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
28	β -elemeno	1398	1389	0,23	0,24	0,32	0,53	0,23	0,30	0,22	0,47	0,36	0,14	0,08	0,45	0,17	0,37	0,44
29	β-longipineno	1410	1400	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,02	tr	0,21	tr
30	metil-eugenol	1415	1403	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,06	tr	tr	tr	tr	tr	tr
31	α -gurjuneno	1420	1409	0,12	0,05	0,18	0,10	0,11	0,07	0,12	0,28	0,22	0,07	0,07	0,3	0,12	0,24	0,17
32	<i>trans</i> -cariofileno	1429	1417	1,96	1,99	1,56	6,74	2,45	1,84	2,14	2,59	2,63	0,93	1,40	2,2	0,85	1,9	4,58
33	β-copaeno	1439	1430	0,07	0,12	0,23	0,33	0,16	0,25	0,15	0,32	0,29	0,09	0,11	0,39	0,14	0,31	0,21
34	α-guaieno	1444	1437	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,06	0,03	0,06	tr	tr
35	aromadendreno	1451	1439	0,52	0,62	1,01	1,17	0,92	0,95	0,90	1,79	1,52	0,62	1,00	2,54	1,01	1,43	1,51
36	óxido cabreuva A	1451	1444	tr	0,19	0,10	0,12	0,17	0,34	tr	tr	tr	0,16	tr	tr	tr	0,35	tr
37	guaia-6,9-dieno	1456	1447	0,05	0,05	0,05	tr	0,04	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
38	<i>trans</i> -muurola-3,5-dieno	1461	1451	0,06	0,09	0,07	0,06	0,05	0,07	0,17	0,06	0,06	0,02	0,07	0,07	0,08	0,08	0,12
39	α -humuleno	1466	1452	0,91	0,54	0,45	0,94	0,69	0,86	0,90	0,68	0,62	0,43	0,75	0,75	0,4	1,87	1,04
40	alloaromadendreno	1468	1458	0,03	tr	tr	0,09	0,14	0,33	0,04	tr	0,12	0,05	0,05	0,28	0,07	tr	0,11
41	óxido cabreuva B	1468	1462	0,58	1,00	0,96	0,52	0,41	1,44	0,85	0,54	0,64	1,27	0,25	0,72	0,47	0,17	0,36
42	óxido cabreuva C	1473	1466	0,17	0,08	0,05	0,04	tr	tr	0,25	0,04	0,04	tr	0,12	tr	0,16	tr	tr
43	9-epi-<i>trans</i>-cariofileno	1473	1466	0,05	0,25	0,13	0,14	tr	0,33	tr	0,30	0,15	tr	0,12	0,13	tr	tr	tr
44	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1483	1475	tr	0,13	0,05	0,07	tr	tr	tr	0,06	tr	0,01	0,08	tr	tr	tr	tr
45	γ-gurjuneno	1485	1475	tr	tr	tr	tr	0,08	tr	tr	tr	0,10	tr	0,32	tr	tr	0,1	tr
46	γ -muuroleno	1485	1478	0,34	0,49	0,31	0,59	0,30	0,79	0,60	0,67	0,51	0,30	tr	0,79	0,23	0,8	0,42
47	óxido cabreuva D	1485	1479	0,60	0,61	0,80	0,38	0,42	0,51	0,64	0,47	0,66	0,90	0,24	0,58	0,25	1,35	0,27
48	germacreno D	1493	1480	2,20	3,21	1,61	4,40	3,02	2,75	1,95	2,20	0,81	1,08	1,59	2,04	0,87	2,77	3,51

Nº	Substâncias	IRL Exp.	IRL Lit	2Bd IAC 01	2Bd IAC 02	2Bd IAC 03	2Bd IAC 04	2Bd IAC 05	2Bd IAC 06	2Bd IAC 07	2Bd IAC 08	2Bd IAC 09	2Bd IAC 10	2Bd IAC 11	2Bd IAC 12	2Bd IAC 13	2Bd IAC 14	2Bd IAC 15
49	β-selineno	1500	1489	3,87	tr	tr	0,10	0,18	0,09	0,24	0,30	0,14	tr	tr	0,32	0,06	0,16	0,2
50	cis-β-guaieano	1500	1492	tr	0,06	tr	0,13	0,18	0,06	tr	0,18	0,18	tr	0,11	0,19	0,02	0,06	tr
51	viridifloreano	1508	1496	tr	tr	0,77	0,68	tr	0,42	0,54	2,33	tr	tr	0,71	1,95	tr	tr	0,11
52	biciclogermacreno	1508	1500	tr	4,12	4,08	6,36	6,44	3,56	3,10	6,78	6,43	2,85	0,81	9,28	4,18	7,65	10,88
53	δ-amorfenos	1518	1511	0,21	0,27	0,18	0,05	0,13	0,23	0,30	0,11	0,18	0,21	0,13	0,11	0,12	0,21	0,18
54	γ-cadineno	1526	1513	0,95	0,62	0,24	0,73	0,89	0,37	1,00	0,57	0,57	0,48	0,60	0,67	0,62	0,8	0,86
55	δ-cadineno	1533	1522	3,98	2,51	1,56	2,37	2,77	2,00	3,63	2,23	1,74	1,86	2,53	2,25	2,79	3,16	3,19
56	trans-calameneno	1536	1528	tr	tr	tr	tr	0,02	tr	tr	tr	0,14	tr	tr	tr	tr	tr	tr
57	α-cadineno	1549	1537	0,26	0,13	0,40	0,13	0,16	0,25	0,24	0,06	tr	0,65	0,14	0,36	0,12	tr	0,13
58	α-calacoreno	1554	1544	0,05	0,03	0,11	tr	0,04	tr	0,07	tr	tr	tr	0,07	tr	0,06	0,06	0,06
59	trans-nerolidol	1567	1561	36,59	35,15	34,15	35,59	40,27	28,02	40,61	30,53	22,91	40,62	25,99	7,55	18,33	29,06	40,43
60	maaliol	1582	1566	0,19	0,66	0,22	0,24	0,18	0,19	tr	0,22	0,39	tr	0,08	tr	0,78	tr	0,1
61	palustrol	1582	1567	0,46	0,22	0,34	0,47	0,31	0,27	0,41	0,50	0,81	0,25	0,25	0,65	0,31	0,32	0,23
62	espatulenol	1595	1577	5,00	8,95	12,24	7,37	5,97	7,64	8,03	6,99	11,96	7,45	7,40	7,09	tr	tr	4,53
63	óxido cariofileno	1600	1582	0,65	0,41	0,22	0,32	0,37	0,24	0,60	0,31	0,58	0,21	0,20	0,41	0,44	tr	0,57
64	globulol	1611	1590	0,69	1,55	1,88	0,52	0,56	0,47	0,26	2,13	2,35	2,49	1,26	1,34	2,58	tr	1,89
65	cubeban-11-ol	1611	1590	tr	tr	tr	0,10	tr	tr	0,15	0,11	0,24	tr	tr	0,07	0,14	0,11	0,07
66	salvial-4(14)-en-1-ona	1611	1594	0,05	tr	0,06	0,13	tr	0,09	tr	tr	tr	0,07	tr	0,03	tr	0,04	0,04
67	viridiflorol	1618	1594	0,70	0,45	0,60	0,73	0,56	0,35	0,58	0,82	1,15	0,54	0,57	1,03	1,51	0,28	0,4
68	rosifoliol	1618	1600	0,08	0,05	0,14	0,23	0,17	0,21	0,42	0,32	0,07	0,36	0,13	0,06	0,24	0,38	0,12
69	epicubenol	1639	1627	0,55	0,38	0,34	0,18	0,11	0,17	0,27	0,27	0,23	0,04	0,04	0,25	0,19	0,14	0,05
70	muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	1642	1630	0,08	0,07	0,29	0,17	0,24	0,19	0,16	0,30	tr	0,14	0,30	0,04	0,23	0,2	0,28
71	t-muurolo	1658	1640	2,90	tr	0,47	1,84	1,21	0,58	1,35	1,35	1,35	1,28	0,72	0,42	0,61	1,01	0,41
72	cubenol	1658	1645	0,41	0,30	0,31	0,25	0,27	0,27	tr	0,38	0,30	0,53	0,29	tr	1,68	0,49	0,72
73	α-muurolo	1658	1645	tr	1,11	0,58	0,41	tr	0,17	0,31	0,15	tr	0,34	0,13	tr	0,28	0,22	0,08
74	α-cadinol	1668	1652	3,89	2,20	1,13	2,28	1,39	0,73	1,53	1,76	2,72	1,89	0,83	0,62	3,06	1,42	1,33
75	iso-biciclogermacrenal	1757	1733	0,50	0,45	0,34	0,10	0,21	0,10	0,32	0,08	0,36	0,26	0,11	0,1	0,27	0,2	0,15
Hidrocarbonetos monoterpênicos				21,10	21,35	22,98	15,92	21,60	30,67	17,54	21,98	21,83	22,02	42,66	45,45	44,83	28,85	14,75
Monoterpenos oxigenados				2,16	1,75	1,73	1,23	1,75	5,73	3,07	2,78	3,06	1,84	1,97	1,89	3,39	3,10	1,12
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				16,16	16,16	13,86	26,47	19,65	16,19	16,85	22,57	17,48	10,13	11,12	25,83	12,26	22,89	28,50
Sesquiterpenos oxigenados				53,49	53,22	54,42	51,61	52,40	41,47	56,10	46,80	46,16	57,90	38,67	20,38	31,28	34,39	51,76
Não identificados				6,49	6,90	6,21	4,39	4,18	5,43	5,80	5,40	10,81	7,21	5,34	5,87	7,99	9,42	3,60
Total Identificado				93,51	93,10	93,79	95,61	95,82	94,57	94,20	94,60	89,19	92,79	94,66	94,13	92,01	90,58	96,40

IRL exp. = índice de retenção linear experimental; IRL. Lit = índice de retenção linear da literatura (Adams, 2017); tr = traços (<0,005%)

A análise de componentes principais (Figura 21) da cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG×CG), com duas constituintes principais (PC1 e PC2) conseguiram explicar 29,6% da variação dos dados das estações coletadas, separando os períodos de coleta em dois agrupamentos bem definidos. De acordo com o gráfico de *loadings* da ACP as substâncias viridiflorol, *t*-muurolo, globulol e muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol contribuíram para a separação dos indivíduos da estação chuvosa (a direita), enquanto a eremofilona, α-muurolo, eremoligenol e *trans*-β-damascenona para a separação dos indivíduos da estação seca (a esquerda). Vale destacar ainda que, para a PC2, *trans*-nerolidol, terpinoleno, sabineno e α-tujeno contribuíram significativamente para a separação de indivíduos na parte superior do gráfico, enquanto β-pineno, β-copaeno, aromadendreno e γ-muurolo contribuíram para a separação dos indivíduos (Figura 21).

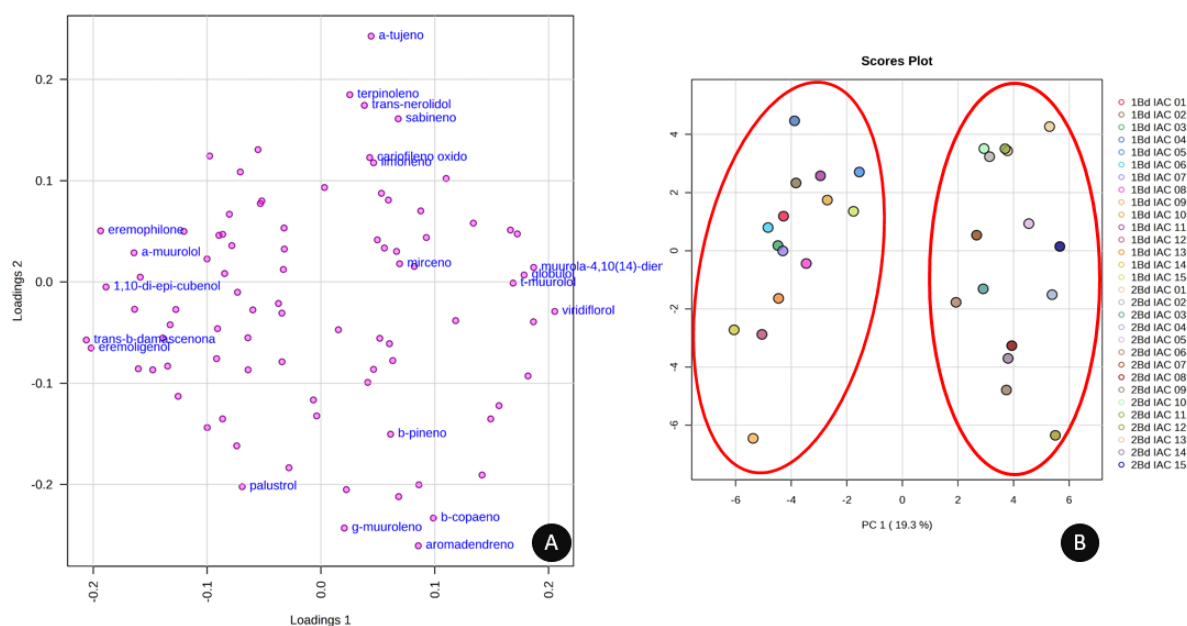


Figura 22: A) Gráficos de scores e loadings indicando as principais substâncias presentes nos agrupamentos de indivíduos formados; B) Análise de Componentes Principais (ACP) contendo PC1 (com 19,3%) e PC2 (com 10,3%), com um total de 29,6% da variação dos dados; (Estação seca e estação chuvosa).

O mapa de calor (*Heatmap*), contendo os indivíduos coletados nas estações seca e chuvosa apresentou a formação de dois agrupamentos, com base na distância euclidiana, que é uma medida de dissimilaridade, onde um deles apresentou todos os indivíduos da estação seca e o outro apresentou todos os indivíduos da estação chuvosa (Figura 23). As escalas de dissimilaridade desse *heatmap* variaram de -4 a 4, onde quanto mais próximo de 4, maior a afinidade do indivíduo com a substância. Portanto, é possível destacar que substâncias globulol, viridiflorol, maaliol, β -bourbureno, *iso*-biciclogermacreno, α -cubebeno, β -elemeno, *trans*- β -ocimeno, entre outras, apresentaram maior influência nos indivíduos coletados na estação chuvosa (21/03/2022), enquanto que substâncias eremofilona, α -muuroiolol, eremoligenol, *trans*- β -damascenona, etil-hidrocinnamato, 1,10-di-*epi*-cubenol, α -vestipireno, entre outras, apresentaram maior similaridade com os indivíduos coletados na estação seca (06/09/2021). A identificação de um maior número de substâncias nos óleos essenciais pela técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG×CG) contribuiu para a avaliação da influência das estações na composição química dos óleos essenciais da população de *B. dracunculifolia* coletada no município de Águas de Santa Barbara – SP. Os componentes ambientais influenciam na quantidade, qualidade e concentração dos metabólitos especializados. Portanto, as diferenças observadas na composição química dos óleos essenciais podem ser atribuídas, dentre outros fatores, a interação diferencial dos diferentes genótipos (indivíduos) com os fatores ambientais (luz, precipitação temperatura, etc) nas duas estações de coleta de *B. dracunculifolia*.

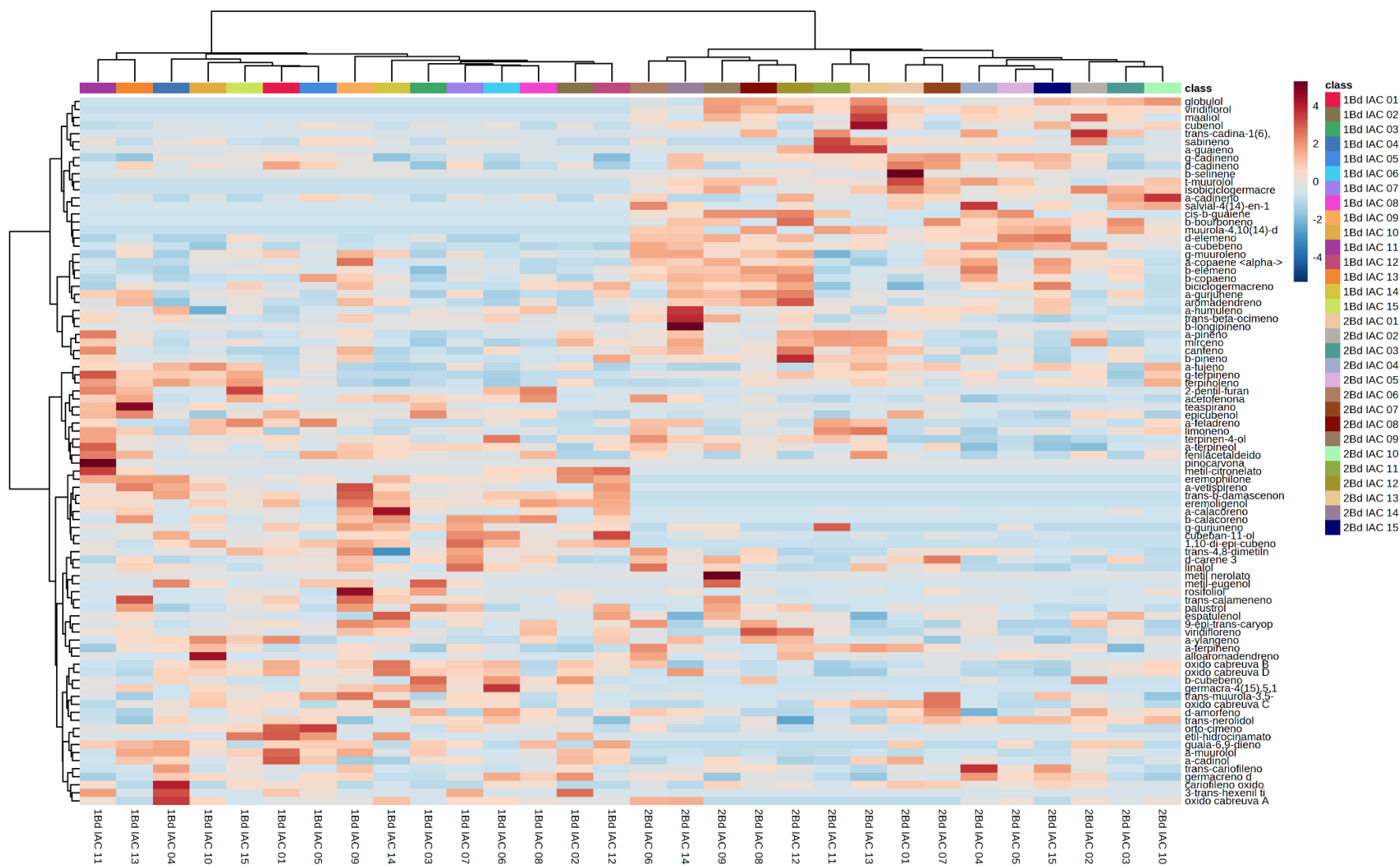


Figura 23: Mapa de calor (*Heatmap*) com base na composição química dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados nas estações seca e chuvosa, Águas de Santa Bárbara, SP.

3.6. CONCLUSÃO

As diferenças sazonais observadas no período de coleta influenciaram o rendimento dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, onde para a estação seca (primeira coleta) o rendimento médio foi menor do que na estação chuvosa (segunda coleta). Com exceção do indivíduo 12, os demais indivíduos apresentaram o *trans*-nerolidol como substância majoritária. Nota-se diversidade química intraespecífica na população para os mesmos períodos de coleta, visto que foi observada a presença de diferentes agrupamentos na ACP e AAH da primeira e segunda coleta. Ao comparar os dois períodos de coleta por meio de análises estatísticas multivariadas, constatou-se que a composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* também foi influenciada pela época de coleta, resultando na formação de dois grupos distintos na AAH e no *heatmap*. Vale ressaltar que a utilização da técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (CG×CG-EM) possibilitou uma maior identificação de substâncias e, consequentemente, uma melhor separação entre os períodos de coleta nas análises estatísticas multivariadas (ACP e *heatmap*).

3.7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Adams, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Texensis Publishing, 2017.
- Agostini, F.; Santos, A C. A.; Rossato, M.; Pansera, M. R.; Zattera, F.; Wasum, R.; Serafini, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil, 2005. Revista Brasileira de Farmacognosia, 15 (3), pp. 215-220.
- Budel, J.M., Duarte, M.D.R., Santos, C.D.M. and Farago, P.V., 2004. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. Acta Farm. Bonaerense, 23(4), pp.477-483.
- Belini, C. M. B. (2015). *Baccharis dracunculifolia* DC.(Asteraceae): Composição do óleo essencial, diversidade e parâmetros genéticos.
- Del Vitto, L.A. and Petenatti, E.M., 2009. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. Multequina, (18), pp.87-115.
- Del Vitto, L.A. and Petenatti, E.M., 2015. Asteráceas de importancia económica y ambiental Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. Multequina, (24), pp.47-74.
- Ferracini, V. L., Paraiba, L. C., Leitao Filho, H. F., Da Silva, A. G., Nascimento, L. R., & Marsaioli, A. J. (1995). Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. *Journal of Essential Oil Research*, 7(4), 355-367.

Frizzo, Caren D. et al. Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 23, n. 2, p. 99-106, 2008.

Gobbo-Neto, L. and Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, 30(2), pp.374-381

Massignani, J.J., Lemos, M., Maistro, E.L., Schaphauser, H.P., Jorge, R.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K. and de Andrade, S.F., 2009. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(10), pp.1355-1360

Moghaddam, Mohammad; Mehdizadeh, Leila. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: *Soft chemistry and food fermentation*. Academic Press, 2017. p. 379-419.

Nasa Power, 2018. Agroclimatology. National Aeronautics and Space Administration (NASA) Prediction of Worldwide Energy Resources (POWER). ACESSO EM: https://power.larc.nasa.gov/common/php/POWER_AboutAgroclimatology.php em Jan. 15, 2023.

Rehman, Rafia et al. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. *Food Reviews International*, v. 32, n. 2, p. 117-160, 2016.

Rigotti, M. (2011). *Baccharis dracunculifolia* DC: diversidade genética e química de populações.

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

Van Den Dool, H. A. N. D.; Kratz, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. 1963.

Verdi, L.G., Brighente, I.M.C. and Pizzolatti, M.G., 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química nova*, 28(1), pp.85- 94.

Xia, Jianguo et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic acids research*, v. 43, n. W1, p. W251-W257, 2015.

4. CAPITULO II

“Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* DC. contra *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*”

4.1. RESUMO

Baccharis dracunculifolia DC., conhecida como alecrim-do-campo, é uma planta encontrada em biomas Pampa, Mata Atlântica e Cerrado, e considerada a constituinte principal da própolis de *Apis mellifera*. Seus extratos e óleos essenciais possuem propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Com o intuito de avaliar o potencial antifúngico dos óleos essenciais desta planta contra fungos de interesse agrônômico, os óleos essenciais de indivíduos de uma população de *B. dracunculifolia*, coletados nas estações seca e chuva foram testados contra *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*. Para isso, foram coletados 15 indivíduos no município de Águas de Santa Barbara – SP. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, a composição química analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. A atividade antifúngica foi analisada em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) e emulsificante (Etherius), os óleos essenciais foram colocados nesta solução em concentrações iniciais de 2 mL/L. Em seguida os indivíduos que se sobressaíram (1BD02; 1BD05; 1BD06; 2BD06 e 2BD13) foram novamente testados em concentrações de 2; 4; 6 e 8 mL/L. Dos 30 óleos essenciais de *B. dracunculifolia* avaliados, o que apresentou a maior porcentagem de inibição contra *Aspergillus flavus*, foi o óleo essencial do indivíduo 2, amostra 1BD02 coletada na estação seca, com 25,30% na primeira observação. Para o fungo *F. graminearum*, foram os óleos essenciais do indivíduo 6, amostras 1BD06 e 2BD06 coletadas nas estações seca e chuvosa, respectivamente, atingindo 40,24% e 28,40% na primeira medição. Os óleos essenciais dos indivíduos 2, 5 e 13, amostras 1BD02, 1BD05, coletadas na estação seca, e 2BD13 na estação chuvosa inibiram o fungo *F. verticillioides* em 24,42%; 19,67% e 15,83% na primeira observação, respectivamente. Nas novas concentrações estudadas, os óleos essenciais 1BD02, 1BD06 e 2BD13 obtiveram porcentagens inibitórias de 29,58; 39,62 e 59,66% em concentrações de 8 mL/L contra os fungos *A. nomius*, *F. graminearum* e *F. verticillioides*, respectivamente. Tais resultados sugerem a importância do estudo dos indivíduos de uma população para a determinação dos mais promissores para determinado interesse. Novos estudos se fazem necessários para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e para testar a viabilidade destes óleos essenciais em campo, como um novo defensivo agrícola natural.

Palavras chave: Defensivo agrícola natural; atividade antifúngica; substâncias voláteis, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM); fungos filamentosos

4.2. ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia DC., commonly known as "alecrim-do-campo," is a plant found in the Pampa, Atlantic Forest, and Cerrado biomes and is considered the main constituent of *Apis mellifera* propolis. Its extracts and essential oils possess anti-inflammatory and antimicrobial properties. In order to evaluate the antifungal potential of the essential oils from this plant against agriculturally relevant fungi, the essential oils from individuals of a *B. dracunculifolia* population, collected during the dry and rainy seasons, were tested against *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum*, and *Fusarium verticillioides*. For this purpose, 15 individuals were collected in Águas de Santa Barbara – SP municipality. The essential oils were extracted by hydrodistillation, and their chemical composition was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The antifungal activity was assessed in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium and an emulsifier (Etherius). The essential oils were added to this solution at initial concentrations of 2 mL/L. Subsequently, the individuals that stood out (1BD02; 1BD05; 1BD06; 2BD06, and 2BD13) were tested again at concentrations of 2, 4, 6, and 8 mL/L. Among the 30 essential oils from *B. dracunculifolia* evaluated, the essential oil from individual 2, sample 1BD02, collected during the dry season, showed the highest inhibition percentage against *Aspergillus flavus*, with 25.30% in the first observation. For the fungus *F. graminearum*, the essential oils from individuals 6, samples 1BD06 and 2BD06, collected during the dry and rainy seasons, respectively, achieved 40.24% and 28.40% in the first measurement. The essential oils from individuals 2, 5, and 13, samples 1BD02, 1BD05, collected during the dry season, and 2BD13 during the rainy season, inhibited the fungus *F. verticillioides* by 24.42%, 19.67%, and 15.83% in the first observation, respectively. In the new concentrations studied, the essential oils 1BD02, 1BD06, and 2BD13 obtained inhibitory percentages of 29.58%, 39.62%, and 59.66% at concentrations of 8 mL/L against the fungi *A. nomius*, *F. graminearum*, and *F. verticillioides*, respectively. These results suggest the importance of studying individuals within a population to determine the most promising ones for specific interests. Further studies are needed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and to test the feasibility of these essential oils in the field as a new natural agricultural pesticide.

Keywords: Natural agricultural pesticide; antifungal activity; volatile substances; gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS); filamentous fungi

4.3. INTRODUÇÃO

Baccharis dracunculifolia DC., conhecida popularmente como “vassourinha” ou “alecrim-do-campo”, é uma planta pertencente à família Asteraceae, que representa cerca de 8 a 10% de toda a flora global, abrigando aproximadamente 22.750 espécies em 1.620 gêneros (DEL VITTO & PETENATTI, 2009). O gênero *Baccharis* ocorre predominantemente na América Latina, correspondendo a cerca de 500 espécies (VERDI et al., 2005). Esta espécie é nativa do Brasil, podendo ocorrer em biomas como o Pampa, Cerrado e Mata Atlântica, é a constituinte principal da própolis verde de *Apis mellífera* e muito utilizada pela medicina popular (PARK et al., 2004; BUDEL et al., 2004).

Os extratos e óleos essenciais de *B. dracunculifolia* possuem propriedades antiparasitárias (PARREIRA et al, 2010), antibacterianas (VEIGA et al, 2017; BONIN et al, 2020), antioxidantes (TOMAZZOLI et al, 2021), antivirais (BUFALO et al, 2009), antifúngicas (SILVA FILHO et al, 2008), antiulcerogênicas (MASSIGNANI et al., 2009) e anti-inflamatórias (BRADENBURG et al, 2020).

Os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* têm demonstrado grande potencial para a indústria farmacêutica, de alimentos e também no controle de pragas agrícolas. Salazar et al. (2018) relataram reatividade destes óleos essenciais contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Também Cazella et al. (2019) relataram propriedades inibitórias contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A utilização de nanopartículas do óleo essencial de *B. dracunculifolia* em leite, apresentou efeito no controle de *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, bactérias causadoras de doenças de origem alimentar (TIMBE et al., 2020).

Estudos constataram a atividade antifúngica do óleo essencial de *B. dracunculifolia* contra fungos leveduriformes do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) isolados das cavidades orais de crianças em período de aleitamento materno (PEREIRA et al., 2011). Oliveira et al. (2016) também verificaram o potencial antifúngico dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra uma cepa de *C. albicans*.

Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* são amplamente conhecidos por seus efeitos prejudiciais na indústria agropecuária, pois afetam significativamente o plantio, colheita e armazenamento de grãos e cereais, como milho, trigo e arroz. Além disso, esses fungos são produtores de micotoxinas perigosas para a saúde humana e animal (CASTRO et al., 2014). O *A. nomius* é capaz de produzir a aflatoxina, uma micotoxina altamente tóxica que pode causar problemas de saúde graves, como hepatite, cirrose e câncer. *F. verticillioides* e *F. graminearum*

são produtores de fumonisinas e deoxinivalenol, respectivamente, que podem contaminar grãos e cereais, e causar uma série de doenças hepáticas, câncer, problemas imunológicos e reprodutivos e até mesmo a morte, em casos extremos (CASTRO et al., 2014; DEEPA & SREENIVASA, 2017; PRESTES et al., 2019)

Testes dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* realizados contra fungos de interesse agrônômico, como *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, demonstraram potencial antimicrobiano (FONSECA et al., 2015). Bonett et al. (2012) também constataram a eficiência do óleo essencial de *B. dracunculifolia* na inibição de crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, principal causador da antracnose em frutos de interesse comercial.

A crescente resistência dos microrganismos a antibióticos e a defensivos agrícolas existentes tem demandado a busca de novos medicamentos e defensivos agrícolas com ações antifúngicas e antibacterianas. A utilização dos óleos essenciais contra estes microrganismos pode ser uma das alternativas. Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de 15 indivíduos de uma população de *B. dracunculifolia*, considerando dois períodos de coleta (estação seca e chuvosa), contra *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Coleta do material vegetal e extração dos óleos essenciais

Conforme previamente observado no Capítulo 1 foi realizada a coleta dos indivíduos de uma população de *B. dracunculifolia* em períodos de seca e de chuva e em seguida, os óleos essenciais das folhas foram extraídos por hidrodestilação em aparato Clevenger (Figura 1). Os indivíduos de 1 a 15 receberam uma nomenclatura específica para cada estação coletada (Tabela 1).



Figura 1: A: *B. dracunculifolia*; B: Ramo de *B. dracunculifolia* coletado; C: Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação em aparato Clevenger; D: Óleo essencial de *B. dracunculifolia*

Tabela 1: Nomenclatura dada aos indivíduos da população de *B. dracunculifolia* coletadas nas estações seca e chuvosa, Águas de Santa Barbara, SP.

Indivíduos	Estação seca (06/09/2021)	Estação chuvosa (21/03/2022)
1	1BD01	2BD01
2	1BD02	2BD02
3	1BD03	2BD03
4	1BD04	2BD04
5	1BD05	2BD05
6	1BD06	2BD06
7	1BD07	2BD07
8	1BD08	2BD08
9	1BD09	2BD09
10	1BD10	2BD10
11	1BD11	2BD11
12	1BD12	2BD12
13	1BD13	2BD13
14	1BD14	2BD14
15	1BD15	2BD15

4.4.2. Composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia*

As análises dos óleos essenciais foram conduzidas em cromatógrafo a gás Thermo (GC TRACE 1310) equipado com detector por ionização em chamas (DIC) e espectrômetro de massas (EM), com divisão de fluxo de 3:7, para o EM e DIC, respectivamente. O injetor foi mantido a 220 °C, com vazão do gás de arraste (hélio, 99,9999% de pureza) de 0.5 mL.min⁻¹ na razão (split) de 1:20. O espectrômetro de massas operou no modo *full scan*, por impacto de elétrons (70 eV), e faixa de aquisição de 40 a 450 m/z. A temperatura da interface foi mantida em 230 °C e do detector de ionização em chamas a 250 °C. As amostras de óleos essenciais foram diluídas em acetato de etila (grau cromatográfico, 1mg.mL⁻¹) e injetado 1 µL de solução. A separação das substâncias foi realizada em coluna capilar Rtx-5 MS (20 m x 0,18 mm x 0,2 µm), no seguinte programa de temperatura: 60°C - 240°C (3°C.min⁻¹).

O software *Chromeleon* (Thermo Scientific-Waltham, MA, EUA) foi usado para aquisição e processamento dos dados. A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com as bibliotecas *National Institute of Standards and Technology* (NIST 14); *Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds* (FFNSC3) e dos índices de retenção linear com a literatura (Adams, 2017). O índice de retenção linear foi obtido a partir da injeção da mistura de *n*-alcanos (C₉-C₂₄, Sigma-Aldrich, 99%, USA) nas mesmas condições cromatográficas das amostras, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

A proporção relativa das substâncias foi obtida na cromatografia gasosa com o detector por ionização de chama (CG-DIC) pelo método de normalização de área. As análises dos óleos essenciais foram feitas em triplicata.

4.4.3. Avaliação preliminar da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* na concentração de 2 mL/L contra *A. nomius*, *F. graminearum* e *F. verticillioides*

A avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais dos 15 indivíduos de *B. dracunculifolia* coletados nas estações seca e chuvosa, no total 30 amostras, foi realizada no Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ-USP, Piracicaba- SP, em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Micotti da Glória. Os ensaios foram realizados com os fungos *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* pertencentes a micoteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ - USP.

Para tanto, a mistura de meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Agar) autoclavado por 20 minutos, emulsificante (desenvolvido na ESALQ – USP e denominado Etherius) e óleos essenciais, nas proporções de 10 mL, 200 µL e 20 µL, respectivamente, foi homogeneizada e vertida em placas de Petri (15x60mm), correspondendo a concentração final de 2 mL.L⁻¹. As avaliações foram realizadas em triplicata.

Uma solução contendo esporos foi obtida a partir dos fungos mencionados, com concentrações que variaram de 3,36 x 10⁶ esporos/mL; 4,1 x 10⁶ esporos/mL e 11,6 x 10⁶ esporos/mL, para *A. nomius*, *F. graminearum* e *F. verticillioides*, respectivamente (Figura 4). Em seguida, 5 µL destes esporos foram aplicados, com o auxílio de uma pipeta graduada, no centro de cada placa de Petri sobre um disco de papel de 0,5 mm, de modo que o micélio estivesse em contato com o meio (Figura 3). Todas as placas foram incubadas a 20°C.

Controles positivos com óleos essenciais comerciais de *Eucalyptus staigeriana*, *Lippia sidoides* e uma mistura de *Eucalyptus globulus* + *Eucalyptus staigeriana* (1:1) foram utilizados nas mesmas condições do óleo essencial de *B. dracunculifolia* para *Aspergillus nomius*. Para os fungos do gênero *Fusarium* foram utilizados controles positivos dos óleos essenciais comerciais de *Cinnamomum verum* (concentrações de 1 mL.L⁻¹ para *F. verticillioides* e 2 mL.L⁻¹ para *F. graminearum*) e *Lippia sidoides* (concentração de 2 mL.L⁻¹). A escolha desses controles positivos se deu devido a sua capacidade antifúngica já comprovada na literatura (BOUKHATEM et al., 2020; PEDROTTI et al., 2022; DOS SANTOS et al. 2021; FONTENELLE et al., 2007). Para o controle negativo, foi realizada uma mistura contendo apenas BDA (10 mL) e o emulsificante (200 µL).

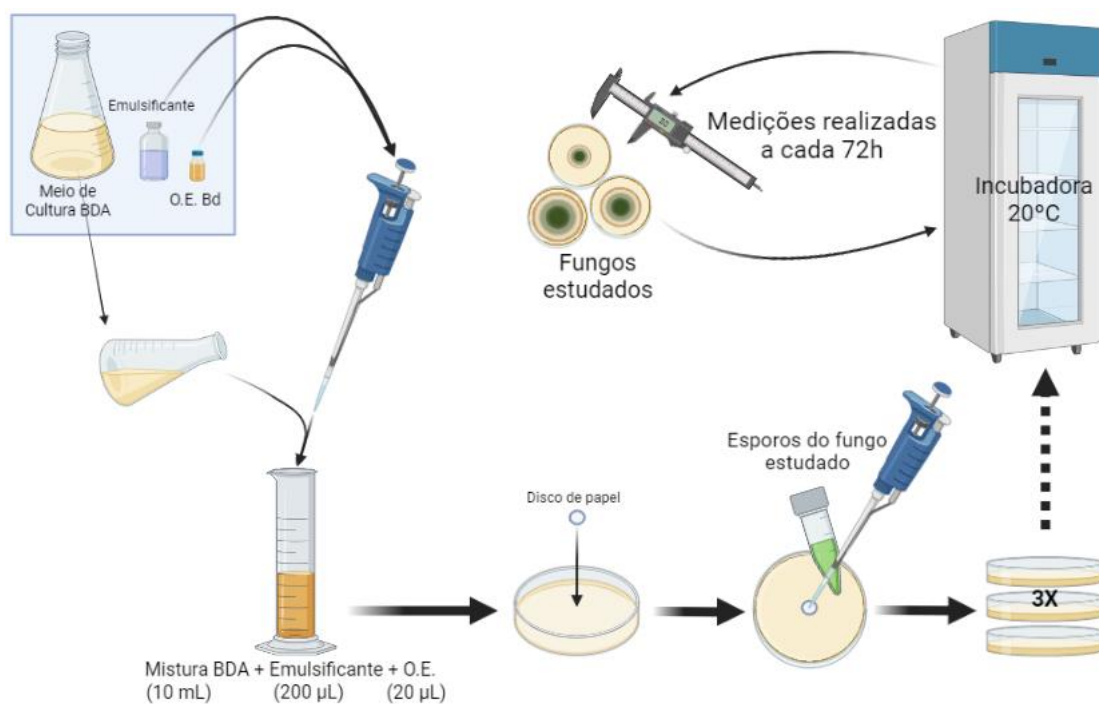


Figura 3: Fluxograma da metodologia aplicada

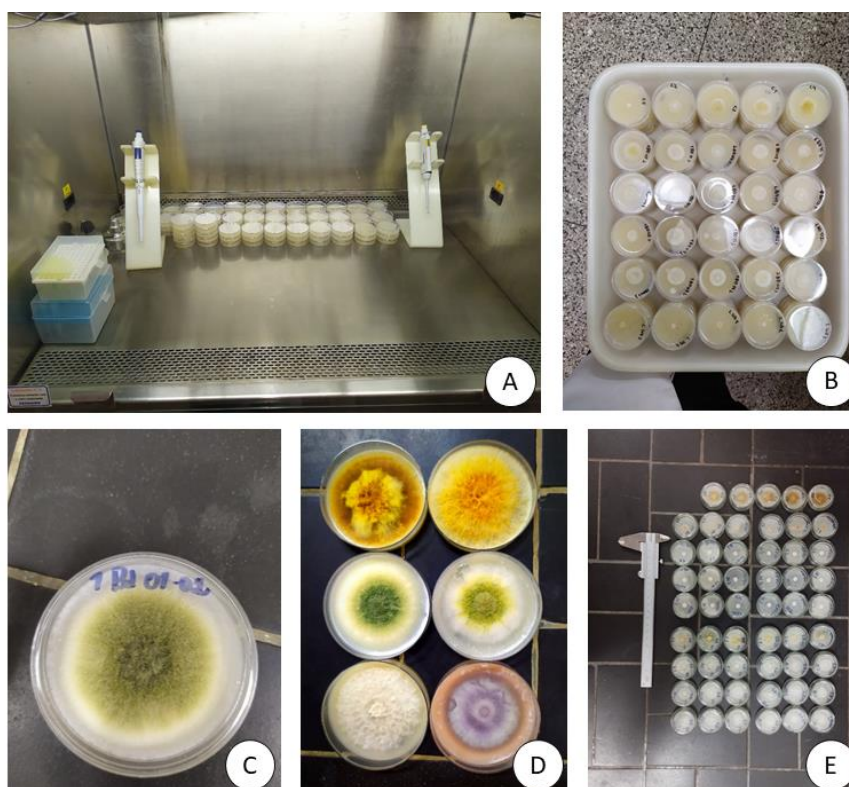


Figura 4: A: Capela utilizada para inoculação; B: Placas utilizadas para testes preliminares contendo *F. graminearum*; C: Placa de Petri com *A. nomius*; D: *F. graminearum*, *A. nomius*, *F. verticillioides* (de cima para baixo); E: Placas utilizadas para atividade antifúngica em diferentes concentrações contendo *F. graminearum*

A capacidade antifúngica foi mensurada através da inibição do desenvolvimento micelar dos fungos na presença do óleo essencial, no decorrer do período de incubação. Para isto, o crescimento radial do fungo a partir do centro da placa foi periodicamente medido. Para o fungo *A. nomius*, três mensurações foram realizadas até a data final do período de incubação, sendo elas realizadas 72 h, 144 h e 168 h após a inoculação. Para *F. graminearum* e *F. verticillioides* foram realizadas duas observações, sendo elas 72 h e 144 h após a inoculação. O período de incubação foi limitado ao dia que o crescimento radial dos controles negativos de cada espécie fúngica atingisse as laterais da placa de Petri. Após essas observações, foi calculada a eficiência de inibição dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e dos óleos essenciais do controle positivo, a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = - \left(\left(\frac{\text{Diametro Placa Observada}}{\text{Diametro médio do Controle Negativo}} \right) \cdot 100 \right) + 100.$$

4.4.4. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* em diferentes concentrações (2; 4; 6; 8 mL/L) contra *A. nomius*; *F. graminearum* e *F. verticillioides*

Os óleos essenciais que apresentaram maior porcentagem de inibição nos testes preliminares, onde foi utilizada a concentração única de 2 mL.L⁻¹, foram avaliados novamente com concentrações que variaram entre 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹ (Figura 4).

Para isso, uma mistura de meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Agar) autoclavada por 20 minutos, emulsificante (Etherius), nas proporções de 2 mL, 40 µL, respectivamente e os óleos essenciais selecionados, nas concentrações acima citadas foi vertida em placas de Petri e o ensaio realizado em triplicata. Como controle positivo foram utilizados os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e de *Cinnamomum camphora* nas mesmas concentrações dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*. Os controles negativos foram realizados nas mesmas condições, porém, sem a adição de óleos essenciais. Foram realizadas duas mensurações do crescimento fúngico radial para cada fungo no decorrer do tempo de incubação, sendo elas 72 h e 144 h após a inoculação dos fungos, e os resultados foram apresentados em gráficos e tabelas (Figura 5).

Após essas observações foi avaliada a eficiência de inibição dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e também dos óleos essenciais dos controles positivos a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = - \left(\left(\frac{\text{Diametro Placa Observada}}{\text{Diametro médio do Controle Negativo}} \right) \cdot 100 \right) + 100.$$

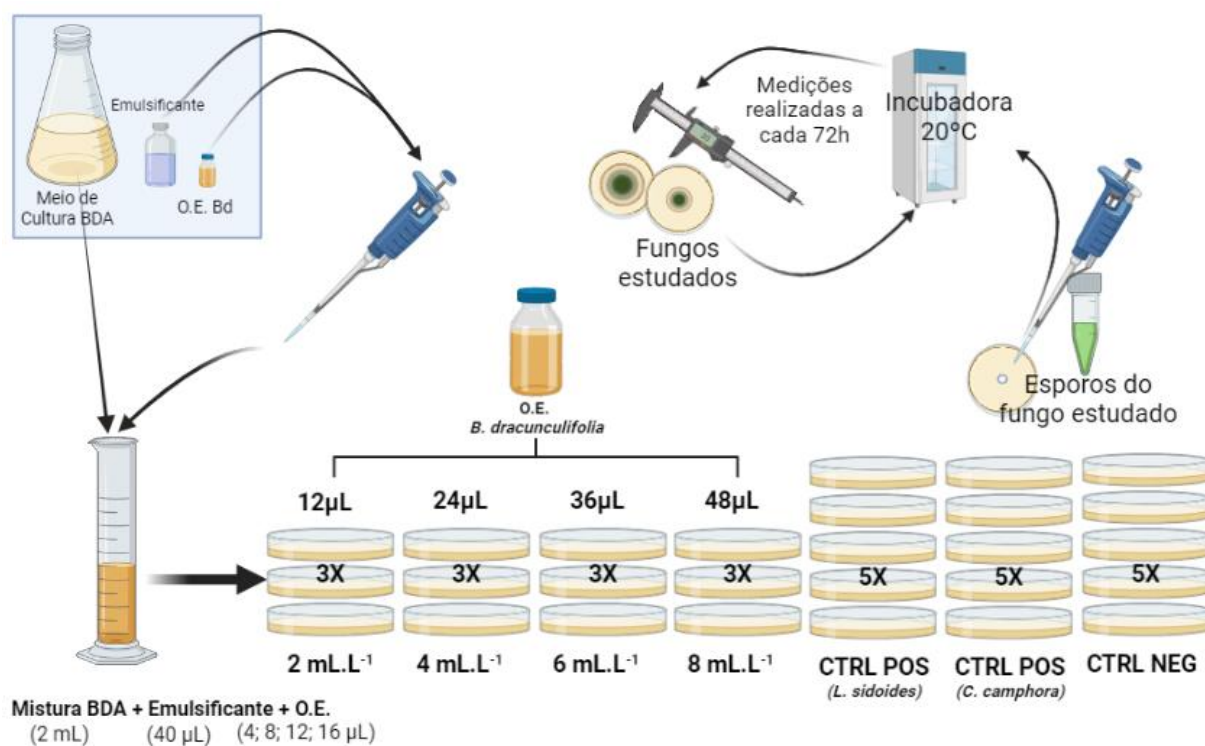


Figura 5: Fluxograma da metodologia aplicada

4.4.5. Análises estatísticas

As porcentagens de inibição dos óleos essenciais da avaliação preliminar e das avaliações em diferentes concentrações foram planilhadas e gráficos foram elaborados a partir do Excel 2016. Testes-t pareados foram realizados na fase de avaliação preliminar para determinar se houveram diferenças de potencial inibitório entre os períodos de coleta (seca e chuvoso) para todas as observações realizadas.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Avaliação preliminar da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* DC. na concentração de 2 mL/L contra *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*

Para *A. nomius*, tanto os óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, quanto os óleos essenciais dos controles positivos, apresentaram atividade, sendo a amostra 1BD02 de *B. dracunculifolia* a de maior taxa de inibição para os indivíduos estudados, atingindo 25,30% na primeira, 10,69% na segunda, e 11,00% na terceira medição, respectivamente (Figura 6). Estes resultados demonstram a variabilidade nas atividades antifúngicas dos óleos essenciais e evidencia a importância do estudo de populações em testes microbiológicos, uma vez que cada indivíduo de *B. dracunculifolia* apresentou atividade antifúngica diferenciada. O controle positivo com maior taxa de inibição foi o óleo essencial de *Lippia sidoides*, com 43,10% na primeira, 17,10% na segunda, e 19% na terceira medição. As demais amostras da primeira e segunda coleta de *B. dracunculifolia* variaram entre 12,35% -2,75% na primeira; 7,89% -0,71% na segunda; e 2,8% -0,1% na terceira medição (Figura 6). Com base nos resultados dos testes realizados, não foram encontradas evidências estatísticas suficientes para afirmar que há diferenças entre as médias das respostas nas épocas de colheita para as três observações realizadas.

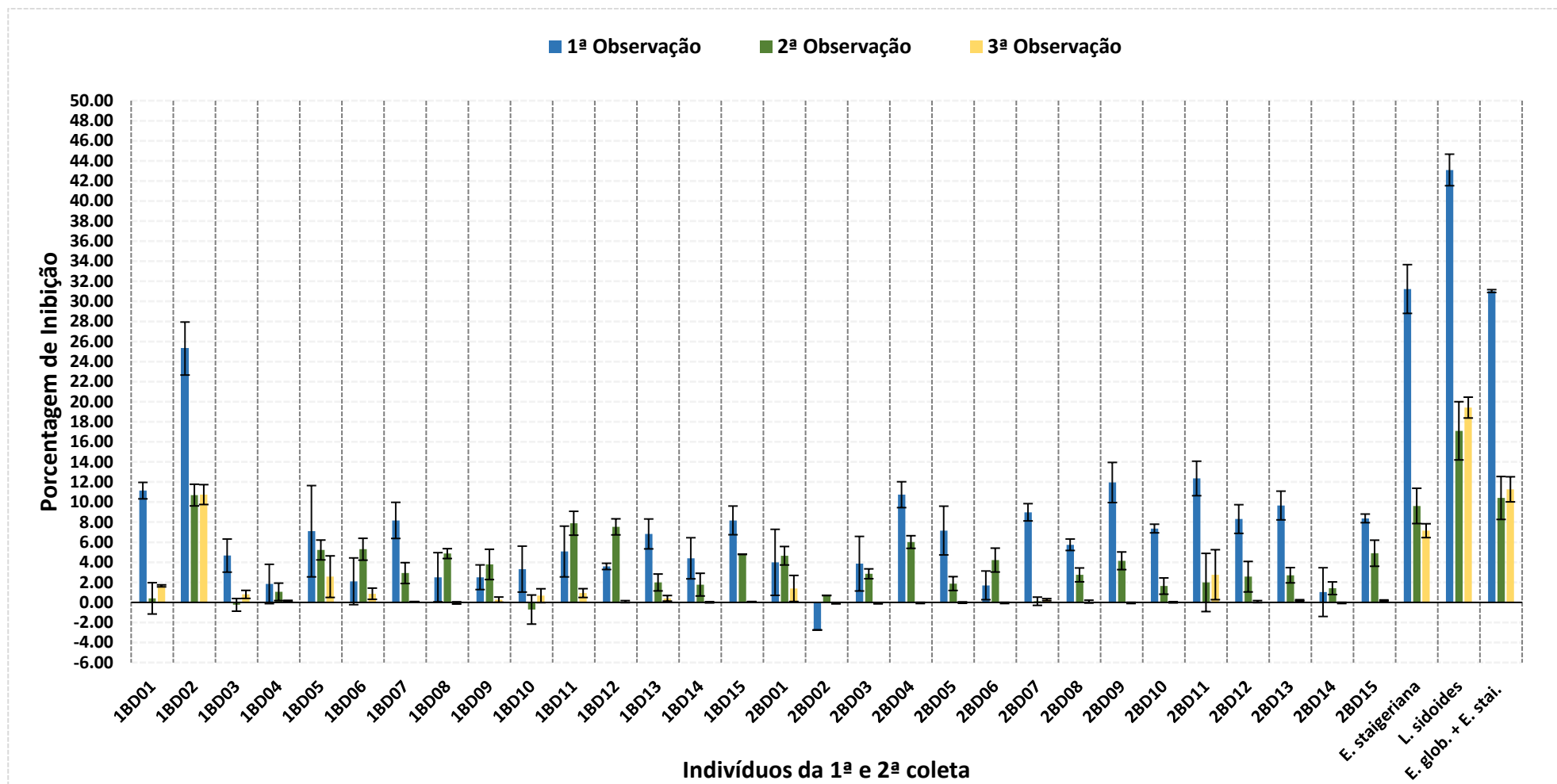


Figura 6: Porcentagem inibitória dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *Aspergillus nomius*

Para *F. graminearum*, foi possível observar uma maior taxa de inibição nas amostras 1BD06 e 2BD06 de óleo essencial de *B. dracunculifolia*, atingindo 40,24% e 28,40% na primeira, 12,55% e 14,82% na segunda medição, respectivamente, enquanto as demais amostras da primeira e segunda coleta de *B. dracunculifolia* variaram entre 21,02% e -4,33% na primeira e 7,44% e 0% na segunda medição (Figura 7). Evidenciando novamente que existe uma variabilidade nas atividades antifúngicas, demonstrando ainda que indivíduos diferentes obtiveram resultados variáveis, dependendo do fungo estudado. O controle positivo com maior taxa de inibição foi o do óleo essencial de *C. verum* com 100% de inibição para as duas medições, enquanto para o de *L. sidoides* a inibição foi de 67,72% e 57,38% na primeira e segunda medição, respectivamente (Figura 7). Assim como observado para *A. nomius* não foi encontrada diferença estatística na atividade antifúngica dos óleos essenciais entre as duas épocas de coleta (seca e chuvosa).

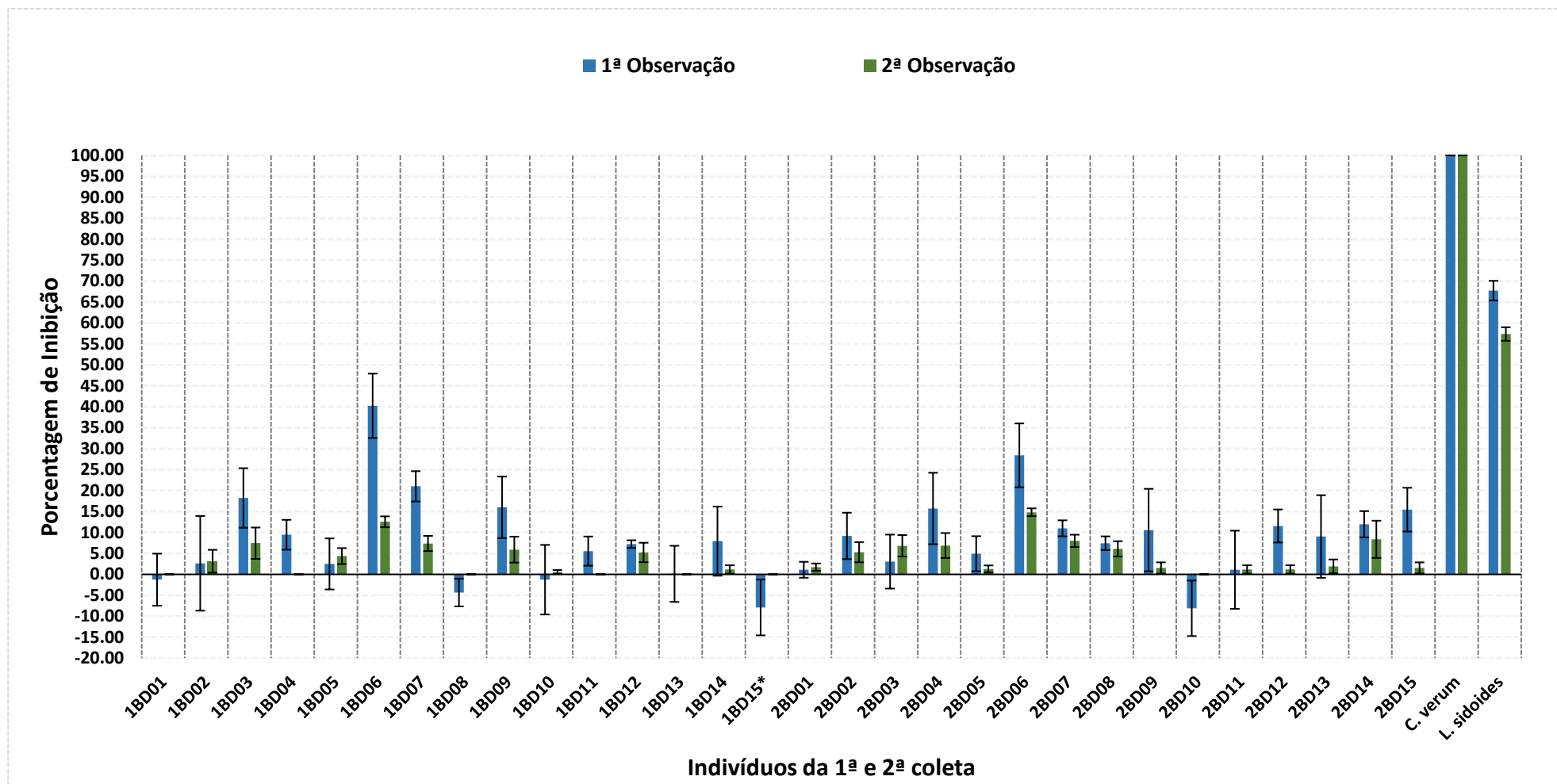


Figura 7: Porcentagem inibitória dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *Fusarium graminearum*; *Amostra refeita (inóculo: $12,6 \times 10^6$)

Os óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* apresentaram divergência na atividade antifúngica frente a *F. verticillioides*, com maior taxa de inibição nas amostras 1BD02 e 1BD05 e 2BD13 de óleo essencial de *B. dracunculifolia*, atingindo 24,42%; 19,67% e 15,83% na primeira, 22,76%; 16,34% e 9,85% na segunda medição, respectivamente (Figura 8). O controle positivo com maior taxa de inibição foi o óleo essencial de *C. verum* (1 mL.L⁻¹), com 100% de inibição para as duas observações, enquanto para *L. sidoides* a inibição foi de 40,71 % e -2,17% na primeira e segunda medição, respectivamente. A taxa de inibição para as demais amostras de óleos essenciais da primeira e segunda coleta de *B. dracunculifolia* variou entre 16,65% e 1,27% na primeira e 16,02 % e -2,17% na segunda medição (Figura 8). Os resultados dos testes-t realizados demonstraram evidências estatísticas significativas para afirmar que existem diferenças entre as médias das respostas das estações seca e chuvosa em relação a *F. verticillioides*, sendo $P < 0,03$ para as duas observações realizadas.

Estes resultados indicam que os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* apresentam atividades antifúngicas sobre os fungos estudados, contudo os óleos essenciais utilizados como controles positivos apresentaram maior inibição sobre as mesmas espécies fúngicas, o que era esperado, visto que *Lippia sidoides*; *Eucalyptus staigeriana*; *Eucalyptus globulus* e *Cinnamomum verum* possuem propriedades antifúngicas amplamente conhecidas na literatura (TRAN et al., 2020; CARMO et al., 2008; CASTRO et al., 2020; TRAJANO et al., 2012; BOUKHATEM et al., 2020; PEDROTTI et al., 2022; DOS SANTOS et al. 2021; FONTENELLE et al., 2007).

É interessante observar que apesar de serem provenientes de uma única população, os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* apresentaram atividades antifúngicas em diferentes escalas, indicando a importância do estudo das populações para determinar os indivíduos com maiores potenciais inibitórios. Vale ressaltar que os óleos essenciais de um mesmo indivíduo apresentaram diferença na atividade antifúngica dependendo do fungo estudado.

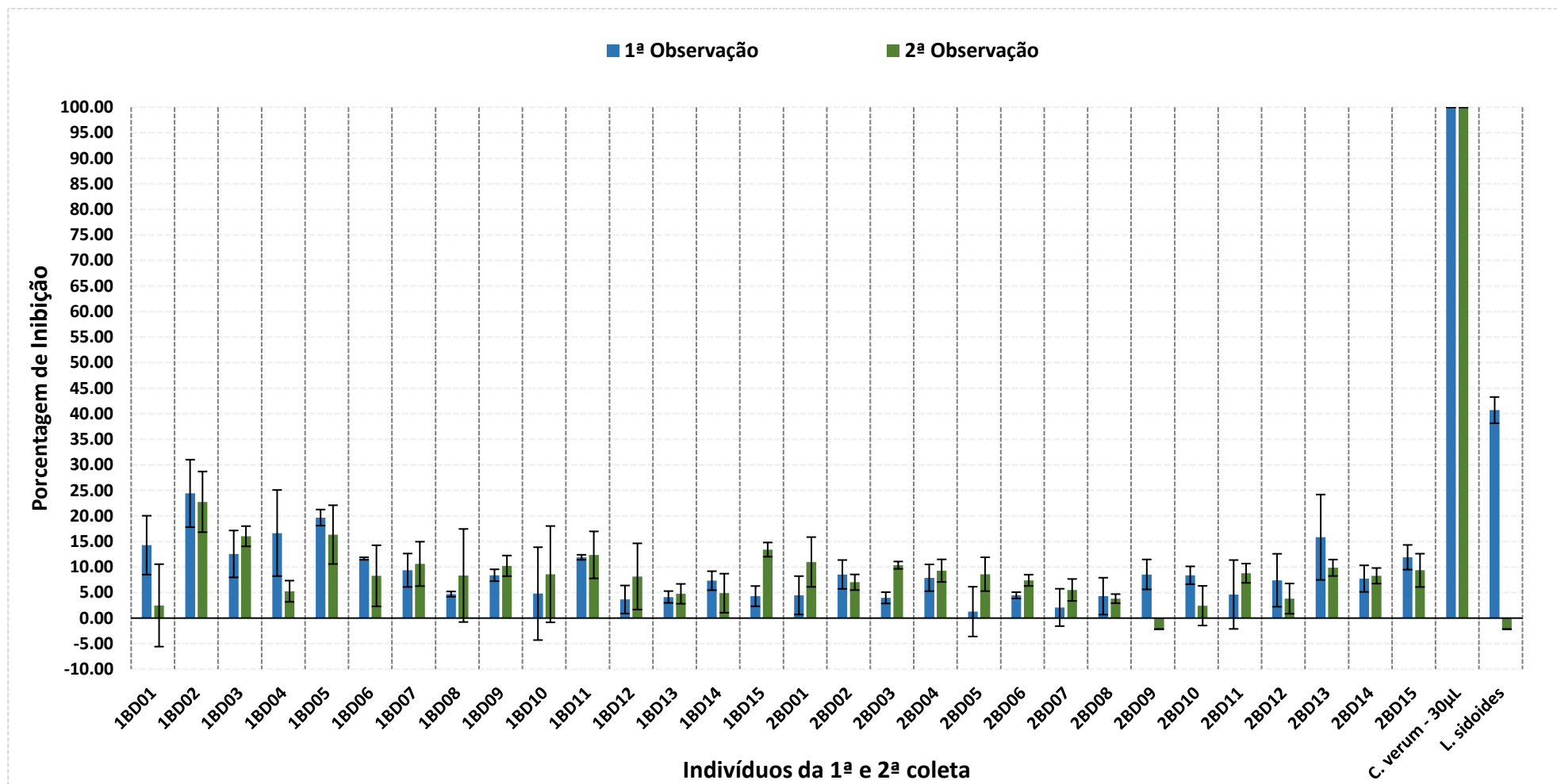


Figura 8: Porcentagem inibitória dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *Fusarium verticillioides*

Diante dos resultados obtidos os óleos essenciais dos indivíduos, 1BD02; 1BD05 e 1BD06, da estação seca e 2BD06 e 2BD13 da estação chuvosa foram selecionados para se realizar novos testes em diferentes concentrações, uma vez que apresentaram os melhores resultados para os fungos estudados. Para o *Aspergillus nomius* utilizou-se o óleo essencial do indivíduo 1BD02, para *Fusarium graminearum* dos indivíduos 1BD06 e 2BD06 e para *Fusarium verticillioides* de 1BD02; 1BD05 e 2BD13, totalizando 5 óleos essenciais e 6 novos ensaios.

Devido a maior atividade antifúngica para os fungos estudados nos testes preliminares a composição química dos óleos essenciais dos indivíduos 1BD02; 1BD05 e 1BD06, da estação seca e 2BD06 e 2BD13 da chuvosa foi avaliada e os resultados apresentados no item 4.5.2 a seguir. Os resultados da avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais destes indivíduos estão descritos no item 4.5.3.

4.5.2. Composição química dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* selecionados para a avaliação da atividade antifúngica em diferentes concentrações (2; 4; 6; 8 mL/L) contra *A. nomius*; *F. graminearum* e *F. verticillioides*

Ao todo, 40 substâncias foram identificadas nos óleos essenciais dos indivíduos 1BD02; 1BD05 e 1BD06, da estação seca e 2BD06 e 2BD13 da chuvosa (Tabela 2). Como substâncias majoritárias foram observadas o *trans*-nerolidol; espatulenol; α -pineno, β -pineno, germacreno D, biciclogermacreno e limoneno. A classe de maior proporção relativa foi a dos sesquiterpenos oxigenados, seguida de hidrocarbonetos monoterpênicos. Algumas dessas substâncias foram testadas isoladamente e apresentaram propriedades antifúngicas, como o limoneno contra *Trichophyton rubrum* (CHEE et al., 2009); α -pineno e β -pineno, contra fungos do gênero *Candida* (SILVA et al., 2012), entretanto, é necessário levar em conta o efeito sinérgico destas substâncias na ação antifúngica, uma vez que elas possuem características físico-químicas únicas, que podem agir em várias frentes contra os microrganismos (*herbal-shotgun*). Uma tabela contendo as substâncias identificadas nos óleos essenciais destes 5 indivíduos foi realizada (Tabela 2), onde as substâncias em comum para as 5 amostras estão em negrito.

Tabela 2: Composição química média (%) dos óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* que apresentaram maior atividade antifúngica contra *A. nomius*, *F. graminearum* e *F. verticillioides*

Nº	Substância	IRL exp.	IRL lit	1BD IAC 02	1BD IAC 05	1BD IAC 06	2BD IAC 06	2BD IAC 13
1	α -tujeno	929	924	tr	tr	tr	tr	0,36 $\pm$ 0,01
2	α -pineno	936	932	5,65 $\pm$ 0,2	2,05 $\pm$ 0,06	1,46 $\pm$ 0,04	2,5 $\pm$ 0,04	4,47 $\pm$ 0,02
3	sabineno	977	969				tr	0,29 $\pm$ 0,02
4	β -pineno	981	974	6,13 $\pm$ 0,17	9,98 $\pm$ 0,02	5,58 $\pm$ 0,12	7,63 $\pm$ 0,07	13,23 $\pm$ 0,02
5	mirceno	994	988	2,49 $\pm$ 0,13	1,33 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,01	1,1 $\pm$ 0,02	2,52 $\pm$ 0,03
6	limoneno	1032	1024	5,85 $\pm$ 0,2	7,59 $\pm$ 0,09	4,9 $\pm$ 0,01	11,04 $\pm$ 0,17	14,04 $\pm$ 0,17
7	(E)- β -ocimeno	1051	1044	0,69 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,01	1,07 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,02
8	γ -terpineno	1062	1054				tr	0,29 $\pm$ 0,02
9	terpinoleno	1094	1086				tr	0,65 $\pm$ 0,01
10	acetofenona	1099	1065	tr	tr	tr	0,61 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,01
11	linalol	1116	1095	tr	0,8 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,04
12	(e)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene	1120	1113	tr	0,81 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,04	1,34 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,08
13	terpinen-4-ol	1191	1174				tr	0,35 $\pm$ 0,01
14	α -terpineol	1211	1186	tr	tr	tr	0,47 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,02
15	β -elemeno	1396	1389				tr	0,24 $\pm$ 0,02
16	trans-cariofileno	1424	1417	2,82 $\pm$ 0,09	1,88 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,04	2,44 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,01
17	β -gurjeneno	1434	1431				tr	0,65 $\pm$ 0,01
18	aromadendreno	1443	1439	tr	tr	tr	0,82 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,12
19	α -humuleno	1459	1452	0,76 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,04	1,65 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,23
20	óxido de cabreuva B	1467	1462	1,4 $\pm$ 0,06	1,63 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,04	1,57 $\pm$ 0,13	0,18 $\pm$ 0,11
21	γ -muuroleno	1482	1478	tr	tr	tr	0,64 $\pm$ 0,03	tr
22	óxido de cabreuva D	1485	1479	tr	tr	2,01 $\pm$ 0,1	0,56 $\pm$ 0,1	0,25 $\pm$ 0,01
23	germacreno D	1487	1480	7,5 $\pm$ 0,11	4,21 $\pm$ 0,14	0,42 $\pm$ 0,04	3,82 $\pm$ 0,1	1,44 $\pm$ 0,07
24	viridifloreno	1501	1496	tr	tr	1,33 $\pm$ 0,32	1,12 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,02
25	biciclogermacreno	1503	1500	5,4 $\pm$ 0,1	5,42 $\pm$ 0,21	5,36 $\pm$ 0,28	3,81 $\pm$ 0,02	3,36 $\pm$ 0
26	α -muuroleno	1507	1500	tr	tr	0,53 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,03
27	γ -cadineno	1521	1513	0,5 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,02	tr	0,53 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,01
28	δ -cadineno	1530	1522	3,38 $\pm$ 0,07	3,61 $\pm$ 0,09	3,72 $\pm$ 0,03	2,27 $\pm$ 0,05	2,21 $\pm$ 0,02
29	trans-nerolidol	1581	1561	34,63 $\pm$ 0,27	35,77 $\pm$ 0,48	40,11 $\pm$ 0,76	37,59 $\pm$ 0,31	19,55 $\pm$ 0,13
30	espatulenol	1597	1577	7,23 $\pm$ 0,26	7,98 $\pm$ 0,02	9,28 $\pm$ 0,22	8,76 $\pm$ 0,07	11,83 $\pm$ 0,08
31	globulol	1608	1590	1,87 $\pm$ 0,11	1,02 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,03	2,16 $\pm$ 0,06
32	viridiflorol	1616	1592	tr	tr	tr	0,37 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,05
33	rosifoliol	1619	1600	tr	tr	tr	tr	0,71 $\pm$ 0,1
34	1- <i>epi</i> -cubenol	1642	1627	0,57 $\pm$ 0,06	tr	0,51 $\pm$ 0,02	tr	tr
35	<i>epi</i> - α -cadinol	1660	1638	0,84 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,07	tr	0,78 $\pm$ 0,02
36	<i>epi</i> - α -muurolol	1662	1640	1,58 $\pm$ 0,01	1,73 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,02
37	α -muurolol	1667	1644	0,99 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,09	1,37 $\pm$ 0,07	0,64 $\pm$ 0,16	0,91 $\pm$ 0,03
38	α -cadinol	1676	1652	2,66 $\pm$ 0,16	2,98 $\pm$ 0,1	1,63 $\pm$ 0,17	0,6 $\pm$ 0,14	2,18 $\pm$ 0,01
39	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1717	1685	2,9 $\pm$ 0,46	0,96 $\pm$ 0,35	2,49 $\pm$ 0,58	tr	tr
40	eremofilona	1756	1734	tr	tr	tr	tr	0,46 $\pm$ 0,02
hidrocarbonetos monoterpênicos				20,81 $\pm$ 0,7	21,62 $\pm$ 0,19	13,6 $\pm$ 0,19	23,37 $\pm$ 0,32	36,51 $\pm$ 0,31
monoterpenos oxigenados				0	1,61 $\pm$ 0,03	1,4 $\pm$ 0,08	3,19 $\pm$ 0,15	2,27 $\pm$ 0,15
hidrocarbonetos sesquiterpênicos				18,38 $\pm$ 0,48	14,53 $\pm$ 0,61	16,93 $\pm$ 0,93	19,07 $\pm$ 0,61	11,5 $\pm$ 0,65
sesquiterpenos oxigenados				53,27 $\pm$ 1,37	52,53 $\pm$ 1,11	58,01 $\pm$ 1,99	49,41 $\pm$ 0,89	40,4 $\pm$ 0,5
não identificadas				4,17 $\pm$ 0,16	6,1 $\pm$ 0,26	10,06 $\pm$ 0,34	4,95 $\pm$ 0,2	9,14 $\pm$ 0,75

IRLexp = índice de retenção linear experimental; IRL. Lit = índice de retenção linear da literatura (Adams, 2017); ni = substância não identificada; tr = traços (<0,12%)

4.5.3. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* em diferentes concentrações (2; 4; 6; 8 mL/L) contra *A. nomius*; *F. graminearum* e *F. verticillioides*

Os óleos essenciais dos indivíduos de *B. dracunculifolia* que apresentaram a maior atividade antifúngica foram selecionados para testes complementares em novas concentrações, sendo assim, para o *A. nomius*, foi avaliado o óleo essencial 1BD02; para *F. graminearum* o 1BD06 e 2BD06 e para *F. verticillioides* o 1BD02; 1BD05 e 2BD13, totalizando 5 óleos essenciais e 6 novos ensaios.

Na primeira mensuração do crescimento fúngico radial de *A. nomius*, realizada no 72 h após a inoculação, o óleo essencial 1BD02 apresentou inibições de 11,67%; 18,90%; 22,52%; e 29,58% nas concentrações de 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹, respectivamente. Para a segunda mensuração, realizada 144 h após a inoculação, as inibições foram de 7,50%; 10,28%; 15,56%; 18,32% nas concentrações de 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹, respectivamente. Os controles positivos de *C. camphora* e de *L. sidoides* apresentaram inibições que variaram entre 24,24% a 71,59% e 33,88% a 100% para a primeira mensuração, e 4,31% a 43,75% e 13,19% a 100%, para a segunda, respectivamente (Tabela 3; Figura 9).

Tabela 3: Porcentagem de inibição (%) dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *A. nomius* em diferentes concentrações

Concentrações	Primeira medição	Segunda Medição
1BD02 - 2 mL.L ⁻¹	11,67 ± 1,55	7,5 ± 3,31
1BD02 - 4 mL.L ⁻¹	18,9 ± 3,14	10,28 ± 3,24
1BD02 - 6 mL.L ⁻¹	22,52 ± 1,37	15,56 ± 1,88
1BD02 - 8 mL.L ⁻¹	29,57 ± 3,03	18,33 ± 1,25
<i>L. sidoides</i> - 2 mL.L ⁻¹	33,88 ± 6,75	13,19 ± 4,74
<i>L. sidoides</i> - 4 mL.L ⁻¹	54,72 ± 3,95	47,22 ± 0,64
<i>L. sidoides</i> - 6 mL.L ⁻¹	66,25 ± 0,6	61,11 ± 1,58
<i>L. sidoides</i> - 8 mL.L ⁻¹	100 ± 0	100 ± 0
<i>C. camphora</i> - 2 mL.L ⁻¹	24,24 ± 4,18	4,31 ± 5,42
<i>C. camphora</i> - 4 mL.L ⁻¹	53,86 ± 1,96	30,56 ± 1,68
<i>C. camphora</i> - 6 mL.L ⁻¹	60,4 ± 8,24	34,44 ± 12,76
<i>C. camphora</i> - 8 mL.L ⁻¹	71,59 ± 1,55	43,75 ± 7,95

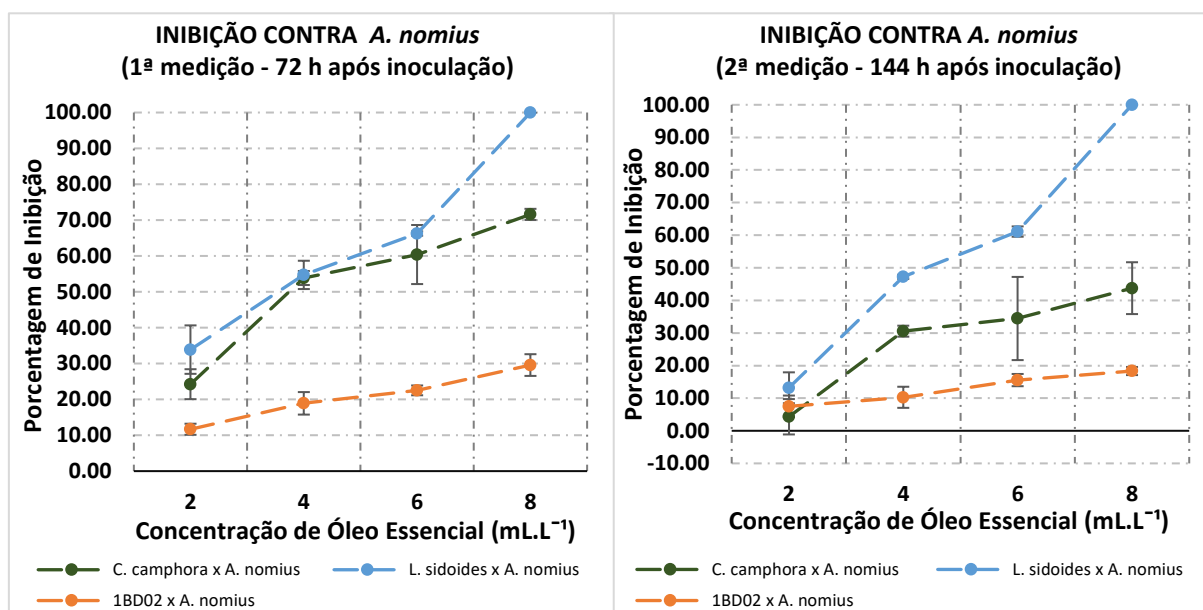


Figura 9: Porcentagem inibitória dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *Aspergillus nomius*; concentrações: 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹; Medições realizadas 72 h e 144 h após a inoculação do fungo.

Na primeira mensuração do crescimento radial do *F. graminearum*, 72 h após a inoculação, as amostras 1BD06 e 2BD06 apresentaram inibições de 18,72%; 26,22%; 33,19% e 39,62%; e 13,54%; 18,54%; 23,19% e 29,08% nas concentrações de 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹, respectivamente. Para a segunda mensuração, 144 h após a inoculação, 10,95%; 12,76%; 17,93% e 20,82%; e 6,86%; 9,39%; 11,43% e 12,52% nas concentrações de 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹, respectivamente. Os controles positivos de *C. camphora* e de *L. sidoides* apresentaram inibições que variaram entre 50,52% a 100% e 41,72% a 100% e 2,17% a 100% e 13,72% a 100%, para primeira e segunda mensuração, respectivamente (Tabela 4; Figura 10).

Tabela 4: Porcentagem de inibição (%) dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *F. graminearum* em diferentes concentrações

Concentrações	Primeira medição	Segunda Medição
1BD06 - 2 mL.L-1	18,72 ± 0,62	10,95 ± 1,63
1BD06 - 4 mL.L-1	26,22 ± 2,75	12,76 ± 1,82
1BD06 - 6 mL.L-1	33,19 ± 1,12	17,93 ± 1,16
1BD06 - 8 mL.L-1	39,62 ± 1,88	20,82 ± 2,4
2BD06 - 2 mL.L-1	13,54 ± 1,35	6,86 ± 1,3
2BD06 - 4 mL.L-1	18,54 ± 1,42	9,39 ± 0,72
2BD06 - 6 mL.L-1	23,19 ± 2,17	11,43 ± 1,63
2BD06 - 8 mL.L-1	29,08 ± 2,23	12,52 ± 2,76
<i>L. sidoides</i> - 2 mL.L-1	41,76 ± 2,95	13,72 ± 2,6
<i>L. sidoides</i> - 4 mL.L-1	100 ± 0	100 ± 0
<i>L. sidoides</i> - 6 mL.L-1	100 ± 0	100 ± 0
<i>L. sidoides</i> - 8 mL.L-1	100 ± 0	100 ± 0
<i>C. camphora</i> - 2 mL.L-1	50,52 ± 4,46	2,17 ± 3,75
<i>C. camphora</i> - 4 mL.L-1	100 ± 0	68,11 ± 3,96
<i>C. camphora</i> - 6 mL.L-1	100 ± 0	78,58 ± 3,65
<i>C. camphora</i> - 8 mL.L-1	100 ± 0	100 ± 0

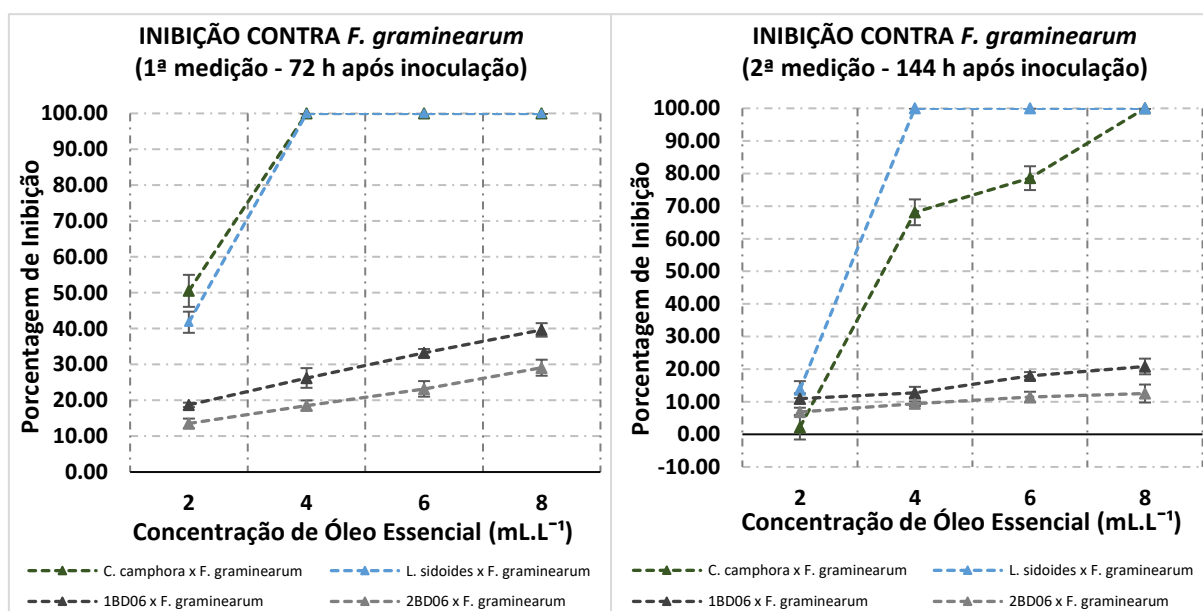


Figura 10: Porcentagem inibitória dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *F. graminearum*; concentrações: 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹; Medições realizadas 72 h e 144 h após a inoculação do fungo.

Na primeira mensuração do crescimento radial do *F. verticillioides*, 72 h após inoculação, o óleo 1BD02 apresentou inibições que variaram entre 17,31% a 50,89%; 1BD05 entre 12,92% a 52,72% e 2BD13 entre 16,39% a 59,66%. Na segunda mensuração, 144 h após inoculação, o percentual inibitório do óleo 1BD02 variou entre 9,83% a 39,39%, para o 1BD05 as inibições ficaram entre 15,92% e 26,92% e para o 2BD13 variou entre 16,37% a 35,68%, nas diferentes concentrações estudadas. Os controles positivos de *C. camphora* e de *L. sidoides* apresentaram inibições que variaram entre de 42,31% a 100% e 57,10% a 100% e 3,45% a 50,83% e 15,63% a 100%, para primeira e segunda mensuração, respectivamente (Tabela 5; Figura 11).

Tabela 5: Porcentagem de inibição (%) dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *F. verticillioides* em diferentes concentrações

Concentrações	Primeira medição	Segunda Medição
1BD02 - 2 mL.L-1	17,31 ± 3,29	9,83 ± 3,22
1BD02 - 4 mL.L-1	25,16 ± 3,65	23,2 ± 1,86
1BD02 - 6 mL.L-1	50,89 ± 9,44	36,57 ± 1,43
1BD02 - 8 mL.L-1	49,98 ± 11,93	39,39 ± 6,29
1BD05 - 2 mL.L-1	12,92 ± 4,48	15,92 ± 4,14
1BD05 - 4 mL.L-1	24,06 ± 6,69	21,27 ± 1,8
1BD05 - 6 mL.L-1	50,89 ± 11,41	23,8 ± 2,23
1BD05 - 8 mL.L-1	52,72 ± 7,29	26,92 ± 3,12
2BD13 - 2 mL.L-1	16,39 ± 7,15	16,37 ± 0,51
2BD13 - 4 mL.L-1	48,89 ± 0,84	20,53 ± 1,12
2BD13 - 6 mL.L-1	56,92 ± 1,14	33,6 ± 3,57
2BD13 - 8 mL.L-1	59,66 ± 1,58	35,68 ± 1,36
<i>L. sidoides</i> - 2 mL.L-1	57,1 ± 0,32	15,63 ± 1,8
<i>L. sidoides</i> - 4 mL.L-1	100 ± 0	61,82 ± 5,37
<i>L. sidoides</i> - 6 mL.L-1	100 ± 0	71,03 ± 0,45
<i>L. sidoides</i> - 8 mL.L-1	100 ± 0	100 ± 0
<i>C. camphora</i> - 2 mL.L-1	42,31 ± 8,42	3,45 ± 2,45
<i>C. camphora</i> - 4 mL.L-1	61,85 ± 2,53	15,92 ± 4,77
<i>C. camphora</i> - 6 mL.L-1	100 ± 0	34,19 ± 4,72
<i>C. camphora</i> - 8 mL.L-1	100 ± 0	50,83 ± 0,68

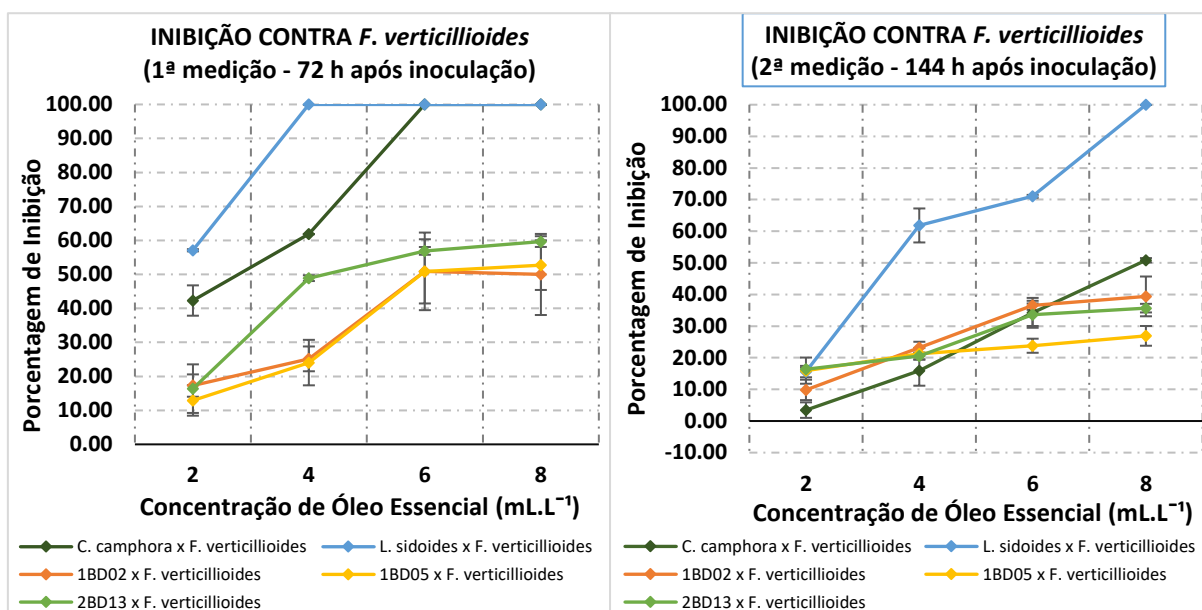


Figura 11: Porcentagem inibitória dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* contra *F. verticillioides*; concentrações: 2 mL.L⁻¹; 4 mL.L⁻¹; 6 mL.L⁻¹ e 8 mL.L⁻¹; Medições realizadas 72 h e 144 h após a inoculação do fungo.

Mesmo em concentrações maiores, os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* não atingiram porcentagem de 100% de inibição. Contudo, o óleo essencial de *C. camphora* atingiu 100% de inibição contra os fungos *F. graminearum* e *F. verticillioides* em concentrações de 4 e 6 mL.L⁻¹ respectivamente, na primeira observação, o de *L. sidoides* contra os fungos *F. graminearum* e *F. verticillioides* nas concentrações de 4 mL.L⁻¹ e *A. nomius* em concentrações de 8 mL.L⁻¹, na primeira observação (Figuras 12 e 13).

As atividades antifúngicas dos controles positivos já eram esperadas, uma vez que Fontenelle et al. (2007) relataram grande poder inibitório de *L. sidoides* contra fungos do gênero *Candida*, assim como frente a fungos presentes nas sementes de *Brachiaria* spp. (DOS SANTOS et al. 2021). O mesmo pode ser observado para *Cinnamomum camphora* que atingiu o CIM contra *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* em concentrações de 5 mL/dL e 1 mL/dL, respectivamente (MAHILRAJAN et al., 2014). Estudos sobre os óleos essenciais de *C. camphora* e de *L. sidoides* demonstraram que seus compostos majoritários são linalol e timol, respectivamente, substâncias conhecidas por seus efeitos antibióticos (MARCHESE et al., 2016; CAMARGO & VASCONCELOS, 2014).

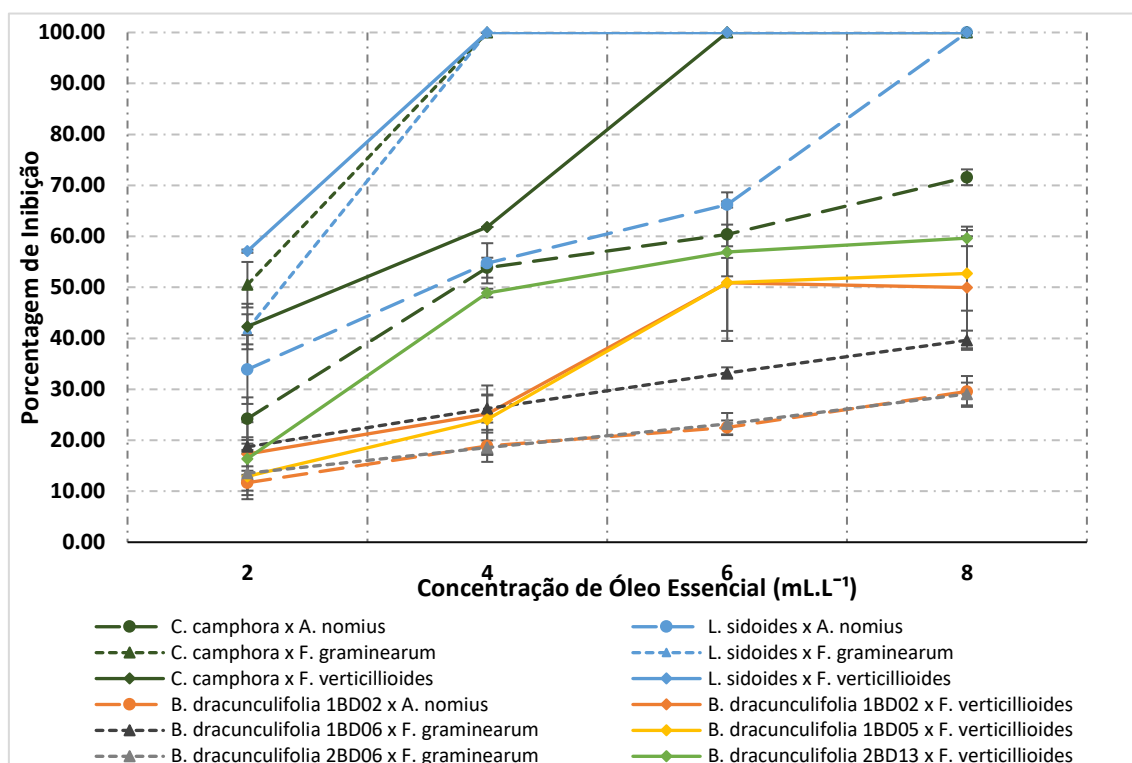


Figura 12: Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* em diferentes concentrações contra os fungos *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* (primeira observação, 72 h após inoculação)

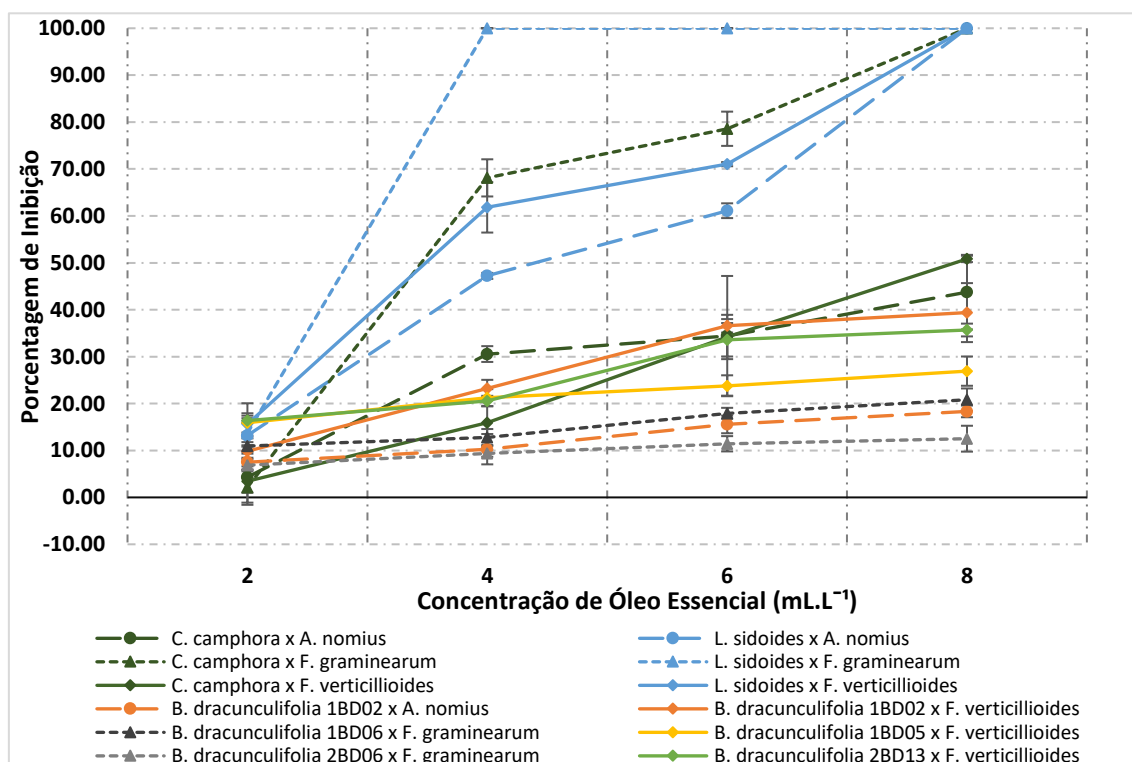


Figura 13: Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* em diferentes concentrações contra os fungos *Aspergillus nomius*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* (segunda observação, 144 h após inoculação)

4.6. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* apresentaram resultados promissores para o controle dos fungos *A. nomius*, *F. graminearum* e *F. verticillioides*. Os indivíduos da população de *B. dracunculifolia* estudada também apresentaram variação nas atividades antifúngicas, demonstrando que alguns deles obtiveram melhores resultados em relação a outros. Esta variação é um importante resultado, que deve ser levado em conta em estudos posteriores, para a seleção do melhor genótipo no combate aos fungos avaliados no presente estudo. O óleo essencial do indivíduo 1BD02 coletado na estação seca apresentou maior porcentagem de inibição contra *Aspergillus nomius*, enquanto para os fungos de *F. graminearum*, os óleos essenciais das amostras 1BD06 e 2BD06 coletados nas estações seca e chuvosa apresentaram maiores porcentagens de inibições. Para o fungo *F. verticillioides* os óleos essenciais dos indivíduos 1BD02, 1BD05 e 2BD13 apresentaram as melhores porcentagens inibitórias. Não foi observada diferença estatística na atividade antifúngica dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* para *A. nomius* e *F. graminearum*, ao contrario do observado para *F. verticillioides*. Apesar da atividade antifúngica de *B. dracunculifolia* contra os fungos nos estudos *in vitro*, mais estudos se fazem necessários, tanto em campo, como com novas concentrações, para determinar a viabilidade destes óleos essenciais como defensivos agrícolas naturais.

4.7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

Bonett, L.P., Muller, G.M., Wessling, C.R. and Gamelo, F.P., 2012. Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família *Asteraceae* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 7(3), pp.116-125.

Bonin, E., Carvalho, V.M., Avila, V.D., dos Santos, N.C.A., Benassi-Zanqueta, É., Lancheros, C.A.C., Previdelli, I.T.S., Ueda-Nakamura, T., de Abreu Filho, B.A. and do Prado, I.N., 2020. *Baccharis dracunculifolia*: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. *LWT*, 120, p.108920.

Boukhatem, M. N., Boumaiza, A., Nada, H. G., Rajabi, M., & Mousa, S. A. (2020). Eucalyptus globulus essential oil as a natural food preservative: Antioxidant, antibacterial and antifungal properties in vitro and in a real food matrix (orangina fruit juice). *Applied Sciences*, 10(16), 5581.

Brandenburg, M.M., Rocha, F.G., Pawloski, P.L., da Silva Soley, B., Rockenbach, A., Scharf, D.R., Heiden, G., Ascari, J., Cabrini, D.A. and Otuki, M.F., 2020. *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*) essential oil displays anti-inflammatory activity in models of skin inflammation. *Journal of ethnopharmacology*, 259, p.112840.

Budel, J.M., Duarte, M.D.R., Santos, C.D.M. and Farago, P.V., 2004. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(4), pp.477-483.

Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., De Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K. and Sforcin, J.M., 2009. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of applied microbiology*, 107(5), pp.1669-1680.

Cazella, L.N., Glamoclija, J., Soković, M., Gonçalves, J.E., Linde, G.A., Colauto, N.B. and Gazim, Z.C., 2019. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. *Frontiers in plant science*, 10, p.27.

Carmo, E. S., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D., & Sousa, F. B. D. (2008). Effect of cinnamomum zeylanicum blume essential oil on the rowth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 91-97.

Castro, J. C., Pante, G. C., Centenaro, B. M., Almeida, R. T. R. D., Pilau, E. J., Dias Filho, B. P., ... & Machinski Junior, M. (2020). Antifungal and antimycotoxigenic effects of *Zingiber officinale*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Cymbopogon martinii* essential oils against *Fusarium verticillioides*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(9), 1531-1541.

Chee, Hcc Youn; MM, Hoon; LEE, Min Hee. In vitro antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*, v. 37, n. 3, p. 243-246, 2009.

Del Vitto, L.A. and Petenatti, E.M., 2009. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*, (18), pp.87-115.

Dos Santos, P. R., Alves, M. V. G., & Dos Santos, G. R. (2021). Botanical and chemical fungicides in the treatment of commercial seeds of *Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum*. *Journal of Basic Microbiology*, 61(5), 459-471.

Fonseca, M.C.M., Lehner, M.D.S., Gonçalves, M.G., Paula Júnior, T.J.D., Silva, A.F., Bonfim, F.P.G. and Prado, A.L., 2015. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17(1), pp.45-50.

Fontenelle, R. O. S., Morais, S. M., Brito, E. H. S., Kerntopf, M. R., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., & Rocha, M. F. G. (2007). Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), 934-940.

Hauschild, R., Ott, A. and da Silva, M.A.S., 2020. Ação fumigante de óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Elionurus muticus* contra o Ácaro rajado (*Tetranychus urticae*, Koch 1836) em morangueiro. *Cadernos de Agroecologia*, 15(2).

Mahilraj, S., Nandakumar, J., Kailayalingam, R., Manoharan, N. A., & SriVijeindran, S. (2014). Screening the antifungal activity of essential oils against decay fungi from palmyrah leaf handicrafts. *Biological Research*, 47, 1-5.

- Massignani, J.J., Lemos, M., Maistro, E.L., Schaphauser, H.P., Jorge, R.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K. and de Andrade, S.F., 2009. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(10), pp.1355-1360.
- Oliveira, C.F., Bobek, V.B., Pietruchinski, E. and Cardozo, A.G.L., 2016. Evaluation of antifungal activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. against the yeast of the species *Candida albicans*. *Visão Acadêmica*, 16(4).
- Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M. and Fujiwara, F.Y., 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), pp.1100-1103.
- Parreira, N.A., Magalhães, L.G., Moraes, D.R., Caixeta, S.C., de Sousa, J.P., Bastos, J.K., Cunha, W.R., Silva, M.L., Nanayakkara, N.P.D., Rodrigues, V. and da Silva Filho, A.A., 2010. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry & biodiversity*, 7(4), pp.993-1001.
- Pedrotti, C., Caro, I. M. D. D., Franzoi, C., Grohs, D. S., & Schwambach, J. (2022). Control of anthracnose (Elsinoë ampelina) in grapevines with Eucalyptus staigeriana essential oil. *Organic Agriculture*, 12(1), 81-89.
- Pereira, C. A., de Costa, A. C., Machado, A. K. S., Beltrame Júnior, M., Zöllner, M. S., Junqueira, J. C., 2011. Enzymatic activity, sensitivity to antifungal drugs and *Baccharis dracunculifolia* essential oil by *Candida* strains isolated from the oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and nipples. *Mycopathologia* 171, 103–109.
- Salazar, G.J.T., de Sousa, J.P., Lima, C.N.F., Lemos, I.C.S., da Silva, A.R.P., de Freitas, T.S., Coutinho, H.D.M., da Silva, L.E., do Amaral, W. and Deschamps, C., 2018. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Industrial Crops and Products*, 122, pp.591-595.
- Silva Filho, A.A., de Sousa, J.P., Soares, S., Furtado, N.A., e Silva, M.L.A., Cunha, W.R., Gregório, L.E., Nanayakkara, N.D. and Bastos, J.K., 2008. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(1-2), pp.40-46.
- da Silva Rivas, A. C., Lopes, P. M., de Azevedo Barros, M. M., Costa Machado, D. C., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.
- Timbe, P.P.R., da Motta, A.D.S., Isaia, H.A. and Brandelli, A., 2020. Polymeric nanoparticles loaded with *Baccharis dracunculifolia* DC essential oil: Preparation, characterization, and antibacterial activity in milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9), p.e14712

Tomazzoli, M.M., Amaral, W.D., Cipriano, R.R., Tomasi, J.D.C., Gomes, E.N., Ferriani, A.P., Maia, B.H. and Deschamps, C., 2021. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Populations of *Baccharis dracunculifolia* DC. in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64.

Trajano, V. N., Lima, E. D. O., & Souza, F. S. D. (2012). Antifungal activity of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume and eugenol on *Aspergillus flavus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(5), 785-793.

Tran, H. N., Graham, L., & Adukwu, E. C. (2020). In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8911-8924.

Veiga, R.S., De Mendonça, S., Mendes, P.B., Paulino, N., Mimica, M.J., Lagareiro Netto, A.A., Lira, I.S., López, B.C., Negrão, V. and Marcucci, M.C., 2017. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), pp.911-920.

Verdi, L.G., Brighente, I.M.C. and Pizzolatti, M.G., 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química nova*, 28(1), pp.85-94.

5. CAPITULO III

“Avaliação da influência das estações (seca e chuvosa) na densidade de tricomas glandulares em folhas de *B. dracunculifolia* (Asteraceae) ”

5.1 RESUMO

Baccharis dracunculifolia é uma planta nativa do Brasil, pertencente à família das *Asteraceae*. Tricomas foliares são comuns nesta família e, em alguns casos, realizam a secreção de resinas, ceras e óleos essenciais, que atuam no mecanismo de defesa contra fitopatógenos e herbivoria. A densidade de tricomas glandulares é variável, podendo ser determinada por fatores genéticos e ambientais. As folhas de *B. dracunculifolia* apresentam tricomas glandulares pluricelulares que secretam óleos essenciais de interesse econômico. O objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade dos tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia* em função das épocas de coleta (estações seca e chuvosa). Para isto as partes aéreas de 15 indivíduos de uma população de *B. dracunculifolia* foram coletadas nas estações seca e chuvosa no município de Águas de Santa Barbara, Estado de São Paulo. A densidade dos tricomas das folhas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Embora existam variações no rendimento dos óleos essenciais nos períodos de coleta, não foi observada variação significativa na média de tricomas glandulares de *B. dracunculifolia*. Em relação a densidade de tricomas das superfícies abaxial e adaxial, as superfícies adaxiais mostraram um número significativamente maior de tricomas glandulares ($P < 0,0005$), onde a média encontrada foi de 142 para a primeira (estação seca) e 111 para a segunda coleta (estação chuvosa), contra 74 (estação seca) e 82 (estação chuvosa), na superfície abaxial. Tais resultados acerca das superfícies adaxiais eram esperados devido a sua natureza fotoprotetora, a média parecida de tricomas glandulares para os dois períodos de coleta sugere que estas estruturas secretam um maior número de óleos essenciais em uma determinada época, não variando em quantidade. Mais estudos se fazem necessários a fim de determinar se existe alguma outra estrutura de armazenamento de óleos essenciais presentes nas partes aéreas de *B. dracunculifolia*.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica de varredura (MEV); fatores abióticos; óleos essenciais; estruturas secretoras; alecrim-do-campo; rendimento em óleos essenciais.

5.2 ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia is a native plant of Brazil, belonging to the *Asteraceae* family. Leaf trichomes are common in this family and, in some cases, they secrete resins, waxes, and essential oils that act as a defense mechanism against phytopathogens and herbivory. The density of glandular trichomes can vary and may be determined by genetic and environmental factors. The leaves of *B. dracunculifolia* have pluricellular glandular trichomes that secrete economically valuable essential oils. The aim of this study was to evaluate the density of glandular trichomes on the leaves of *B. dracunculifolia* in relation to the collection periods (dry and rainy seasons). For this purpose, the aerial parts of 15 individuals from a *B. dracunculifolia* population were collected during the dry and rainy seasons in Águas de Santa Barbara, São Paulo State. The trichome density of the leaves was evaluated using scanning electron microscopy (SEM). Although there were variations in the yield of essential oils during the collection periods, no significant variation in the average number of glandular trichomes of *B. dracunculifolia* was observed. Regarding the trichome density on the abaxial and adaxial surfaces, the adaxial surfaces showed a significantly higher number of glandular trichomes ($P < 0.0005$), with an average of 142 for the first collection (dry season) and 111 for the second collection (rainy season), compared to 74 (dry season) and 82 (rainy season) on the abaxial surface. These results regarding the adaxial surfaces were expected due to their photoprotective nature. The similar average number of glandular trichomes for both collection periods suggests that these structures secrete a larger amount of essential oils during a specific period, without varying in quantity. Further studies are needed to determine if there are any other storage structures for essential oils present in the aerial parts of *B. dracunculifolia*.

Keywords: Scanning electron microscopy (SEM); abiotic factors; essential oils; secretory structures; alecrim-do-campo; essential oil yield.

5.3 INTRODUÇÃO

Estudos anatômicos em estruturas secretoras de plantas da família Asteraceae são muito difundidos, uma vez que seus metabólitos especializados são utilizados para diversos fins, com propriedades antiinflamatórias, antibióticas, repelentes, aromáticas, entre outras. A diversidade de espécies desta família é imensa, suas plantas possuem importâncias apícolas (*Baccharis dracunculifolia*), hortícolas (*Lactuca sativa*), condimentares, medicinais (*Baccharis trimera*), em perfumaria, ornamentais, florestais e de recuperação de áreas degradadas, entre outras (DEL VITTO & PETENATTI, 2015).

A diversidade dessa família também é observada em seus tricomas foliares, que em alguns casos, realizam a secreção de resinas, ceras e óleos essenciais, metabolitos secundários que desempenham papéis de defesa contra herbívoros e patógenos, além de sua importância na proteção contra raios ultravioleta (BICKFORD, 2016). A densidade de tricomas glandulares é variável, podendo ser determinada por fatores genéticos e ambientais (WALKER & MARKS, 2000). Estudos têm demonstrado que fatores abióticos como temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica, sazonalidade podem influenciar na formação e densidade dos tricomas glandulares (EHLERINGER & BJÖRKMAN, 1978; MARTINEZ-NATARÉN et al., 2011; SHIBUYA et al., 2016; TOZIN, et al., 2015), estruturas responsáveis pela síntese e armazenamento dos óleos essenciais (GONÇALVES et al., 2007).

Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) é um arbusto dioico, com altura que varia de 0,5 até 3 m. Sua floração ocorre predominantemente no mês de novembro, enquanto sua germinação ocorre de forma favorável em regiões com presença de luz. Suas folhas são simples e alternas, de forma lanceolada com base e ápice agudos, medindo cerca de 30 mm de comprimento. Seus estômatos são anomócitos e apresentam-se em maiores proporções na face abaxial (PEGORINI et al., 2008).

Além disso, as folhas apresentam tricomas glandulares pluricelulares, que aumentam a refletância da radiação luminosa e evitam a perda excessiva de água, além de ajudar na manutenção da temperatura foliar (BUDEL et al., 2004). Os tricomas glandulares pluricelulares servem como mecanismo de defesa para a planta, uma vez que são responsáveis pela secreção de metabólitos especializados, como ceras, resinas e óleos essenciais, evitando fitopatógenos e herbivoria (PEGORINI et al., 2008). As principais substâncias dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, encontrados em suas partes aéreas,

são *trans*-nerolidol, espatulenol, *D*-germacreno, biciclogermacreno, *trans*-cariofileno, globulol, viridiflorol, β -selineno, entre outros (FERRACINI et al., 1995; AGOSTINI et al., 2005; MASSIGNANI et al., 2009). Em *B. dracunculifolia*, os tricomas glandulares são pluricelulares, uni ou bisseriados, reunidos pela base em tufos, localizados em pequenas depressões nas folhas (BUDEL et al., 2004).

A fim de avaliar a influência dos fatores abióticos em *B. dracunculifolia*, o objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade dos tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia* em função das épocas de coleta (estação seca e chuvosa).

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1. Coleta do material vegetal

Para as análises microscópicas, foram coletados as partes aéreas de 10 indivíduos na estação seca (Bd 01 a Bd 10). Os indivíduos foram etiquetados totalizando 20 amostras para as duas coletas. As folhas foram separadas manualmente dos ramos no local de coleta, armazenadas em frascos de vidro contendo uma solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e transportadas ao Instituto de Biociências da UNESP, Campus Botucatu. As folhas foram desidratadas gradualmente em concentrações de álcool que variavam de 10% até 70% para posteriores análises da densidade dos tricomas, os codinomes para cada indivíduo encontram-se na Tabela 1.



Figura 1: A: *B. dracunculifolia*; B: Ramo de *B. dracunculifolia* coletado

Tabela 1: Nomenclatura dada aos indivíduos da população de *B. dracunculifolia* coletadas nas estações seca e chuvosa, Águas de Santa Barbara, SP.

Indivíduos	Estação seca (06/09/2021)	Estação chuvosa (21/03/2022)
Bd - 01	1BD IAC 01	2BD IAC 01
Bd - 02	1BD IAC 02	2BD IAC 02
Bd - 03	1BD IAC 03	2BD IAC 03
Bd - 04	1BD IAC 04	2BD IAC 04
Bd - 05	1BD IAC 05	2BD IAC 05
Bd - 06	1BD IAC 06	2BD IAC 06
Bd - 07	1BD IAC 07	2BD IAC 07
Bd - 08	1BD IAC 08	2BD IAC 08
Bd - 09	1BD IAC 09	2BD IAC 09
Bd - 10	1BD IAC 10	2BD IAC 10

5.4.2. Densidade de tricomas glandulares de *B. dracunculifolia*

Para a determinação da densidade de tricomas glandulares, as amostras foliares das duas coletas foram conduzidas ao Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP de Ilha Solteira – SP, onde foram desidratadas até o nível supercrítico em CO₂ com o aparelho Leica EM CPD300. Fixadas em suporte de alumínio com fita dupla face de carbono e metalizadas com uma camada de ouro de 30-40 nm no aparelho Quorum Q150T E. Tais análises foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss modelo EVO/LS15, operado a 20kv com as escalas impressas diretamente nas eletromicrografias (Figura 2). As contagens foram realizadas a partir de imagens padronizadas, com dimensão de 1200 µm x 800 µm (zoom de 250x). Os resultados foram expressos em gráficos com a média de tricomas glandulares observadas na superfície abaxial e adaxial nas duas coletas.



Figura 2: A: Processo de desidratação das amostras; B: Amostras sendo revestidas por ouro (Quorum Q150T E); C: Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss EVO LS15); D: Obtenção das imagens dos tricomas glandulares

5.4.3. Análises estatísticas

As amostras foram submetidas à análise de variância de dois fatores (ANOVA) usando o software PAST 4.12 para determinar se há diferença significativa entre as médias de tricomas glandulares em diferentes períodos de coleta (seca e chuva) e superfícies de folha (adaxial e abaxial).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1. Densidade dos tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia*

Os aspectos anatômicos dos tricomas glandulares nas folhas de *B. dracunculifolia* coletadas no município de Águas de Santa Barbara – SP corroboram com os descritos por Budel et al. (2004) e Pegorini et al. (2008), apresentando tricomas glandulares pluricelulares unidos em tufo pela base, localizados em depressões nas superfícies abaxiais e adaxiais de suas folhas (Figuras 3 e 4).

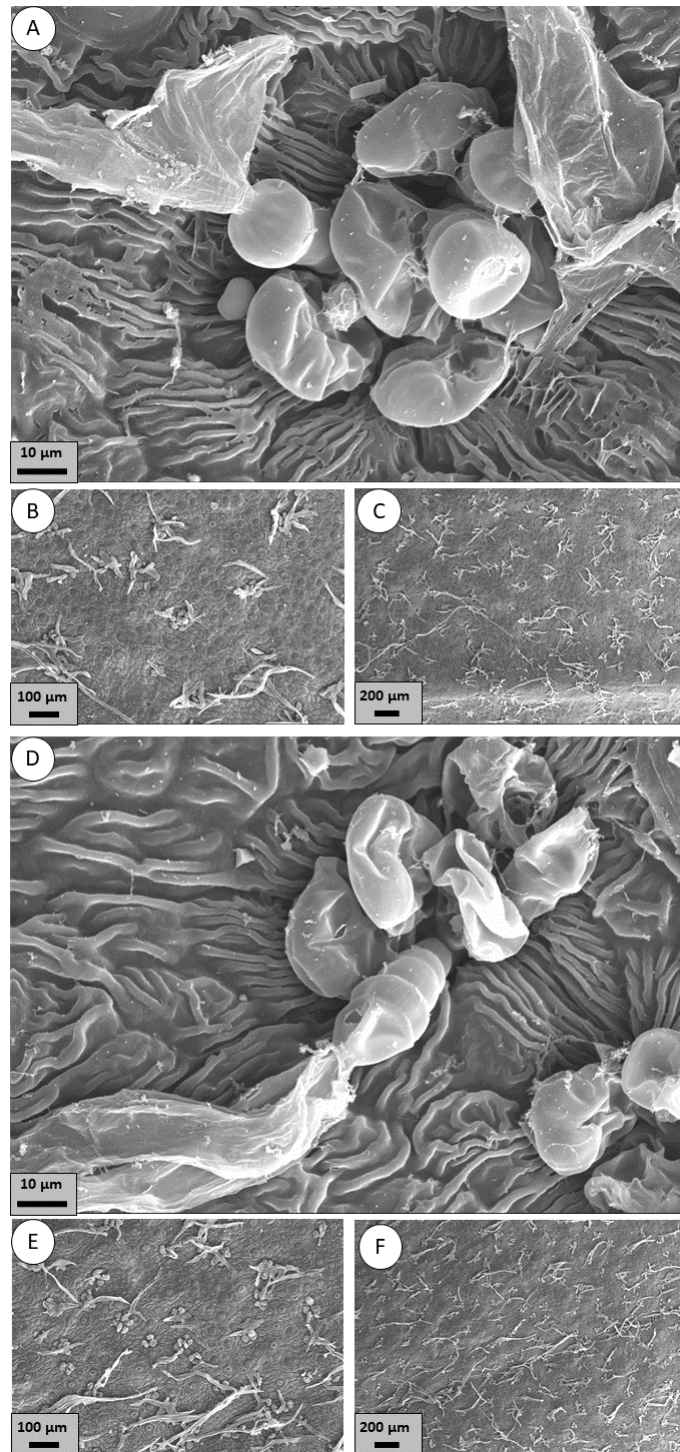


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia* coletada na estação seca (1BD IAC 08). A; B e C: Superfície Abaxial. D; E e F: Superfície adaxial. A e D: 2.000x. B e E: 250x. C e F: 100x; B e E: Imagens utilizadas para a contagem dos tricomas

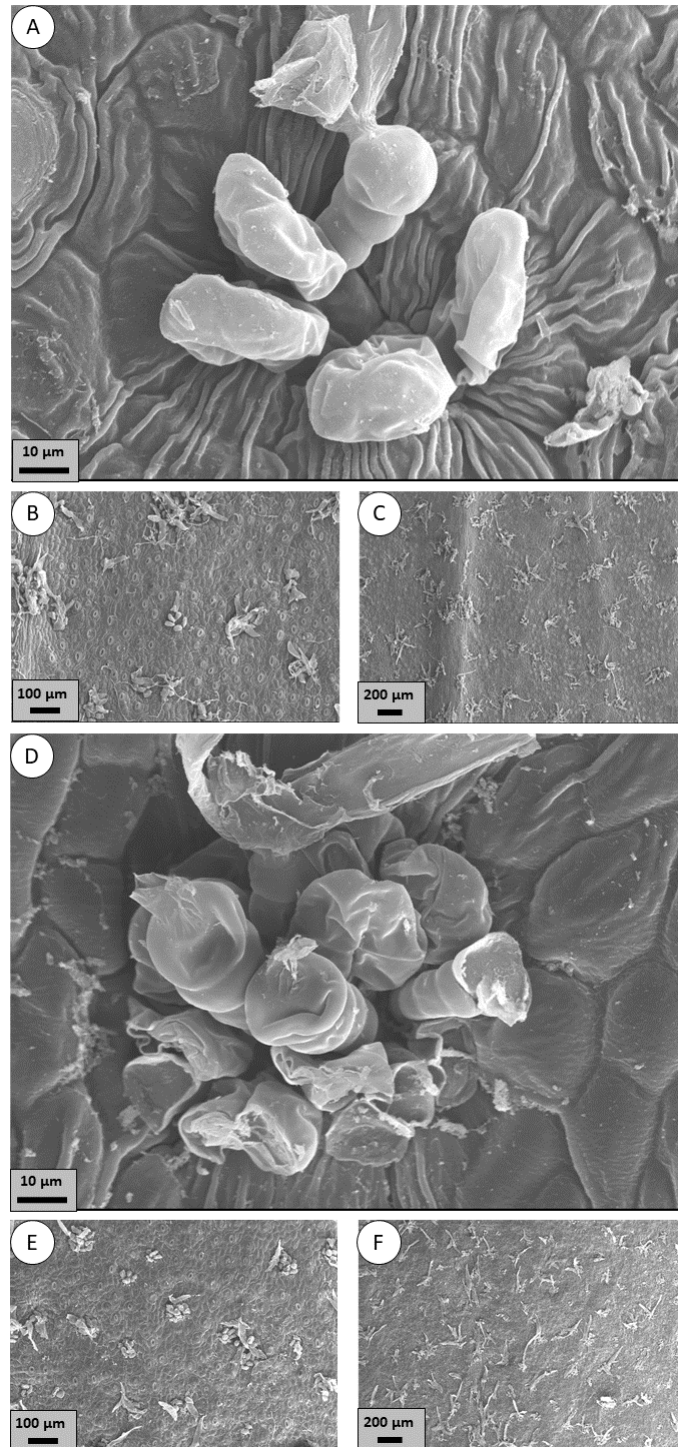


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de tricomas glandulares das folhas de *B. dracunculifolia* coletada na estação chuvosa (2BD IAC 08). A; B e C: Superfície Abaxial. D; E e F: Superfície adaxial. A e D: 2.000x. B e E: 250x. C e F: 100x; B e E: Imagens utilizadas para a contagem dos tricomas

Para a estação seca, a densidade de tricomas da superfície abaxial das folhas variou de 29 a 105, enquanto a densidade de tricomas da superfície abaxial da segunda coleta (estação chuvosa) variou de 46 a 110 (Figura 6). A média de tricomas glandulares na superfície abaxial das duas coletas foi de 74 e 82, com desvios padrão de 26 e 24, respectivamente (Figura 5).

Na superfície adaxial, a densidade de tricomas glandulares da primeira coleta variou de 92 a 213 (Figura 6), a média de tricomas da primeira coleta foi de 142, com um desvio padrão de 36 (Figura 5). Na segunda coleta, a densidade de tricomas glandulares variou de 77 a 138 (Figura 6), enquanto a média foi de 111, com um desvio padrão de 20 (Figura 5).

Apesar de ter sido encontrada diferença significativa no rendimento de óleos essenciais (Figura 5; Capítulo 1), o número médio de tricomas glandulares presentes nas superfícies abaxial e adaxial das folhas de *B. dracunculifolia* não variou estatisticamente nos períodos de coleta, realizadas no mês de setembro de 2021 (estação seca) e no mês de março de 2022 (estação chuvosa) estando em desacordo com o que foi observado por Ehleringer & Björkman, (1978); Tozin et al., (2015); Shibuya et al., (2016), para outras espécies vegetais. Tais resultados indicam que pode haver diferenças no armazenamento e na secreção de óleos essenciais, mas não na quantidade de tricomas glandulares presentes nesta espécie. O número de tricomas glandulares na superfície adaxial foi superior ao da superfície abaxial ($P < 0,001$), indicando que há uma variância significativa entre eles. Essa planta possui preferência por ambientes abertos e com alta luminosidade (PEGORINI et al. 2008), as substâncias secretadas pelos tricomas glandulares protegem a planta de raios ultravioleta (BUDEL et al. 2004), portanto, um maior número destes tricomas na parte superior de suas folhas, onde a exposição luminosa é maior, pode ser uma estratégia evolutiva utilizada por esta espécie.

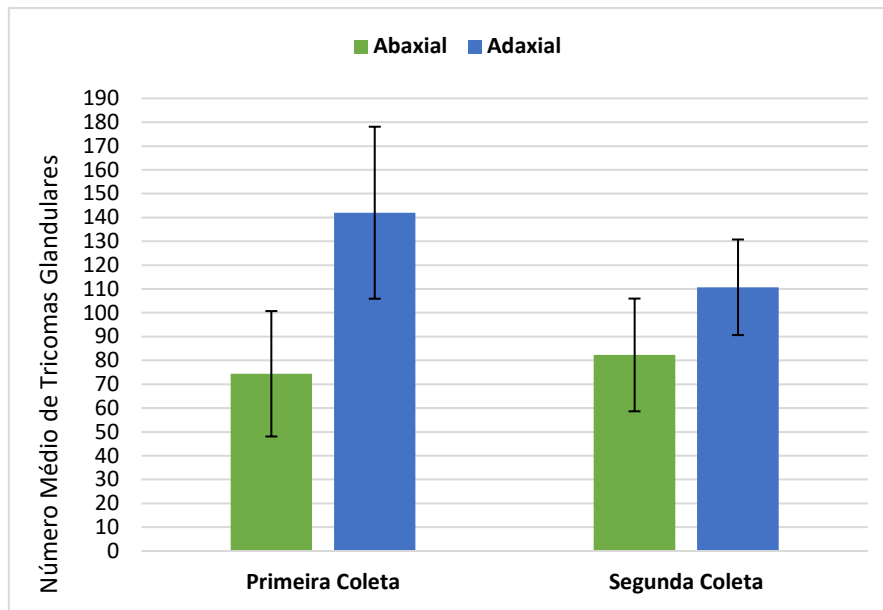


Figura 5: Densidade média de tricomas glandulares observados nas superfícies abaxial e adaxial das folhas de *B. dracunculifolia*; Desvio padrão de 26 e 24, primeira e segunda coleta da superfície abaxial; Desvio padrão de 36 e 20, primeira e segunda coleta da superfície adaxial.

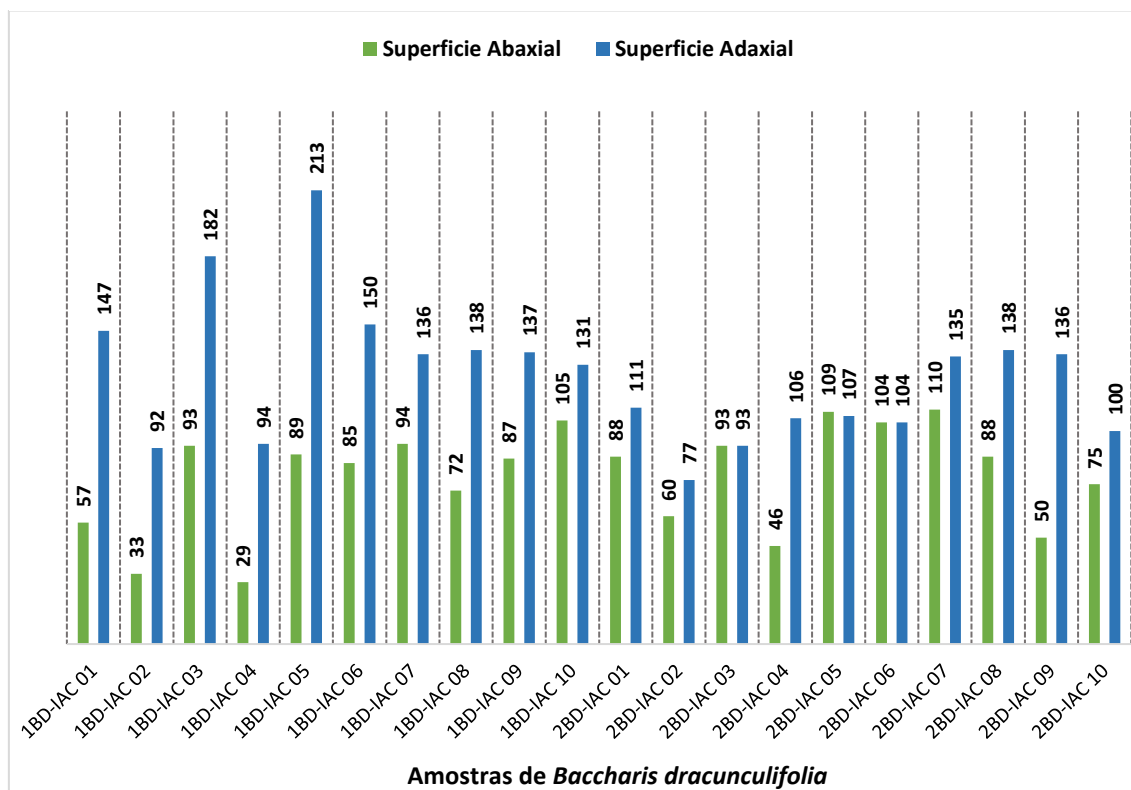


Figura 6: Número de tricomas glandulares observados nas superfícies abaxial e adaxial das folhas dos indivíduos de *B. dracunculifolia*; ANOVA dois fatores: Diferença significativa entre as superfícies da folha ($F = 284$, $P < 0,001$); nenhuma diferença significativa entre os períodos de coleta ($F = 1,055$, $P = 0,402$).

5.6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que não houve variância significativa na densidade de tricomas glandulares de *B. dracunculifolia* nos períodos de estiagem e de chuva (setembro/2021 e março/2022, respectivamente). Embora não tenha havido uma diferença significativa na densidade dos tricomas glandulares, o rendimento dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* foram maiores na segunda coleta, indicando que, apesar de não existir uma diferença na densidade destes tricomas, existe uma diferença na síntese dos óleos essenciais, cujo período chuvoso supera em porcentagem de rendimento o período de seca.

Em relação a densidade de tricomas das superfícies abaxial e adaxial, as superfícies adaxiais mostraram um número significativamente maior de tricomas glandulares, indicando que a superfície que possui maior exposição aos raios solares é evolutivamente adaptada para essa condição, possuindo estruturas secretoras de ceras, resinas e óleos essenciais, que além de outras funções, possuem funções fotoprotetoras.

5.7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Bickford, Christopher P. "Ecophysiology of leaf trichomes." *Functional Plant Biology* 43.9 (2016): 807-814.
- BUDEL, J.M., Duarte, M.D.R., Santos, C.D.M. and Farago, P.V., 2004. Morfoanatomia foliar e caular de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(4), pp.477-483.
- Ehleringer JR, Björkman O (1978) Pubescence and leaf spectral characteristics in a desert shrub, *Encelia farinosa*. *Oecologia* 36, 151–162.
- Gonçalves, E.G.; Lorenzi, H., 2007. *Morfologia Vegetal: Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 446p.
- Karnovsky, M.J., A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolarity for use Electron Microscopy. 1. *Cell Biol.* 27,137 A, 1965.
- Martínez-Natarén, D. A.; Parra-Tabla, V.; Dzib, G.; Calvo-Irabién, L. M., 2011. Morphology and density of glandular trichomes in populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K., Verbenaceae), and the relationship between trichome density and climate. *Journal of the Torrey Botanical Society* 138(2), pp. 134–144.
- Pegorini, F., Maranhão, L.T. and Rocha, L.D., 2008. Organização estrutural das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. *Rev. Bras. Farm.*, 89, p.3.

Shibuya T, Itagaki K, Ueyama S, Hirai N, Endo R (2016) Atmospheric humidity influences oviposition rate of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) through morphological responses of host *Cucumis sativus* leaves. *Journal of Economic Entomology* 109, 255–258.

Tozin, L. R. S.; Marques, M.O. M; Rodrigues, T. M., 2015. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (Online), 87, pp. 943-953.

Walker AR, Marks MD (2000) Trichome initiation in *Arabidopsis*. In ‘Advances in botanical research. Vol. 31’. (Eds DL Hallanan, JC Gray) pp. 213–233. (Academic Press: New York)

6. CONCLUSÃO GERAL

De uma forma geral, é possível concluir que o rendimento de óleos essenciais e a composição química dos óleos essenciais da população de *B. dracunculifolia* localizada em Águas de Santa Barbara - SP é influenciada pelos períodos de seca e de chuva. Foi observado que a estação seca favorece o rendimento dos óleos essenciais. Além deste resultado, foi observada diversidade química intraespecífica nos óleos essenciais desta população. A técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente permitiu a detecção e identificação de um número muito maior de substâncias, sendo de suma importância para estudos posteriores acerca desta espécie. Estes resultados são importantes para a determinação de melhores períodos de colheita.

Os estudos de avaliação de atividade antifúngica demonstraram que existem indivíduos cujo óleo essencial apresentam maior porcentagem inibitória contra os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, tais resultados evidenciam a importância do estudo de diferentes genótipos para uma espécie para a seleção daqueles cuja composição química atende as diferentes aplicações dos óleos essenciais, por exemplo, farmacêutico, cosmético, etc. Estudos complementares se fazem necessários para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e também em campo, para avaliar a efetividade destes óleos essenciais como defensivos agrícolas naturais.

Não foi observada diferença significativa na densidade de tricomas glandulares nas superfícies das folhas de *B. dracunculifolia* entre os períodos de coleta (estação seca e chuvosa), apesar de haver diferença significativa entre as superfícies abaxiais e adaxiais.