

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

**PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DE ÓLEO ESSENCIAL DE  
ACESSOS DE *Varronia curassavica* Jacq. EM DIFERENTES  
HORÁRIOS DE COLETA E PERÍODO SAZONAL**

**ANA PAULA DA SILVA MARQUES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Horticultura)

BOTUCATU-SP

Abril – 2016

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

**PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DE ÓLEO ESSENCIAL DE  
ACESSOS DE *Varronia curassavica* Jacq. EM DIFERENTES  
HORÁRIOS DE COLETA E PERÍODO SAZONAL**

**ANA PAULA DA SILVA MARQUES**

Orientador: Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Ortiz Mayo Marques

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Horticultura)

BOTUCATU-SP

Abril - 2016

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

M357p Marques, Ana Paula da Silva, 1986-  
Produtividade e perfil químico de óleo essencial de acessos de *Varronia curassavica* Jacq. em diferentes horários de coleta e período sazonal / Ana Paula da Silva Marques. - Botucatu : [s.n.], 2016  
xi, 61 f. : fots. color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2016  
Orientador: Filipe Pereira Giardini Bonfim  
Coorientador: Marcia Ortiz Mayo Marques  
Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais - Essências e óleos essenciais.  
2. Plantas medicinais - Variações sazonais. 3. Plantas - Análise. I. Bonfim, Filipe Pereira Giardini. II. Marques, Marcia Ortiz Mayo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. VI. Título.

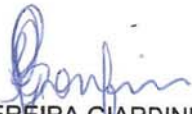
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

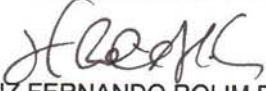
**TÍTULO: PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DE ÓLEO ESSENCIAL  
DE ACESSOS DE VARRONIA CURASSAVICA JACQ. EM  
DIFERENTES HORÁRIOS DE COLETA E PERÍODO SAZONAL**

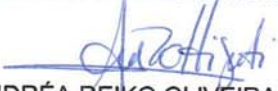
**AUTORA: ANA PAULA DA SILVA MARQUES**

**ORIENTADOR: FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM**

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

  
Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM  
Dep Horticultura / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

  
Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA  
Dep Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu

  
Dr<sup>a</sup> ANDRÉA REIKO OLIVEIRA HIGUTI  
Grupo Centroflora / Anidro do Brasil

Botucatu, 29 de fevereiro de 2016.

***DEDICO***

***À minha família, em especial ao meu pai Ariovaldo, minha mãe Ana Maria e  
minhas irmãs Ana Tereza e Ana Claudia, sem os quais eu nada seria.***

***Minha felicidade e vitória também pertencem a vocês.***

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Horticultura), por me permitir a realização deste mestrado, ao qual sempre almejei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim, pelo apoio, direcionamento, confiança na realização deste projeto, além da paciência e atenção durante este período tão importante ao meu crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Ortiz Mayo Marques pelo auxílio na realização das análises e disponibilidade de ajuda e direcionamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos a mim concedida, sem a qual este feito não seria possível.

À Centroflora (Anidro do Brasil) pelo acesso ao material vegetal que possibilitou esta pesquisa, bem como pelo apoio das atividades da mesma, através de suas funcionárias Andréa e Raquel.

Aos amigos que, próximos ou distantes, auxiliaram com palavras e atos de carinho, apoio e incentivo, além dos que partilharem seus lares comigo em muitos momentos.

Aos professores e pesquisadores Luiz Roberto Hernandez Bicudo, Ricardo Costa Rodrigues de Camargo e Kátia Sampaio Malagodi-Braga, por me orientarem durante meu período de graduação e conclusão de curso, me direcionando com carinho e sabedoria nos primeiros passos da minha vida acadêmica.

Às eternas meninas do Bloco 02 da Moradia Estudantil da UNESP de Botucatu, minhas amigas ontem e hoje, Camila Vaz de Souza, Karen Lorenzetti, Camila Azevedo e Sandy Mendes. A vocês ofereço meu amor e irmandade.

Aos professores de Pós-graduação do Departamento de Horticultura, pelo conhecimento compartilhado e amizade.

Aos amigos do laboratório, Dayane, Helena, Sthefani, Lucas, Nathália, Jordany, Daniela, Lucas, Priscila, José Pernambuco, Ana Luiza, Aline e Carla.

À técnica Daniela, do Laboratório de Produtos Naturais – IAC, e aos estagiários, Bruno, Larissa e Letícia pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

Aos que de forma direta ou indireta contribuíram para este feito, que mais do que a obtenção de um título, é a realização de um sonho

## SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo geral.....	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1 <i>Varronia curassavica</i> Jacq.....	10
3.2 Metabólitos secundários.....	12
3.3 Óleos essenciais.....	13
3.4 Sazonalidade.....	15
3.5 Horário de coleta.....	15
3.6 Tempo de extração.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Experimento I – Determinação de tempo de hidrodestilação de material vegetal foliar de <i>V. curassavica</i> Jacq .....	22
4.2. Experimento II - Rendimento de óleo essencial em diferentes acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função dos horários de coleta nas estações do ano.....	23
4.3. Experimento III - Rendimento de óleo essencial e perfil químico dos acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função da sazonalidade.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26

5.1 Experimento I - Determinação de tempo de hidrodestilação de material vegetal foliar de <i>V. curassavica</i> Jacq.....	26
5.2 Experimento II – Rendimento de óleo essencial em diferentes acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função de horários de coleta nas estações do ano.....	31
Primavera/2015.....	31
Verão/2015.....	32
Outono/2015.....	34
Inverno/2015.....	35
5.3. Experimento III – Rendimento de óleo essencial e perfil químico dos acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função da sazonalidade.....	37
6. CONCLUSÕES.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	56

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1- Temperaturas médias e precipitação registrados durante o período, desde o início do experimento, na cidade de Botucatu/SP, no Campus da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP. Botucatu/SP, 2015.....	19
Gráfico 2- Rendimento de óleo essencial de acesso de <i>V. curassavica</i> Jacq., sob diferentes tratamentos de tempo de hidrodestilação. Botucatu/SP, 2015.....	27

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 - A) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário do Rio de Janeiro. B) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário da Bahia. C) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário de São Paulo. D) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário do Piauí.....21
- Figura 2 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. acesso de origem São Paulo, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.....41
- Figura 3 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. do acesso de origem Bahia, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.....42
- Figura 4 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. do acesso de origem Piauí, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.....43
- Figura 5 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. do acesso de origem Rio de Janeiro, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.....44

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Temperaturas médias, mínimas, máximas e pluviosidade dos períodos de coleta do material vegetal de <i>V. curassavica</i> Jacq. Botucatu/SP, 2015-16.....	19
Tabela 2 – Substâncias identificadas em amostras de óleo essencial de <i>V. curassavica</i> Jacq. sob diferentes tempos de hidrodestilação. Botucatu/SP, 2015.....	27
Tabela 3 - Análise de variância por regressão dos rendimentos de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função dos horários de coleta. Botucatu/SP, 2015.....	29
Tabela 4 - Análise de variância das concentrações de $\alpha$ -pineno, ( <i>E</i> )-cariofileno, $\alpha$ -humuleno, 9-epi-( <i>E</i> )-cariofileno e $\beta$ -pineno em óleo essencial de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função dos tempos de hidrodestilação. Botucatu-SP, 2015.....	30
Tabela 5 - Análise de variância do rendimento de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> em função dos horários de coleta. Botucatu/SP, 2015.....	31
Tabela 6 – Valores médios do rendimento de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> , na estação da primavera. Botucatu/SP, Novembro de 2015.....	32
Tabela 7 - Valores médios de rendimentos de óleo essencial de acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função do horário de coleta, na estação da primavera. Botucatu-SP, Novembro de 2015.....	32
Tabela 8 - Análise de variância do rendimento de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> em função dos horários de coleta. Botucatu/SP, 2015.....	33

Tabela 9 – Valores médios de rendimento de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> , na estação do verão. Botucatu/SP, Janeiro, 2016.....	33
Tabela 10 - Valores médios de rendimentos de óleo essencial de acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função do horário de coleta no verão. Botucatu/SP, Janeiro de 2016.....	34
Tabela 11 - Análise de variância dos valores médios de rendimento de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> , na estação do outono. Botucatu/SP, Abril de 2015.....	34
Tabela 12 - Médias dos rendimentos de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> na estação do outono. Botucatu/SP, Abril de 2015.....	35
Tabela 13 - Análise de variância dos rendimentos de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> durante a estação do inverno. Botucatu/SP, Julho de 2015.....	35
Tabela 14 – Valores médios de rendimento de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> , na estação do inverno. Botucatu/SP, Julho de 2015.....	36
Tabela 15 - Análise de variância do rendimento de óleo essencial dos acessos de <i>V. curassavica</i> entre as estações do ano. Botucatu/SP, 2016.....	37
Tabela 16 - Médias dos rendimentos de óleo essencial de <i>V. curassavica</i> entre as estações do ano em função dos acessos. Botucatu-SP, 2015.....	38
Tabela 17 - Médias dos rendimentos de óleo essencial de acessos de <i>V. curassavica</i> em função das estações do ano. Botucatu-SP, 2015.....	38
Tabela 18 – Valores médios de rendimentos de óleo essencial de acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em função das estações do ano. Botucatu-SP, Janeiro de 2016.....	38

Tabela 19 - Porcentagem relativa das substâncias identificadas nos óleos essenciais de diferentes acessos de <i>V. curassavica</i> Jacq. em cada estação do ano. Botucatu-SP, 2015.....	45
Tabela 20 – Análise de variância das proporções relativas de $\alpha$ -humuleno em óleo essencial de acessos de <i>V. curassavica</i> em função das estações do ano. Botucatu/SP, 2015.....	48
Tabela 21 – Proporção relativa média de $\alpha$ -humuleno em óleo essencial de acessos de <i>V. curassavica</i> . Botucatu/SP, 2015.....	48
Tabela 22 - Médias de concentrações de $\alpha$ -humuleno em óleo essencial de <i>V. curassavica</i> em função das estações do ano. Botucatu/SP, 2015.....	48

PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE *Varronia curassavica* Jacq. EM DIFERENTES HORÁRIOS DE COLETA E PERÍODO SAZONAL. Botucatu, 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Autora: Ana Paula da Silva Marques

Orientador: Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim

Coorientadora: Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques

## RESUMO

Nativa da Mata Atlântica, *Varronia curassavica* Jacq. é uma espécie vegetal arbustiva, pertencente à família Boraginaceae, utilizada na medicina popular no combate a inflamações, úlceras, artrite, como também por seus efeitos anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante e de combate à febre. Seu papel medicinal se dá em virtude da ação terapêutica de seu óleo essencial, que é produzido e armazenado em seus tricomas glandulares, que recobrem a superfície foliar. Este estudo teve por objetivo caracterizar o rendimento e o perfil do óleo essencial de quatro acessos de *V. curassavica* Jacq. em diferentes horários do dia e da sazonalidade, de forma facilitar o planejamento do manejo de acordo com o perfil e rendimento de óleo desejado, bem como identificar possíveis variações de perfil entre os acessos. O material vegetal trabalhado foi oriundo de diferentes estados brasileiros, entre eles, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro e Piauí, porém cultivados na cidade de Botucatu/SP, e o sistema de extração de óleo essencial utilizado foi o de hidrodestilação em aparato Clevenger. Somente as folhas foram utilizadas no preparo das amostras. Os tratamentos de horário de coleta em cada estação foram: 06h, 09h, 12h, 15h e 18h, contando com quatro repetições cada. Para avaliar o efeito de sazonalidade, amostras foram colhidas dentro dos horários na primavera, verão, outono e inverno, 15 dias após o início da estação. O rendimento foi calculado com base na massa seca das amostras e os dados foram submetidos à análise estatística de variância, além de regressão e teste de médias quando necessário. Os dados demonstram a ocorrência de diferentes rendimentos

de óleo essencial entre os acessos no decorrer do dia e nas estações do ano. Sendo que o acesso que mais se destacou em rendimento durante o ano foi o nativo da Bahia. Os horários de maiores rendimentos de óleo essencial foram os das 06h e 09h. A partir da análise da composição química do óleo essencial, percebe-se que os acessos trabalhados apresentam diferentes perfis químicos, ocorrendo maior similaridade de composição entre os acessos do sudeste, e que as concentrações dos compostos variam em função da estação do ano.

Palavras-chave: erva-baleeira, plantas medicinais, óleo essencial, sazonalidade.

PRODUCTIVITY AND CHEMICAL PROFILE OF ESSENTIAL OIL IN POPULATIONS OF *Varronia curassavica* Jacq. AT DIFFERENT COLLECTION TIMES AND SEASONAL PERIOD. Botucatu, 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Author: ANA PAULA DA SILVA MARQUES

Adviser: PROF. DR. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

Coadviser: Dra. MRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

## SUMMARY

Native of the Atlantic Forest, *Varronia curassavica* Jacq. it's a shrubby plant species belonging to the Boraginaceae family, used in folk medicine to fight inflammation, ulcers, arthritis, as well as for its anti-inflammatory, analgesic, healing and anti-fever. His medical paper occurs due to the therapeutic action of the essential oil, that is produced and stored in their glandular trichomes, that covers your foliar surface. This research project aimed to characterize the yield and essential oil profile of four accesses *V. curassavica* Jacq. at different harvesting daytime at each season, in order to facilitate the planning of management according to the profile and yield of desired oil, as well as identify possible variations profile among accesses. Plant materials worked are from different Brazilian states, including Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro and Piauí, but growing in the city of Botucatu/SP, and the essential oil extraction system used to hydrodistillation was Clevenger apparatus. Only the leaves were used to prepare the samples. The harvesting schedule treatments at each season were: 06am, 09am, 12pm, 03pm and 06pm, with four replications each. To evaluate the effect of seasonality samples were collected in the spring, summer, autumn and winter, 15 days after the start of season. The yield was calculated based on the dry weight of the samples and the data were subjected to statistical analysis of variance, and regression and factor analysis when necessary, in Assistat software. The data demonstrate the occurrence of different essential oil yield between accesses throughout the day and the seasons. The access that stood out in

income during the year was the native of Bahia. From the chemical analysis of the essential oil composition, we can see that accesses worked have different chemical profiles, occurring greater compositional similarity between the southeastern access, and that the concentrations of the compounds vary according to the season.

Keywords: erva-baleeira, medicinal plants, essential oil, seasonality.

## 1. INTRODUÇÃO

Indícios arqueológicos apontam a utilização de plantas medicinais pelo homem desde épocas pré-históricas. Estas e outras evidências sugerem que o uso de plantas para fins medicinais é a mais antiga e mais difundida forma de medicação da história humana, sendo que as principais fontes de medicamentos no mundo, até o século passado, eram animais ou vegetais. De fato, não somente os seres humanos utilizam plantas medicinais. Tem se registro de populações de outros primatas onde foi observado o uso repetitivo de espécies vegetais que possuem compostos de caráter analgésico, antimicrobiano, anti-inflamatório, imunoestimulante, antidiarreico, digestivo e regulatório reprodutivo. Nestes casos, há ainda indícios da seleção e administração das plantas para determinados males (HALBERSTEIN, 2005).

Segundo Gurib-Fakim (2006), a maior parte da população mundial ainda utiliza as tradicionais *matéria medica* (plantas medicinais, animais, minerais, fungos ou outros materiais) em seus cuidados diários de saúde. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80% da população global, especialmente os povos de países em desenvolvimento, tem suas prescrições médicas baseadas em substâncias derivadas de

plantas medicinais (moléculas naturais ou análogas sintéticas). Este hábito parte do profundo conhecimento de povos tradicionais que, através de método de tentativa e erro durante séculos, gerou informações que foram transmitidas entre gerações de forma verbal. Grande parte dos fármacos utilizados pela medicina alopática moderna tem sua raiz na medicina tradicional destes povos.

Este poder de cura e/ou melhoria da qualidade de vida advém do benefício que estas plantas trazem à saúde humana. Dentre as substâncias existentes no organismo vegetal, algumas têm destaque por seus efeitos no combate à vasta gama de doenças e males, e entre elas estão os metabólitos secundários vegetais.

A Organização Mundial da Saúde tem incentivado que seus Estados membros procurem integrar ou inserir a medicina tradicional, ou medicina complementar integrativa, em seus sistemas de saúde, caso do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil. Nesse sentido, foi aprovada no Brasil a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS, no ano de 2006, que incluiu, em caráter complementar, a medicina tradicional chinesa, plantas medicinais e fitoterápicos no sistema de atendimento à saúde (BRASIL, 2012).

Em fevereiro de 2009 foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) pelo Departamento de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (DAF/SCTIE/MS) (RENISUS, 2009), com setenta e uma espécies. Esta lista irá nortear as ações para seleção de espécies da RENAFITO, com potencial de avançar no desenvolvimento da cadeia produtiva e de geração de fitoterápicos para o SUS. Recomenda-se, portanto, a organização do setor produtivo, legalmente estabelecido e atendendo as Boas Práticas e as normas sanitárias, regulamentadas pela ANVISA (BRASIL, 2006).

Dentre as 71 espécies selecionadas, destaca-se a planta objeto deste estudo, *Varronia curassavica* Jacq., de sinonímia *Cordia verbenaceae*, popularmente conhecida como erva-baleeira. Diante do uso desta espécie para fins medicinais, desponta a demanda de informações referentes ao seu cultivo, de forma a garantir material vegetal de qualidade, que bem manipulado, resulte em medicamento eficiente. Nesse sentido, este estudo visa: observar se ocorre diferença de rendimento de óleo essencial em diferentes horários de coleta, bem como entre as estações do ano; qual o tempo necessário de

hidrodestilação para obtenção de maior rendimento de óleo essencial e comparar os perfis químicos dos óleos essenciais resultantes dos diferentes acessos de *V. curassavica* Jacq. sob cada tratamento, a fim de avaliar possíveis diferenças químicas e produtivas de materiais de origens geográficas diversas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar o rendimento e o perfil do óleo essencial de diferentes acessos de *Varronia curassavica* Jacq. sob diferentes horários de coleta e períodos sazonais, além de determinar o melhor tempo de hidrodestilação para o material foliar da espécie.

### **2.2. Objetivos específicos**

a) Determinar se o tempo de hidrodestilação de material vegetal foliar de *V. curassavica* Jacq., influencia o rendimento e/ou perfil químico do óleo essencial;

b) Testar tratamentos de diferentes horários de coleta para cada acesso de *V. curassavica* Jacq. visando maior rendimento de óleo essencial por coleta;

c) Avaliar se ocorre influência sazonal nos rendimentos de óleo essencial nos acessos de *V. curassavica* Jacq.;

d) Caracterizar os óleos dos acessos nos diferentes experimentos, de forma facilitar a escolha do horário de coleta de acordo com o perfil e rendimento de óleo desejado, bem como identificar possíveis variações de perfil entre os acessos e período sazonal.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Varronia curassavica* Jacq.

Dentre as dicotiledôneas há a família botânica Boraginaceae, grupo com diversas espécies de plantas medicinais. Com distribuição em regiões temperadas e tropicais, inclui 140 gêneros e 2700 espécies, sendo que destes, 11 gêneros e cerca de 120 espécies são encontrados no Brasil. Sua família se compõe de árvores, arbustos e ervas; raramente lianas. Suas espécies apresentam folhas simples, com disposição alterna, margem inteira ou serrada, sem estípulas. A inflorescência é cimosa, com flores bissexuadas, majoritariamente actinomorfas e diclamídeas. Seus frutos são geralmente drupas, mas ocorrem esquizocarpos e cápsulas. A maioria das espécies arbustivas do gênero *Cordia*, pertencentes à Boraginaceae, foram recentemente reconsideradas do gênero *Varronia* (SOUZA, LORENZI, 2012) e dentre elas se encontra *Varronia curassavica* Jacq..

*V. curassavica* Jacq. (sinonímia = *Cordia verbenaceae* DC.) ocorre naturalmente na América do Sul e Central, no Brasil estando presente na região da costa brasileira, dentro da Mata Atlântica em dunas litorâneas, solos arenosos ou áreas de restinga, e em campos rupestres. A espécie é perene e geralmente encontrada entre 500 e 1000m de distância da praia. Planta arbustiva atinge até 2m de altura, possui fuste muito ramificado, folhas sésseis, pubescentes na face inferior e lanceoladas. Sua inflorescência é densa, com pedúnculo ereto e flores brancas. Seus frutos são subglobosos e vermelhos (FEIJÓ et al., 2014; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI, 2012).

O óleo essencial de *V. curassavica* é produzido e armazenado em seus tricomas glandulares que recobrem a superfície foliar (FEIJÓ et al., 2014). As partes aéreas da planta são utilizadas para o preparo de extratos alcoólicos, infusões e decocções desde os tempos coloniais pela medicina popular tradicional devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antireumático, analgésico, cicatrizante (CARVALHO et al., 2004) e combate à febre (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Seus benefícios já são registrados por pesquisas científicas, comprovando sua ação antibacteriana (CARVALHO et al., 2004; HERNANDEZ et al., 2007), anti-inflamatória e antialérgica (PASSOS et al., 2007), antiulcerogênica (ROLDÃO et al., 2008) e antifúngica (HERNANDEZ et al., 2007; NIZIO et al., 2015).

Em função dos efeitos benéficos registrados, a pomada e o emplastro produzidos a partir das folhas de *V. curassavica* fazem parte do rol registrado no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, indicados por seu efeito anti-inflamatório (BRASIL, 2011). De fato, a espécie é utilizada na produção de medicamentos industrializados, o que exige a produção massiva de sua biomassa vegetal, o que levou à implementação de monoculturas da planta (ROSA et al., 2008).

Outro diferencial desta espécie é que seu óleo essencial é insumo na produção do que veio a ser o primeiro fitoterápico anti-inflamatório desenvolvido totalmente no Brasil, no ano de 2005, pelo Laboratório Aché, presente na forma de creme e com o nome comercial de Acheflan® (GONELI et al., 2014).

### 3.2. Metabólitos secundários

Compostos metabólicos primários são produzidos por processos fisiológicos básicos à sobrevivência vegetal, tais como fotossíntese, Ciclo de Krebs e a glicólise, que dão origem ou disponibilizam açúcares, aminoácidos, compostos intermediários do Ciclo de Krebs, ácidos tricarbóxicos, além de proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos. Metabólitos primários são moléculas majoritárias na estrutura física e no metabolismo da planta. Já os compostos secundários provêm de processos derivados das rotas metabólicas primárias, são numerosos e difundidos principalmente entre vegetais superiores. Até 1985, 20.000 compostos secundários foram descritos e desde então, anualmente mais 1.000 são relatados (SEIGLER, 2010).

Inicialmente, durante os estudos dos metabólitos vegetais, os compostos secundários foram descritos por Kossel (1891) como opostos aos primários. Posteriormente este conceito foi retrabalhado devido a possível origem dos metabólitos secundários a partir de mudanças secundárias do metabolismo nitrogenado vegetal, sendo então denominados de “endproductts”. Quando comparados aos metabólitos primários, os secundários se apresentam em menor quantidade, frequentemente representando menos de 1% do carbono vegetal. São acumulados em células ou órgãos específicos e estão diretamente relacionados às interações da planta com seu ecossistema, atuando como protetores contra radiação ultravioleta, antibióticos, antifúngicos, antivirais e, em alguns casos, antigerminativos, tóxicos para outros indivíduos vegetais (alelopatia) ou apresentando efeito antialimentar em herbívoros (BOURGARD et al., 2001).

Valdés e Balbín (2000) conceituam os metabólitos secundários como produtos derivados da biossíntese, transformação e degradação de compostos endógenos vegetais.

Característica que diferenciam metabólitos secundários dos primários é o fato dos mesmos estarem presentes em grupos vegetais, cujas linhagens foram selecionadas evolutivamente e onde estes compostos se direcionam a certas necessidades do vegetal, como por exemplo, compostos voláteis na atração de polinizadores (PICHERSKY; GANG, 2000).

Os papéis ecológicos dos metabólitos secundários incluem defesa contra herbívoros e patógenos, mediação de atração de polinizadores e de relação com fungos micorrízicos, sinalização planta-planta e proteção contra radiação, seca e geada. Uma população de plantas pode apresentar polimorfismo presença-ausência de metabólitos secundários individuais, mas geralmente o que ocorre é uma variação quantitativa nas concentrações destas substâncias. As diversidades quantitativas e qualitativas dos compostos influenciam as interações ecológicas do vegetal, sendo que pequenas variações estruturais nos mesmos podem provocar possibilidade de diferentes efeitos. Estas modificações químicas ocorrem devido à carga genética do indivíduo, ao ambiente e à interação entre ambos, resultando numa alteração fenotípica ontogênica e fisiológica. Idade, tamanho da planta, mudanças de disponibilidade de recursos e estratégia de sobrevivência podem influenciar as concentração destes metabólitos no vegetal. O ambiente físico ou biótico podem gerar alterações nos tipos e nas quantidades de metabólitos produzidos como resultado de adaptações locais ou pela triagem e seleção genotípica através do habitat (MOORE et al., 2013).

Os metabólitos secundários têm como exemplo os alcalóides, terpenos, compostos fenólicos e aminoácidos não proteicos, e agem diretamente sobre o crescimento, desenvolvimento e fisiologia do vegetal (DAI et al., 2014). Estas substâncias atuam como importantes agentes de defesa das plantas e compõe algumas das características chaves de suas propriedades antiherbívoras. Níveis destes metabólitos variam largamente intra e interespecificamente e podem ser traduzidos como variações na resistência do vegetal contra herbívoros e patógenos (O'REILLY-WAPSTRA; MILLER; POTTS, 2014).

### **3.3 Óleos essenciais**

Compostos lipofílicos, altamente voláteis e com peso molecular abaixo de 300, são definidos pela Organização Internacional de Padronização como "produto obtido a partir de matéria-prima vegetal, por destilação com vapor d'água". A maioria dos óleos essenciais disponíveis no mercado são obtidos mediante processo de hidrodestilação e geralmente se apresentam menos densos que a água. Estes óleos

essenciais, além de seu uso flavorizante, representam uma alternativa “verde” nas áreas da nutrição, cosmética, de perfumaria, farmacêutica e agrícola, devido ao seu efeito antimicrobiano, antiviral, antifúngico, inseticida, nematicida, analgésico, sedativo e por suas propriedades aromáticas e antioxidantes. Cada óleo pode ser composto desde apenas poucas substâncias até mais de 100 compostos individuais (TUREK & STINTZING, 2013; BAKKALI et al., 2008).

Seus componentes incluem, principalmente, duas classes de metabólitos secundários de diferentes origens biossintéticas, o dos terpenos, principal grupo, e o dos fenilpropanóides. (BAKKALI et al., 2008). Constituindo complexa mistura de substâncias químicas orgânicas, são líquidos aromáticos presentes em diversos órgãos vegetais (folhas, caules, raízes, frutos e sementes) e apresentam compostos bioativos polares e apolares. Sua estrutura química é composta de terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos majoritariamente); compostos aromáticos (aldeídos, álcoois e fenóis) e terpenoides (compostos oxigenados) (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

A característica hidrofóbica de seus componentes se mostra interessante meio de ação, já que permite sua passagem pelas membranas celulares e mitocondriais das células bacterianas tornando-as mais permeáveis, acarretando um efluxo de íons e moléculas que conduz à morte celular (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2011).

Devido à versatilidade de uso, óleos essenciais, e seus componentes quando isolados, estão presentes em diferentes momentos do nosso dia a dia, como em produtos cosméticos, por suas características odoríferas e preservação antimicrobiana (HERMAN et al., 2012), e em medicamentos; no combate a infecções bacterianas, fúngica e virais. Dentro do setor produtivo agropecuário, óleos essenciais estão presentes em insumos agroquímicos herbicidas e antimicrobianos (CAMPIGLIA et al., 2007) e na descontaminação ou inibição de patógenos em alimentos de origem animal (HERNÁNDEZ-OCHOA et al., 2011), podendo promover maior *shelf life*.

Para a conservação de suas propriedades, plantas que apresentam óleos essenciais devem ser manipuladas corretamente e sua extração deve ser efetuada cuidadosamente, de forma a evitar possíveis contaminações e alterações químicas durante ou após a extração.

### **3.4. Sazonalidade**

A sazonalidade pode ser definida como conjunto de variações ambientais regulares ou como as respostas biológicas condicionadas por estas variações. O crescimento e o desenvolvimento vegetal estão atrelados aos ciclos sazonais, de forma que as estações atuam como fator natural de integração (BATTEY, 2000). Dentro da produção de óleo essencial por espécies vegetais ocorrem influências de variáveis como fotoperíodo, temperatura, estresse hídrico, fase de desenvolvimento do vegetal, geografia e outros fatores climáticos, além de condições de secagem na pós-colheita e forma de destilação, os quais também afetam o conteúdo do óleo produzido (OZKAN et al., 2009).

De acordo com a estação do ano, em decorrência das mudanças climáticas, diferentes estímulos são recebidos pelos vegetais, que podem acarretar alterações fisiológicas, dentre elas possíveis mudanças no metabolismo vegetal secundário vegetal (GATTI et al., 2014), como a produção diferencial de compostos fenólicos em função da estação do ano (NCUBE et al., 2011), aumento ou decréscimo de rendimentos e/ou de concentração de substâncias em óleos essenciais (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2005; SANTOS et al., 2012), assim como diferentes produções de flavonoides e polifenóis (CHAVES et al., 2013). É possível observar inclusive produtividades diferenciadas de óleo essencial em função da fase do ciclo do vegetal, como fase vegetativa, de pré-floração, floração plena, final de floração e frutificação (OZKAN et al., 2009; ZAWISLAK, 2013; SALEHI et al., 2014; KPOVIESSI et al., 2012).

Além da influência qualitativa, o período do ano pode acarretar variações quantitativas, como o rendimento diferenciado de óleo essencial em plantas aromáticas. Neste sentido, estudos têm sido promovidos para caracterizar a produção de óleo essencial e auxiliar na compreensão da forma de atuação destas variáveis em seu rendimento.

### **3.5. Horário de coleta**

Da mesma forma que para o fator de sazonalidade, pesquisas tem procurado caracterizar as variações de rendimento e de composição de óleos essenciais em

função do horário de coleta do material vegetal de cada espécie de interesse. Os resultados demonstram que não ocorre padrão universal de comportamento produtivo quanto ao horário de coleta, se registrando resultados para diferentes espécies em que há maiores rendimentos em horários da manhã (KPOVIESSI et al., 2012), outras em que as maiores produções ocorrem no período da tarde (SANTOS et al., 2012; SOUZA et al., 2010) e outras ainda onde não há diferença significativa entre os horários (SILVA et al., 2005; COSTA et al., 2014).

Similarmente ao que acontece com o rendimento, os horários de coleta podem influenciar a composição química dos óleos essenciais nas concentrações relativas de compostos (SANTOS et al., 2012; SOUZA et al., 2010; ASGHARI et al., 2014; ESMAEILIAN et al., 2012, SHIWAKOTI et al., 2015), na proporção relativa de classes de substâncias como monoterpeno e sesquiterpenos (KPOVIESSI et al., 2012), bem como podem não influenciar as concentrações (CHANG et al., 2009).

Assim sendo, avaliar a produtividade qualitativa e quantitativa de óleo essencial de uma espécie de interesse em função dos horários de coleta é fundamental para se compreender a dinâmica produtiva do vegetal, o que pode nortear a forma de manejo, auxiliando na obtenção de um perfil químico padrão almejado para um produto final de qualidade.

### **3.6. Tempo de extração**

Óleos essenciais devem ser extraídos de forma a não sofrerem aquecimento excessivo, o que pode ser realizado através de diferentes métodos. Por sua natureza lipofílica, são solúveis em solventes orgânicos e imiscíveis em água, onde quando em contato, pela diferente densidade se separam da água por decantação, formando uma fase de óleo e outra de água. Entretanto, o tipo de extração adotado varia de acordo com o órgão vegetal trabalhado (ASBAHANI et al., 2015).

Dentre os meios de extração de óleo essencial há a hidrodestilação em aparato Clevenger, onde ocorre o aquecimento da amostra embebida em água, que atinge cerca de 100°C, temperatura maior que o ponto de ebulição dos componentes do óleo essencial, volatilizando-o. Após a volatilização, vapor d'água e compostos do óleo

essencial passam por um condensador. Como a água é imiscível com o óleo essencial, formam-se duas fases (óleo e água), sendo a mistura recebida no frasco separador (ABDELLATIF; HASSANI, 2015).

Estudos de óleos essenciais extraídos em aparato Clevenger demonstram que o tempo de processamento de amostras para obtenção de máximo rendimento varia de acordo com a espécie, como 60 minutos para *Mentha x piperita* var *citrata* (OLIVEIRA et al., 2012); 130 minutos para *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf; 150 minutos para *Cymbopogon winterianus* Jowitt, *Hyptis pectinata* Poit e *H. fruticosa* Salm. et Benth; 160 minutos para *Lippia sidoides* Cham. e 230 minutos para *Eucalyptus globulus* Labill. (EHLERT et al., 2006).

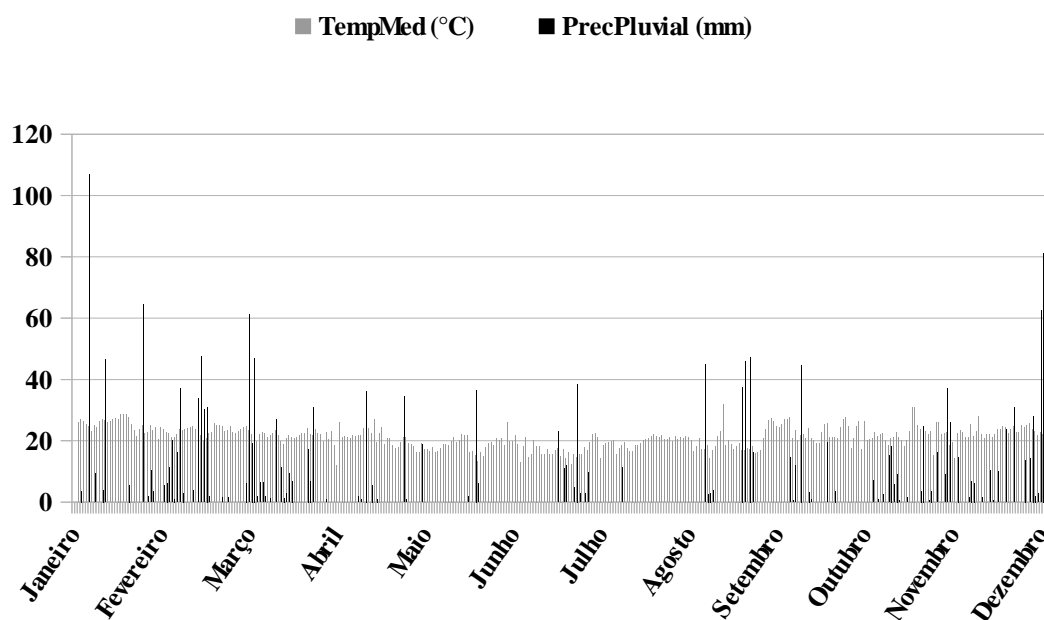
Desta forma, a determinação do tempo de hidrodestilação para o material vegetal foliar de *V. curassavica* Jacq. é fundamental, visando estabelecer o protocolo para obtenção de máximo rendimento de óleo essencial desta espécie por este meio.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Plantas Mediciniais do Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, campus de Botucatu – SP e no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC).

A cidade de Botucatu está situada a 22°51'S e 48°26'O, a 786 m de altitude. O clima do município é descrito como *Cfa*, sendo o clima temperado quente (mesotérmico) com chuvas no verão e seca no inverno, e com temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C (CUNHA; MARTINS, 2009).

Os dados meteorológicos das estações do ano foram cedidos pelo Departamento de Solos e Recursos Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu. A temperatura média e a precipitação pluviométrica do período estão demonstradas no Gráfico 1.



**Gráfico 1** – Temperaturas médias e precipitação registradas durante o período do experimento na cidade de Botucatu/SP, no Campus da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP. Botucatu/SP, 2015.

A Tabela 01 traz os dados climáticos mensais referentes aos períodos de coleta.

**Tabela 1** – Temperaturas médias, mínimas, máximas e pluviosidade dos períodos de coleta do material vegetal de *V. curassavica* Jacq. Botucatu/SP, 2015-16.

Mês de coleta	Temperatura média (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Pluviosidade do período (mm)
Abril/2015	21,5	16,1	27,0	1,5
Julho/2015	18,2	12,9	23,5	0,8
Outubro/2015	22,0	15,0	28,0	1,2
Janeiro/2016	30,2	22,0	36,0	14,0

Os quatro acessos trabalhados estão localizados na cidade de Botucatu-SP e tiveram origem em quatro estados brasileiros: dois do nordeste, Bahia e Piauí, e dois do sudeste, São Paulo e Rio de Janeiro. Os acessos da Bahia, Piauí e São Paulo se localizam em área de propriedade da empresa Centroflora (Anidro do Brasil), que

cedeu o material vegetal para pesquisa, enquanto o acesso do Rio de Janeiro localiza-se no Horto Medicinal do Departamento de Horticultura da FCA, no campus da UNESP.

Entre os acessos, o do Piauí se distingue dos demais, devido às suas características morfológicas, como menor abundância de material foliar, fuste e galhos menos ramificados e folhas de menor tamanho. Os outros acessos são morfológicamente similares entre si (Figuras 1).

Este trabalho foi constituído por três experimentos distintos, com metodologia própria cada um, que será apresentado em seguida.



**Figura 1** - A) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário do Rio de Janeiro. B) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário da Bahia. C) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário de São Paulo. D) Acesso de *V. curassavica* Jacq. originário do Piauí.

#### 4.1 Experimento I – Determinação do tempo de hidrodestilação de material vegetal foliar de *V. curassavica* Jacq.

Amostras foliares de *V. curassavica* Jacq. foram coletadas do acesso pertencente ao Horto Medicinal do Departamento de Horticultura, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, no mês de Dezembro de 2014. Após a coleta, o material vegetal foi triado, descartando-se folhas herbivoradas ou que apresentassem sinais de doença, desnutrição ou senescência. As amostras foram levadas à estufa de circulação forçada de ar, a 40°C, até a estabilização do peso seco, para posteriormente serem submetidas aos tratamentos de tempo de hidrodestilação em sistema Clevenger.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos de hidrodestilação foram de 40, 60, 90, 120 e 180 minutos. As amostras consistiam de 100g de material vegetal. Cada amostra foi transferida para balão de fundo redondo de 2L, completando-se o volume com água deionizada. O balão foi então acoplado ao aparato Clevenger e aquecido em manta aquecedora. A contagem dos tempos de tratamento se iniciou no momento de fervura da mistura. Ao final do tempo de destilação, o óleo essencial foi coletado, pesado e transferido para vidro âmbar com batoque e tampa de rosca, devidamente identificado, sendo imediatamente armazenado em freezer, para posterior caracterização do perfil químico do óleo.

Os cálculos de rendimento do óleo resultante de cada tratamento foram feitos com base na matéria seca da amostra e no peso do óleo coletado.

A fórmula utilizada para o cálculo do rendimento foi:

$$R (\%) = MO/MS \times 100$$

Onde:

R = Rendimento de óleo essencial

MO = Massa do óleo essencial (g)

MS = Massa seca do material vegetal (g)

Para determinação do perfil químico dos óleos essenciais, as amostras foram levadas ao Instituto Agrônomo de Campinas (SP). Dois equipamentos de cromatografia gasosa foram utilizados durante as análises.

Inicialmente, foi utilizado o cromatógrafo a gás SHIMADZU GC-2010, com autoinjeter SHIMADZU AOC-20i, e detector DIC (detector por ionização de chama), equipado com coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, 30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m) tendo hélio como gás de arraste. No preparo das amostras para cromatografia, 1 $\mu$ L de óleo essencial foi diluído em 1 mL de acetato de etila. A programação utilizada foi: 60°C a 240°C, com aumento de temperatura de 3°C/minuto, split 1/20 e vazão de gás de arraste de 1mL/minuto, com detector a 300°C e injeter a 280°C. As substâncias foram quantificadas no GC-DIC pelo método de normalização de área.

A caracterização de composição química dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-EM Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70 eV), coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, 30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), com injeter a 240°C e detector a 230°C. As análises foram conduzidas nas mesmas condições operacionais utilizadas no CG-DIC. A identificação das substâncias foi feita por comparação dos seus espectros de massas com os das substâncias do banco de dados do CG-EM (Nist. 62 Library) e dos índices de retenção (IR) com Adams (2007). Os índices de retenção foram obtidos por meio da injeção de uma série de *n*-alcanos (C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub>) no CG-EM, nas mesmas condições de análise das amostras, e aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão para verificar se há diferença estatística significativa entre as amostras dos diferentes tratamentos.

#### **4.2. Experimento II – Rendimento de óleo essencial em diferentes acessos de *V. curassavica* Jacq. em função de horários de coleta nas estações do ano.**

Neste experimento, foram avaliados os quatro acessos de *V. curassavica* Jacq. em diferentes horários de coleta, separadamente para cada estação do

ano (primavera, verão, outono e inverno). As coletas acontecem 15 dias após o início da estação.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 5x4, com cinco horários de coleta associados a quatro acessos, com quatro blocos. Os tratamentos de horários de coleta foram: 06h, 09h, 12h, 15h e 18h. E os acessos foram: *V. curassavica* Jacq. origem Rio de Janeiro, *V. curassavica* Jacq. origem Bahia, *V. curassavica* Jacq. origem São Paulo e *V. curassavica* Jacq. origem Piauí. As amostras (100g de folhas frescas) foram levadas à estufa de circulação forçada de ar, a 40°C, até a estabilização do peso seco das amostras.

Para o experimento, cada amostra foi transferida para balão de fundo redondo de 2L, completando-se o volume com água deionizada. O balão foi então acoplado ao aparato Clevenger e aquecido em manta aquecedora.

Ao final do tempo de destilação, o óleo foi coletado, pesado e transferido para vidro âmbar com batoque e tampa de rosca, devidamente identificado, sendo imediatamente armazenado em freezer, para posterior caracterização do perfil químico do óleo. Os cálculos de rendimento do óleo resultante de cada tratamento foram feitos com base na matéria seca da amostra, conforme metodologia descrita no Experimento I. Os cálculos de rendimento do óleo resultante de cada tratamento foram realizados com base na matéria seca da amostra.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo estabelecidas comparações por médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade aos acessos e análise de regressão aos dados quantitativos referentes aos horários de colheita.

#### **4.3. Experimento III – Rendimento de óleo essencial e perfil químico dos acessos de *V. curassavica* Jacq. em função da sazonalidade.**

Neste experimento, foram avaliados os rendimentos de óleo essencial dos quatro acessos de *V. curassavica* Jacq. em todas as estações do ano (primavera, verão, outono e inverno). As coletas acontecem 15 dias após o início da estação.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 4x4 (quatro acessos e quatro estações) com quatro blocos. Os tratamentos referentes aos acessos foram: *V. curassavica* Jacq. origem Rio de Janeiro, *V. curassavica* Jacq. origem Bahia, *V. curassavica* Jacq. origem São Paulo e *V. curassavica* Jacq. origem Piauí. O fator sazonalidade refere-se às coletas nas estações do ano (primavera, verão, outono e inverno). As amostras, compostas por 100g de folhas frescas cada, foram coletadas no período da manhã (6:00hs) conforme dados do experimento anterior, triadas, identificadas, posteriormente levadas à estufa de circulação forçada de ar, a 40°C, até a estabilização do peso seco.

Para o experimento, cada amostra foi transferida para balão de fundo redondo de 2L, completando-se o volume com água deionizada. O balão foi então acoplado ao aparato Clevenger e aquecido em manta aquecedora.

Ao final do tempo de destilação, o óleo essencial foi coletado, pesado e transferido para vidro âmbar com batoque e tampa de rosca, devidamente identificado, sendo imediatamente armazenado em freezer, para posterior caracterização do perfil químico do óleo, conforme descrito no experimento I. Os cálculos de rendimento do óleo resultante de cada tratamento foram feitos com base na matéria seca da amostra.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade para verificar se ocorre diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Experimento I – Determinação de tempo de hidrodestilação de material vegetal foliar de *V. curassavica* Jacq.**

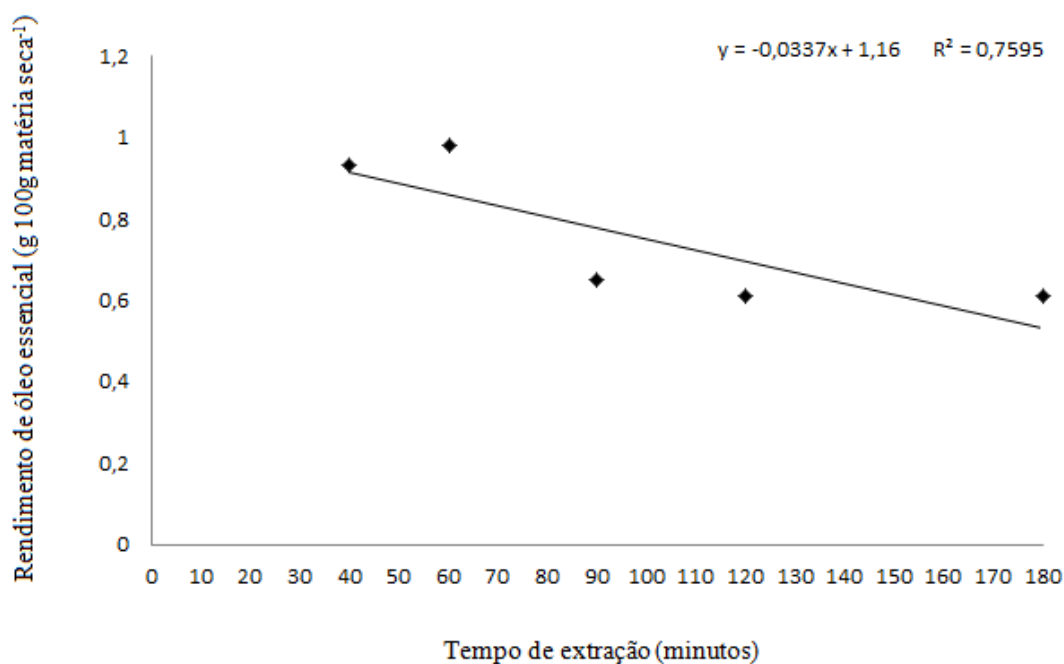
Por intermédio da análise de variância foi possível detectar efeito significativo ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 2). Comportamento linear decrescente foi observado em função do tempo de hidrodestilação da matéria vegetal para determinação do rendimento do óleo essencial de *V. curassavica* (Gráfico 2).

**Tabela 2** - Análise de variância do rendimento de óleo essencial de acesso de *V. curassavica* sob diferentes períodos de tempo de hidrodestilação. Botucatu/SP, 2015.

FV	GL	Quadrado médio
		Rendimento de óleo essencial
Reg.linear	1	0,40662*
Reg.quadra	1	0,00987 <sup>ns</sup>
Reg.cúbica	1	0,06713 <sup>ns</sup>
Reg.4ºgrau	1	0,05023 <sup>ns</sup>
Tratamentos	4	0,13346
Resíduo	15	0,05831
Total	19	

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )



**Gráfico 2** - Rendimento de óleo essencial de acesso de *V. curassavica*, sob diferentes tratamentos de tempo de hidrodestilação. Botucatu/SP, 2015.

É possível afirmar que os maiores rendimentos são atingidos aos 40 e 60 minutos, ocorrendo queda no volume extraído em função do aumento de tempo decorrido. Este resultado é interessante, pois demonstrou que não é necessário grande

período de processamento da amostra para obtenção do máximo rendimento de volume, podendo-se adotar o tempo de 40 minutos, evitando maior ônus referente.

Similarmente aos resultados aqui expressos, Oliveira et al. (2012), em estudo de tempo de hidrodestilação, encontraram maior rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* var. *citrata*) em um dos tratamentos de menores períodos de tempo, 60 minutos. A partir deste período de hidrodestilação, ocorreu a estabilização do volume obtido mesmo em tratamentos de maior de tempo.

Zheljazkov et al. (2013), em estudo de tempos de destilação na extração de óleo essencial de flores de lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), obtiveram os maiores resultados de rendimentos a partir do tratamento de tempo de 60 minutos, seguido de estabilização do rendimento, comprovando que para a espécie não é necessário maior tempo de destilação. Em contrapartida, os autores registraram diferentes concentrações relativas de certos compostos de interesse nos diferentes tempos de destilação, o que demonstra que, em experimentos como este, não somente o rendimento deve ser avaliado, mas também as alterações químicas do óleo resultante do processo nos diferentes tratamentos de tempo.

Ao contrário dos resultados obtidos neste estudo, Prins et al. (2006), em pesquisa de tempo de hidrodestilação de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), encontraram diferente tendência de rendimento de óleo essencial para a espécie, que apresentou maiores médias para os tratamentos de maiores períodos de hidrodestilação, de 90 e 120 minutos, e sua análise estatística revelou tendência crescente de rendimento com o aumento do tempo de hidrodestilação.

Zheljazkov et al. (2012), em experimento de tempo de destilação de folhas de orégano (*Origanum vulgare* L.), registraram o tempo de destilação de 240 minutos como o tratamento de maior rendimento de óleo essencial. Quanto às concentrações relativas de substâncias de interesse, os autores observaram variação nas concentrações em função do tempo de destilação, sendo que das 15 substâncias avaliadas, cinco obtiveram maior rendimento aos 20 minutos de destilação e as outras dez aos 240 minutos. Ao realizarem testes de atividade antimicrobiana dos óleos resultantes dos tratamentos de tempo, demonstraram que não ocorre mudança na ação antimicrobiana do óleo de orégano, independente do tempo de destilação.

Em estudo de tempos de destilação em *Mentha x piperata* L. (hortelã-pimenta), *Cymbopogon flexuosus* Ness x Steud. (capim-limão) e *Cymbopogon martinií* Roxb. (palmarosa), Cannon et al. (2013), demonstraram que as três espécies apresentam diferentes padrões de rendimento em função do tempo de extração por destilação. Para as três espécies, os máximos rendimentos de óleo essencial foram registrados aos 20 minutos de destilação, em contrapartida, não ocorreu um padrão de aumento ou queda nas concentrações relativas das substâncias de interesse analisadas.

Através da análise cromatográfica das amostras em GC-EM foi possível identificar em média 88,12% das substâncias presentes nos óleos essenciais do acesso em função do tempo de hidrodestilação. A Tabela 3 apresenta as substâncias identificadas.

**Tabela 3** – Substâncias identificadas e suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq. sob diferentes tempos de hidrodestilação. Botucatu/SP, 2015.

Substância	40 mi	60 min	90 min	120 min	180 min	IRc	IRI
$\alpha$ -pineno	42,96	39,74	35,02	40,46	47,76	933	939
Canfeno	0,08	0,07	0	0	0,13	949	954
Sabineno	0,47	0,31	0,41	0,48	0,48	973	975
$\beta$ -pineno	1,09	0,6	0,35	0,45	0,53	977	979
Mirceno	0,37	0,37	0,32	0,44	0,48	991	990
Limoneno	1,04	1,24	0,49	0,71	1	1029	1029
1,8-cineol	0,78	0,33	0,33	0,42	0,41	1031	1031
n-nonanal	0,14	0,23	0,15	0,28	0,28	1103	1100
Neo-iso-3-acetato de tujenila	1,36	0,79	0,41	0,54	0,47	1286	1283
$\delta$ -elemeno	0,56	5,83	1,77	4,35	4,7	1339	1338
Acetato de citronelila	0,45	0,53	0,28	0,36	0,18	1354	1352
$\alpha$ -copaeno	0,14	0,44	0,29	0,42	0,39	1378	1376
$\beta$ -elemeno	3,47	5,27	4,1	4,39	4,1	1393	1390
(E)-cariofileno	13,66	13,3	14,53	15,55	14,1	1421	1419
$\alpha$ -humuleno	3,62	3,98	4,1	3,89	3,39	1454	1454
9-epi-(E)-cariofileno	6,61	5,51	5,24	4,91	4,47	1461	1462

Germacreno D	0,74	1,66	0,76	1,5	1,38	1481	1485
Viridifloreno	-	-	-	-	0,19	1497	1496
Germacreno A	0,66	1,06	0,99	1,23	1,22	1505	1508
Espatuleno	1,62	0,72	1,1	0,71	0,59	1578	1573
$\beta$ -copaeno-4- $\alpha$ -ol	5,32	2,1	5,96	2,49	1,67	1591	1590
Muurolo-4,10(14) dien- $\beta$ -ol	5,3	5,49	5,82	4,52	4,28	1630	1633
<b>Total</b>	90,44	89,57	82,42	88,1	92,7	-	-

Entre os tratamentos, o de 180 minutos foi o único a apresentar o composto viridifloreno. Dentre as substâncias presentes no óleo essencial, as mais representativas conjuntamente foram os isômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno; (*E*)-cariofileno e 9-epi-(*E*)-cariofileno, e o  $\alpha$ -humuleno, sendo esta última uma substância importante por ser um dos marcadores químicos do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. para a indústria.

Devido a este fato, seus dados de concentração foram submetidos à análise de variância (Tabela 4). No entanto, não foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para as substâncias em função do tempo de hidrodestilação, fato este que comprova que a qualidade do óleo essencial não é prejudicada com a escolha dos menores tempos de hidrodestilação, que estão associados aos maiores rendimentos.

**Tabela 4** - Análise de variância das concentrações de  $\alpha$ -pineno, (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, 9-epi-(*E*)-cariofileno e  $\beta$ -pineno em óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. em função dos tempos de hidrodestilação. Botucatu-SP, Janeiro de 2015.

FV	GL	Quadrado médio				
		$\alpha$ -pineno	( <i>E</i> )- cariofileno	$\alpha$ - humuleno	9-epi-( <i>E</i> )- cariofileno	$\beta$ -pineno
Reg. linear	1	42,64 <sup>ns</sup>	1,40 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	10,19 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
Reg. quadra	1	278,15 <sup>ns</sup>	15,64 <sup>ns</sup>	1,20 <sup>ns</sup>	0,32 <sup>ns</sup>	2,08 <sup>ns</sup>
Reg. cúbica	1	4,53 <sup>ns</sup>	17,24 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	2,30 <sup>ns</sup>
Reg. 4º grau	1	22,81 <sup>ns</sup>	0,49 <sup>ns</sup>	0,0017 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	2,39 <sup>ns</sup>
Tratamentos	4	87,03	8,69	0,33	2,74	1,71
Resíduo	15	89,37	15,63	0,83	2,79	1,4
Total	19					

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Ao se estudar aspectos produtivos do óleo essencial de uma espécie, a presença ou ausência de variação da concentração relativa de compostos em função do tempo de hidrodestilação deve ser esclarecido primariamente, pois sua qualidade afeta diretamente sua eficiência enquanto princípio ativo. Nos casos em que não ocorre variação, tem-se maior segurança da qualidade de óleo extraído, pois o perfil químico, que define sua forma de ação no organismo, se mantém. Em contrapartida, nos casos onde há mudança, a alteração do perfil químico do óleo essencial, e conseqüentemente da sua ação, dificulta a padronização do produto final quando não se estabelece protocolo para obtenção do perfil de interesse.

## 5.2. Experimento II – Rendimento de óleo essencial em diferentes acessos de *V. curassavica* Jacq. em função de horários de coleta nas estações do ano.

### Primavera/2015

Através da análise de variância foi possível detectar efeito significativo ( $p < 0,01$ ) entre os acessos e interação entre acessos e horário de coleta, comportamento não observado separadamente para o fator de variação do horário (Tabela 5).

**Tabela 5** - Análise de variância do rendimento de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica* em função dos horários de coleta. Botucatu/SP, 2015.

FV	GL	Quadrado médio
		Rendimento de óleo essencial
Acesso	3	4,31 **
Horário	4	0,37 --
Int. AxH	12	0,75 **
Tratamentos	19	1,23 **
Blocos	3	0,11 <sup>ns</sup>
Resíduo	57	0,14
Total	79	CV% = 39,92

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

Este fato mostra que o rendimento dos acessos é afetado pelo horário de coleta na estação de primavera. Entre os acessos, somente o do Piauí apresentou rendimento médio estatisticamente inferior aos demais, com 0,23%. Os outros acessos exibiram rendimentos iguais (Tabela 6).

**Tabela 6** – Valores médios do rendimento de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica*, na estação da primavera. Botucatu/SP, Novembro de 2015.

<b>Acessos</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>
Bahia	1,1862 a
São Paulo	1,1623 a
Piauí	0,2356 b
Rio de Janeiro	1,1412 a

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Como foi detectada a interação entre os acessos e o horário de coleta para esta estação, procedeu-se o desdobramento entre fatores. Dentro do fator de variação de horário de coleta, os maiores rendimentos foram registrados para os acessos de São Paulo às 09h e da Bahia às 06h (Tabela 7). Ambos em horários de menor radiação solar.

**Tabela 7** - Valores médios de rendimentos de óleo essencial de acessos de *V. curassavica* Jacq. em função do horário de coleta, na estação do primavera. Botucatu-SP, novembro de 2015.

<b>Acesso</b>	<b>Horários de coleta</b>				
	<b>06h</b>	<b>09h</b>	<b>12h</b>	<b>15h</b>	<b>18h</b>
Bahia	1,9683 a	1,0034 bc	1,0030 a	1,1573 a	0,7991 ab
São Paulo	0,5614 bc	2,1927 a	0,7539 ab	0,9018 a	1,4020 a
Piauí	0,1138 c	0,3694 c	0,3005b	0,0767 b	0,3179 b
Rio de Janeiro	1,1375 b	1,1523 b	1,1203 a	1,1660 a	1,1302 a

- Médias seguidas de mesma letra, na linha, expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### Verão/2015

Através da análise de variância foi possível detectar efeito significativo ( $p < 0,01$ ) entre os acessos e interação entre acessos e horário de coleta, comportamento não observado separadamente para o horário (Tabela 8).

**Tabela 8** - Análise de variância do rendimento de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica* em função dos horários de coleta. Botucatu/SP, 2015.

FV	GL	Quadrado médio
		Rendimento de óleo essencial
Acesso	3	6,7642 **
Horário	4	0,1425 --
Int. AxH	12	0,2440 **
Tratamentos	19	1,2522 **
Blocos	3	0,1237 ns
Resíduo	57	5,09
Total	79	CV% = 31,67

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

Os resultados indicam que o rendimento de óleo essencial varia dentro de um ou mais acessos em função de seu horário de coleta. Na estação de verão, o acesso do Rio de Janeiro se destaca na produção de óleo essencial, chegando a 1,62%, seguido pelo acesso da Bahia, com 1,14%. O acesso do Piauí registrou o menor rendimento entre os acessos (0,74%), alcançando menos da metade da produção do acesso do Rio de Janeiro (Tabela 9).

**Tabela 9** – Valores médios de rendimento de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica*, na estação do verão. Botucatu/SP, janeiro de 2016.

Acesso	Rendimento médio (%)
Bahia	1,1410 b
São Paulo	0,7453 c
Piauí	0,2600 d
Rio de Janeiro	1,6285 a

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os acessos do Rio de Janeiro e da Bahia apresentaram os maiores rendimentos, sendo que o do Rio de Janeiro atingiu seus maiores rendimentos nas amostras coletadas às 06h (2,14%) e às 18h (1,58%), enquanto para o acesso da Bahia, o melhor horário de coleta se mostrou o das 15h, onde alcançou 1,54% (Tabela 10).

**Tabela 10** - Valores médios de rendimentos de óleo essencial de acessos de *V. curassavica* Jacq. em função do horário de coleta no verão. Botucatu-SP, Janeiro de 2016.

Acesso	Horários de coleta				
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00
Bahia	1,2299 b	0,9946 a	0,8504 b	1,5422 a	1,0881 ab
São Paulo	0,6705 bc	0,9572 a	0,6719 b	0,5865 b	0,8406 b
Piauí	0,3648 c	0,2264 b	0,3598 b	0,3104 b	0,0389 c
Rio de Janeiro	2,1419 a	1,3038 a	1,7196 a	1,3960 a	1,5813 a

- Médias seguidas de mesma letra, na coluna, expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### **Outono/2015**

Por intermédio da análise de variância foi possível detectar efeito significativo ( $p < 0,01$ ) entre os acessos, comportamento não observado para o horário de coleta e nem para interação entre os dois fatores (Tabela 11).

**Tabela 11** - Análise de variância dos valores médios de rendimento de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica*, na estação do outono. Botucatu/SP, Abril de 2015.

FV	GL	Quadrado médio
		Rendimento de óleo essencial
Acesso	3	4,99203 **
Horário	4	0,15175 --
Int. AxH	12	0,26786 <sup>ns</sup>
Tratamentos	19	0,98934 **
Blocos	3	0,17292 <sup>ns</sup>
Resíduo	57	0,15723
Total	79	CV% = 20,43

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

O acesso nativo da Bahia se mostrou o mais produtivo quanto ao rendimento de óleo essencial no período do outono, com produção média diária de 1,8%. O acesso de menor rendimento foi o nativo do Piauí, com 0,4% de produção diária de óleo, enquanto os acessos de São Paulo e do Rio de Janeiro se apresentaram como os de produção intermediária, com 0,81% e 1,14%, respectivamente (Tabela 12).

**Tabela 12** - Médias dos rendimentos de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica* na estação do outono. Botucatu/SP, Abril de 2015.

<b>Acesso</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>
Bahia	1,8384 a
São Paulo	0,8177 b
Piauí	0,4002 c
Rio de Janeiro	1,1408 b

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### **Inverno/2015**

Dados semelhantes ao encontrado no outono foram observados no inverno, onde foi possível detectar efeito significativo ( $p < 0,01$ ) entre os acessos, comportamento não observado para o horário de coleta e nem para interação entre os dois fatores (Tabela 13).

**Tabela 13** - Análise de variância dos rendimentos de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica* durante a estação do inverno. Botucatu/SP, Julho de 2015.

FV	GL	Quadrado médio
		Rendimento de óleo essencial
Acesso	3	7,37346 **
Horário	4	0,19980 --
Int. AxH	12	0,28901 <sup>ns</sup>
Tratamentos	19	1,38882 **
Blocos	3	0,42323 <sup>ns</sup>
Resíduo	57	0,16873
Total	79	CV % = 53.64

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

Entre os acessos, novamente o que se destaca quanto ao volume de óleo essencial produzido para a estação é o nativo da Bahia, com média diária de 1,81%. Diferentemente da estação anterior, os acessos de menores rendimentos foram os acessos de São Paulo e o do Piauí, com médias diárias de 0,90% e 0,67%, respectivamente. O acesso do Rio de Janeiro foi o intermediário para a característica de rendimento, com média de 1,35% durante a estação do inverno (Tabela 14).

**Tabela 14** – Valores médios de rendimento de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica*, na estação do inverno. Botucatu/SP, Julho de 2015.

<b>Acesso</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>
Bahia	1,8010 a
São Paulo	0,6713 c
Piauí	0,9099 c
Rio de Janeiro	1,3575 b

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Outros trabalhos, como observado neste estudo de *V. curassavica*, demonstram diferença significativa de rendimento de óleo essencial de algumas espécies de plantas. Oliveira et al. (2012), observou maiores valores médios de rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* var. *citrata*) em folhas coletadas às 13:00h, obtendo rendimento máximo de 1,33%.

Em estudo de rendimento de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* DC), Santos et al. (2009) obteve maior produtividade de óleo essencial em dias quentes, com alta pluviosidade e durante o período da manhã. Em suas conclusões, cita a influencia da época de coleta, variação climática e condições de cultivo como influências diretas na quantidade de óleo essencial obtida nos tratamentos.

Santos et al. (2012), em estudo de *Alpinia zerumbet* (colônia), encontraram rendimentos de óleo essencial significativamente maiores em material vegetal coletado por volta das 14:00h. Os autores também registraram a estabilidade do perfil químico, que não se alterou diante dos diferentes horários do dia.

Ao testar diferentes horários de coleta em *Ocimum gratissimum*, Kpoviessi et al.(2012), registraram maiores rendimentos de óleo essencial no começo da

manhã e da noite (07:00h e 19:00h), sendo que o menor rendimento ocorreu em amostras das 13:00h.

Com os dados obtidos neste estudo, podemos inferir que nas estações primavera e verão existem acessos que se destacam (Bahia e Rio de Janeiro) em função do horário de coleta, sendo preferíveis os primeiros horários do dia. Já para estações outono e inverno os acessos não sofrem interferências dos horários.

### 5.3. Experimento III – Rendimento de óleo essencial e perfil químico dos acessos de *V. curassavica* Jacq. em função da sazonalidade.

Por intermédio da análise de variância foi possível detectar efeito significativo ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos (Tabela 15).

**Tabela 15** - Análise de variância do rendimento de óleo essencial dos acessos de *V. curassavica* entre as estações do ano. Botucatu/SP, 2016.

FV	GL	Quadrado médio
		Rendimento de óleo essencial
Época	3	7,07796 **
Acesso	3	0,41024 **
Int. ÉxA	9	0,76898 **
Tratamentos	15	1,95903 **
Blocos	3	0,00560 <sup>ns</sup>
Resíduo	45	0,1
Total	63	CV%= 26,97

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

Os resultados estatísticos demonstram que ocorreu diferença significativa quanto ao rendimento dos acessos (Tabela 16), das estações da estação do ano (Tabela 17) e efeito de interação entre ambos os fatores (Tabela 18).

**Tabela 16** - Médias dos rendimentos de óleo essencial de *V. curassavica* entre as estações do ano em função dos acessos. Botucatu-SP, 2015.

<b>Acesso</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>
Bahia	1,8968 a
São Paulo	0,6715 c
Piauí	0,5052 c
Rio de Janeiro	1,5032 b

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 17** - Médias dos rendimentos de óleo essencial de acessos de *V. curassavica* em função das estações do ano. Botucatu-SP, 2015.

<b>Acesso</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>
Primavera	0,9452 b
Verão	1,1017 ab
Outono	1,3214 a
Inverno	1,2084 ab

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A combinação entre acessos e estação do ano a serem coletadas podem influenciar diretamente no rendimento do óleo essencial de *V. curassavica*. O acesso da Bahia coletado no inverno mostrou-se com maior rendimento de óleo essencial, tendo média geral de 2,47%, seguido pelo acesso do Rio de Janeiro coletado no verão, com 2,14%. Já o acesso de São Paulo não apresenta diferenças quanto à estação de coleta, apresentando médias superiores no inverno (0,77%). Piauí mostrou-se maiores rendimentos ao serem coletados no outono (1,13%).

**Tabela 18** – Valores médios de rendimentos de óleo essencial de acessos de *V. curassavica* Jacq. em função das estações do ano. Botucatu-SP, Janeiro de 2016.

<b>Acesso</b>	<b>Estação do Ano</b>			
	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
Bahia	1,9683 aA	1,2299 bB	1,9157 aA	2,4735 aA
São Paulo	0,5614 bcA	0,6705 bcA	0,6753 cA	0,7788 bcA
Piauí	0,1138 cB	0,3648 cB	1,1334 bcA	0,4090 cB
Rio de Janeiro	1,1375 bB	2,1419 aA	1,5612 abAB	1,1723 bB

- Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Muitos estudos demonstram a ocorrência de variação de produtividade de óleo essencial durante as diferentes estações do ano e entre populações de mesma espécie. Botrel et al. (2010), em estudo da produtividade de óleo essencial de hortelã-do-campo, verificou diferenças significativas de produção com maior rendimento de óleo na estação do verão e menor rendimento no inverno. Segundo a autora, esse fato pode se dever ao fotoperíodo, maior no verão do que nas outras estações. Também verificou a mudança nos níveis de concentração de alguns compostos no decorrer do ano, além de uma drástica alteração da relação monoterpenos-sesquiterpenos entre as estações.

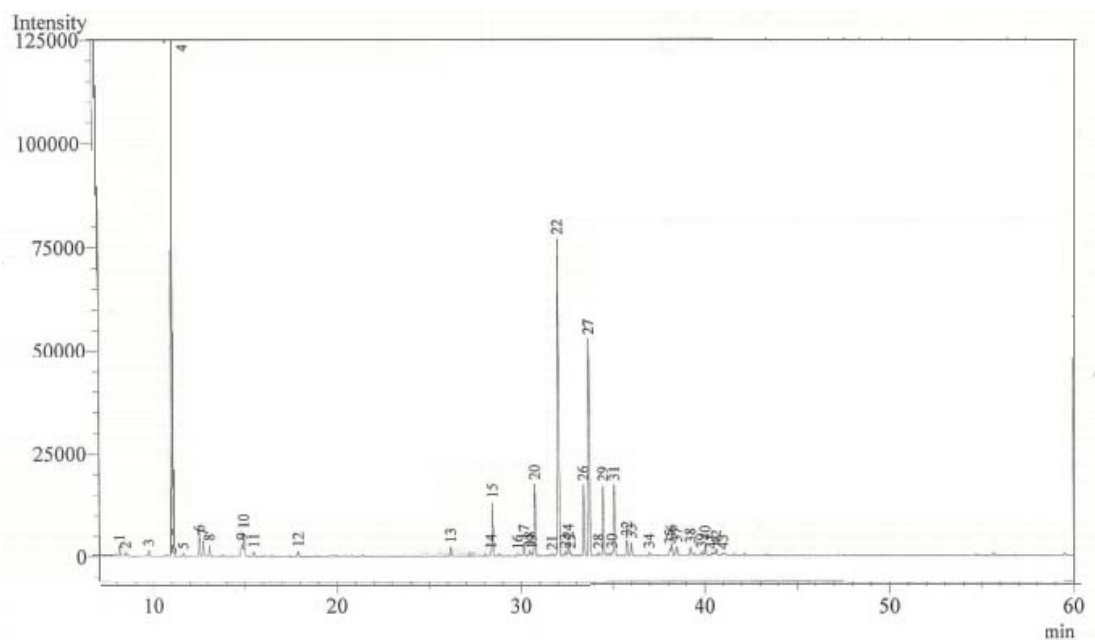
Verma et al. (2011), encontraram que para obter maior rendimento de óleo essencial de *Thymus serpyllum* L., planta medicinal nativa do mediterrâneo, a colheita do material vegetal deve ocorrer no verão, durante o estágio vegetativo da planta, demonstrando efetivamente que a estação do ano pode interferir diretamente na produção do óleo essencial desta espécie. Ainda para este mesmo gênero, Abu-Darwish et al. (2012) verificaram o rendimento de óleo de *Thymus vulgaris* L. sob diferentes espaçamentos de cultivo e em diferentes estágios de desenvolvimento. Seus maiores rendimentos foram obtidos quando em estágio vegetativo, corroborando o estudo de Verma et al. (2011), e em espaçamento de 45cm de entrelinha.

Variações reativas ao período de colheita também foram encontradas em estudo do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm) por Taveira et al. (2003) onde o rendimento de óleo entre as estações secas e chuvosas foi comparado, chegando à conclusão de que os maiores rendimentos são encontradas durante a época das chuvas. Já Khali et al. (2014), registrou maiores rendimentos de óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* no verão (0,2%), época de maiores temperaturas, umidade relativa do ar e incidência de radiação solar. O menor rendimento foi registrado para a estação do inverno ( $\leq 0,1\%$ ).

Em contrapartida, existem espécies onde a variação de rendimento entre as estações não é significativa, como relatado por Sarrazin et al. (2015) em estudo sazonal de produtividade de óleo essencial de alecrim-d'ângola (*Lippia organoides* Kunth). Ao acompanhar a espécie durante 12 meses, encontraram que a diferença de rendimento de óleo era estatisticamente irrelevante. Entretanto, observou a ocorrência uma pequena variação na composição química do óleo e de seu potencial antimicrobiano.

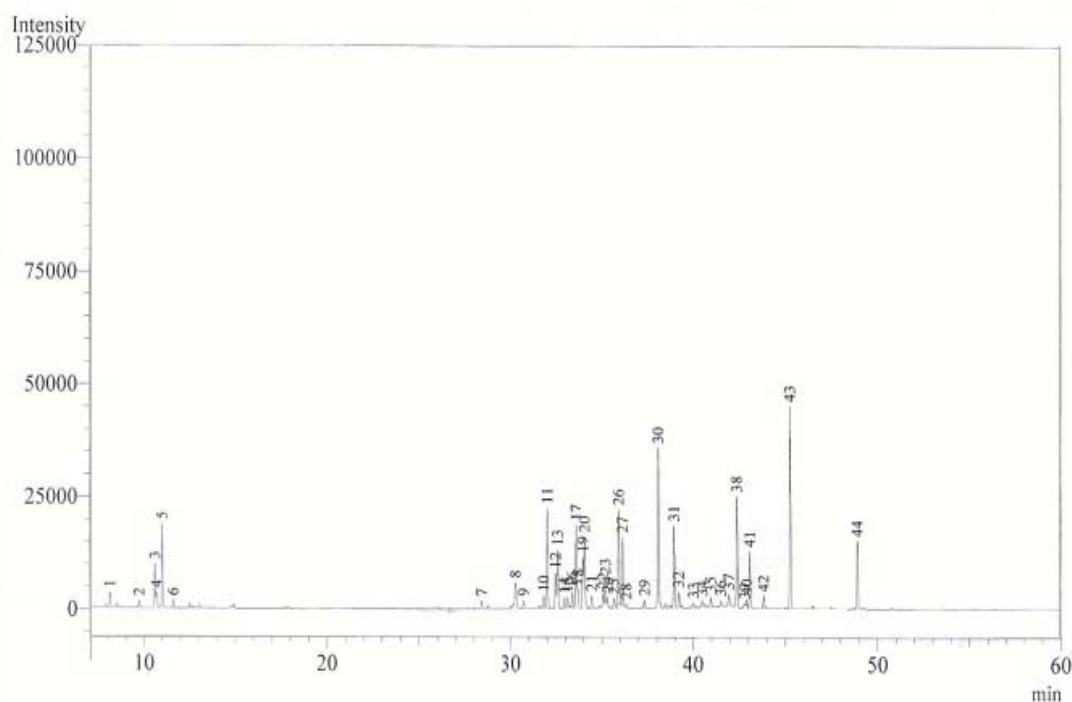
Ao estudar os efeitos da fenologia no rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis*, Arraiza et al. (2012), registraram maiores rendimentos de óleo durante a plena floração da planta. Em contrapartida, os menores rendimentos ocorreram no período vegetativo, seguido pelo período após a floração. Além disso, neste estudo foram registradas alterações nas concentrações relativas de seus compostos quanto às estações do ano.

Neste estudo, após o processamento das amostras, os óleos essenciais extraídos em todas as estações foram submetidos à análise cromatográfica, em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa, para identificação dos compostos presentes e suas concentrações relativas. Foi possível a caracterização de 47 substâncias entre os acessos no decorrer das estações. Devido à baixa quantidade dos óleos essenciais do acesso do Piauí, não foi possível realizar a análise dos óleos essenciais das quatro estações, somente da estação de Primavera. Por este motivo, esta estação está presente na Tabela 19 para este acesso, o que possibilita a identificação do perfil químico do óleo essencial e a comparação com os dos demais acessos (Figura 2 a 5).



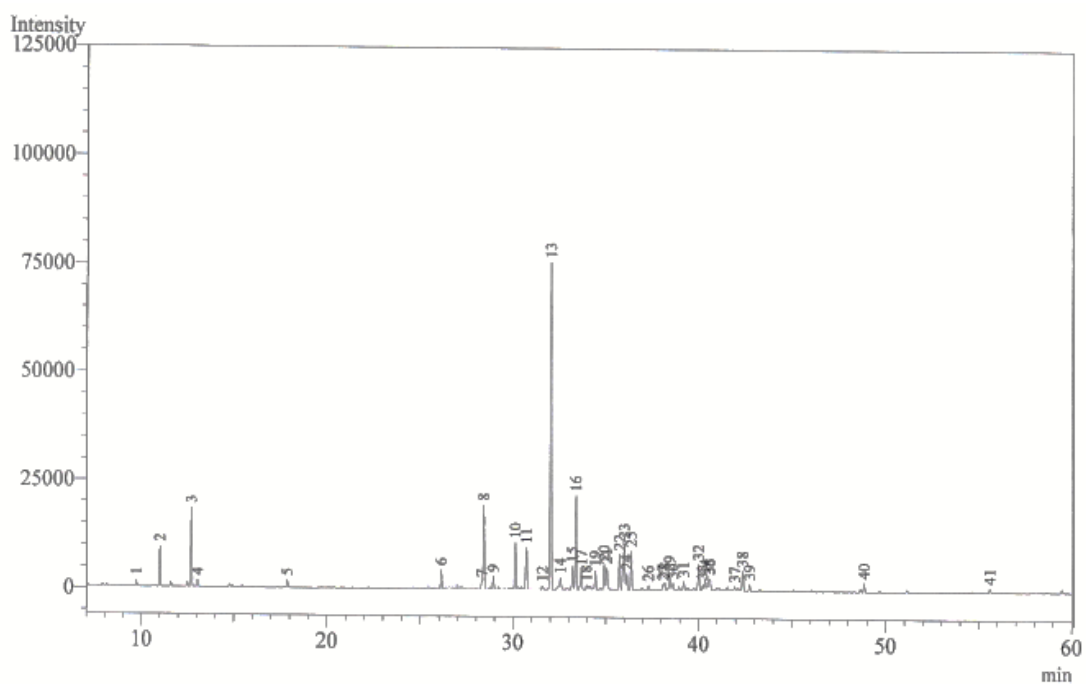
**Figura 2** - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. acesso de origem São Paulo, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.

As análises de cromatografia acoplada à espectrometria de massas possibilitaram a identificação de 85% das substâncias presentes nas amostras do acesso de São Paulo. As substâncias identificadas/picos foram: 3:  $\alpha$ -tujeno , 4:  $\alpha$ -pineno, 5: canfeno, 6: sabineno, 7:  $\beta$ -pineno, 8: mirceno, 9: limoneno, 12: n-nonanal, 13: neo-iso-3-acetato de tujanila, 15:  $\delta$ -elemeno, 16:  $\alpha$ -(Z)-bergamoteno, 20:  $\beta$ -elemeno, 22: (E)-cariofileno, 24:  $\beta$ -gurjeno, 26:  $\beta$ -(E)-farneseno, 27: 9-epi-(E)-cariofileno, 29: germacreno D, 31: viridifloreno, 33:  $\gamma$ -cadineno, 35: espatulenol, 36: óxido de cariofileno. Dentre os compostos identificados, os mais representativos são  $\alpha$ -pineno (33,38%), (E)-cariofileno (18,96%), 9-epi-(E)-cariofileno (12,54%), germacreno D (3,87%), viridifloreno (4,20%) e  $\delta$ -elemeno (2,94%).



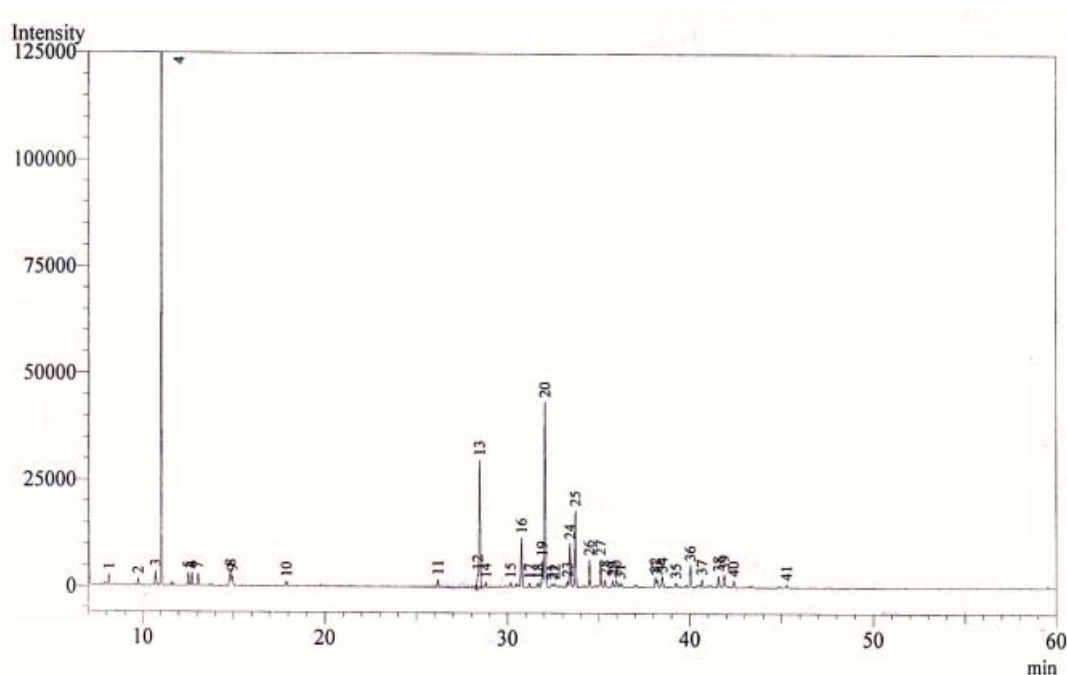
**Figura 3** - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. do acesso de origem Bahia, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.

Para o acesso da Bahia, foram identificadas as substâncias/picos: 3: triciclono, 4:  $\alpha$ -tujeno, 5:  $\alpha$ -pineno, 6: canfeno, 7:  $\alpha$ -copaeno, 8: dauceno, 9: cubebeno, 11:(*E*)-cariofileno, 12:  $\beta$ -copaeno, 13:  $\alpha$ -(*E*)-bergamoteno, 14: acora-2,4(15)-dieno, 15:  $\alpha$ -humuleno, 16:  $\beta$ -(*E*)-farneseno, 17: 9-epi-(*E*)-cariofileno, 20:  $\gamma$ -muuroleno, 21: germacreno D, 22: viridifloreno, 23: Isodourene, 24: (*E,E*)-n-farneseno, 27:  $\gamma$ -cadineno, 30: amorf-4,7(-11)-dieno, 35:  $\alpha$ -muurolol, 36: selin-11-en-4- $\alpha$ -ol, 37: 14-hidroxi-9-epi-(*E*)-cariofileno, 38: eudesm-7(11)-en-4-ol (provável), 40: 14-hidroxi- $\alpha$ -humuleno, 41: (*E*)-acetato de nerolidila, 42: (*2E,6E*)-farnesol. Os compostos identificados totalizam 75,9% da amostra. As substâncias de maior proporção relativa no óleo essencial do acesso da Bahia foram amorf-4,7(11)-dieno (9,5%), (*2E,6E*)-farnesoato de metila (10,7%), Eudesm-7(11)-en-4-ol (6,9%),  $\delta$ -cadineno (6,4%) e (*E*)-cariofileno (5,79%).



**Figura 4** - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. do acesso de origem Piauí, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.

Para a amostra de óleo essencial do acesso do Piauí foram identifica as substâncias/picos: 3:  $\alpha$ -pineno, 4: canfeno, 5: sabineno, 6:  $\beta$ -pineno, 8: mirceno, 9: limoneno, 10: 1,8 cineole, 11: n-nonanal, 13: neoiso-3-acetato de tujanila, 14:  $\delta$ -elemeno, 16:  $\alpha$ -humuleno, 17: 9-epi-(*E*)-cariofileno, 19: germacreno D, 20: (*E*)-muuro-la-4(14)-5-dieno, 21: viridifloreno, 23: (*Z*)-calemeno, 25: (*E*)- cadina-1,4-dieno, 28: espatulenol, 30:  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol, 38:  $\alpha$ -muurulol. Os compostos mais representativos na amostra foram o (*E*)-cariofileno 26,98% e  $\alpha$ - humuleno (7,88%). Na caracterização do óleo essencial do acesso do Piauí, 77,6% das substâncias foram identificadas.



**Figura 5** - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. do acesso de origem Rio de Janeiro, na estação de primavera (material vegetal coletado às 06:00). Botucatu-SP, 2015.

Nas amostras oriundas do Rio de Janeiro, as substâncias identificadas foram os picos: 3:  $\alpha$ -tujeno, 4:  $\alpha$ -pineno, 5: sabineno, 6:  $\beta$ -pineno, 7: mirceno, 8: limoneno, 9: 1,8 cineol, 10: n-nonanal, 11: neoiso-3-acetato de tujalina, 13:  $\delta$ -elemeno, 16:  $\beta$ -elemeno, 20: (E)-cariofileno, 24:  $\alpha$ -humuleno, 25: 9-epi-(E)-cariofileno, 26: germacreno D, 27: viridifloreno, 28:  $\beta$ -bisaboleno. Entre elas, os compostos mais representativos nas amostras do Rio de Janeiro foram o  $\alpha$ -pineno (42,82%), (E)-cariofileno (13,12%),  $\delta$ -elemeno (9,38%), 9-epi-(E)-cariofileno (4,39%),  $\beta$ -elemeno (3,44%) e  $\alpha$ -humuleno (3,01%). As substâncias identificadas nas amostras representam 84,72% dos compostos presentes.

**Tabela 19** – Porcentagem relativa das substâncias identificadas nos óleos essenciais de diferentes acessos de *V. curassavica* Jacq. em cada estação do ano. Botucatu/SP, 2015.

Porcentagem relativa de compostos por acesso e estação do ano (%)															
Substância	São Paulo				Rio de Janeiro				Bahia				Piauí	IRc	IRI
	Prim	Ver	Out	Inv	Prim	Ver	Out	Inv	Prim	Ver	Out	Inv	Prim		
Triciclono	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35	tr	tr	1,49	-	923	926
$\alpha$ -tujeno	1,17	1,24	0,62	5,98	0,69	1,9	0,91	tr	2,09	0,31	2,05	tr	-	927	930
$\alpha$ -pineno	34,88	38,62	33,68	38,37	42,82	49,94	45,75	47,54	3,91	2,01	6,42	1,2	5,64	933	939
Canfeno	tr	tr	0,21	0,16	-	-	-	-	0,37	0,41	tr	tr	tr	949	954
Sabineno	1,2	0,95	0,9	1,8	0,46	0,64	0,47	0,42	tr	-	0,64	tr	tr	973	975
$\beta$ -pineno	0,32	1,36	4,09	1,43	0,5	0,44	0,21	0,62	-	-	-	-	tr	977	979
Mirceno	0,52	0,67	0,86	0,82	0,46	0,59	0,5	0,5	tr	tr	tr	tr	0,52	991	990
Limoneno	1,1	1,15	0,5	1,23	1,07	1,29	1,22	1,1	-	-	-	-	tr	1029	1029
1,8-cineol	1,55	0,95	0,75	1,28	0,45	0,33	0,38	0,49	tr	tr	0,59	tr	tr	1031	1031
<i>n</i> -nonanal	0,35	0,22	0,47	0,21	0,38	0,22	0,2	tr	-	-	-	-	0,58	11003	1100
Neo-iso-3-acetato de tujenila	0,46	0,5	0,65	0,49	0,4	0,4	0,47	0,4	-	-	-	-	1,51	1286	1283
$\delta$ -elemeno	1,96	1,16	0,84	0,78	9,38	7,5	11,35	10,88	-	-	-	-	1,77	1339	1338
$\alpha$ -copaeno	0,63	0,39	0,36	0,4	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	3,78	1378	1376
Dauceno	-	-	-	-	-	-	-	-	2,32	1,84	4,11	0,83	-	1382	1381
$\beta$ -cubebeno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	0,75	0,46	0,5	tr	1391	1388
$\beta$ -elemeno	3,63	3,2	5,82	3,88	3,44	2,76	0,29	4,19	-	-	-	-	4,15	1393	1390
$\alpha$ -( <i>Z</i> )-bergamoteno	0,51	0,45	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1408	1415
( <i>E</i> )-cariofileno	15,46	3,2	14,89	20,43	13,12	9,68	11,32	14,17	5,79	5,68	4,27	6,18	26,98	1421	1419
$\beta$ -gurjeno	0,74	tr	0,43	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	1,77	1434	1433
Aromadendreno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	1435	1441
$\beta$ -copaeno	-	-	-	-	-	-	-	-	2,03	1,76	3,54	0,72	-	1436	1432
$\alpha$ -( <i>E</i> )-bergamoteno	-	-	-	-	-	-	-	-	3,53	2,46	5,12	1,22	-	1438	1434
Acora-2,4(15)-dieno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,67	0,48	0,89	0,36	-	1446	1446
$\alpha$ -humuleno	3,41	0,61	0,26	0,85	3,01	2,57	2,8	3,3	0,66	0,62	1,14	0,33	7,88	1454	1454
$\beta$ -( <i>E</i> )-farneseno	0,57	4,34	3,34	5,69	-	-	-	-	1,01	1,1	0,82	1,02	tr	1457	1454
9-epi-( <i>E</i> )-cariofileno	9,24	7,08	4,31	6,87	4,39	2,44	2,12	3,97	5,06	3,66	8,68	1,77	1,72	1461	1462
$\gamma$ -muuroleno	-	-	-	-	-	-	-	-	4,36	2,65	6,36	1,5	-	1477	1478

Porcentagem relativa de compostos por acesso e estação do ano (%)																
Substância	São Paulo				Rio de Janeiro				Bahia				Piauí	IRc	IRI	
	Prim	Ver	Out	Inv	Prim	Ver	Out	Inv	Prim	Ver	Out	Inv	Prim			
δ-muuroleno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	1477	1478
Germacreno D	3,11	2,41	2,41	2,57	1,59	1,3	1,43	1,69	0,77	0,96	0,67	0,38	1,67	1481	1485	
(E)-muurola-4(14)-5-dieno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,15	1492	1493	
Viridifloreno	3,0	2,3	1,1	1,1	1,3	1,2	0,9	0,9	0,9	1,8	0,4	0,3	2,3	1497	1496	
Isodauceno	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	1,1	1,4	1,6	-	1499	1500	
β-bisaboleno	-	-	-	-	0,4	0,8	0,7	-	-	-	-	-	-	1505	1505	
(E,E)- <i>n</i> -farneseno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,5	2,7	0,6	-	1510	1520	
δ-cadineno	0,3	0,7	0,5	0,3	-	-	-	-	6,4	7,7	5,9	1,7	-	1525	1523	
(Z)-calameno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7	1524	1529	
(E)-cadina-1,4-dieno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	1534	1534	
Amorfa-4,7(11)-dieno	-	-	-	-	-	-	-	-	9,5	15,4	2,8	35,6	-	1577	1481	
Espatuleno	0,3	0,4	0,3	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1578	1573	
β-copaeno-4-α-ol	0,6	0,6	1,1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	1591	1590	
α-muurolol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,5	0,4	2,0	-	1644	1646	
Selin-11-en-4-α-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	1,3	0,6	-	-	1657	1659	
14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,4	0,7	-	-	1668	1667	
Eudesm-7(11)-en-4-ol *	-	-	-	-	-	-	-	-	6,9	14,1	9,7	1,6	1,7	1693	1700	
14-hidroxi-α-humuleno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5		0,4	-	-	1715	1714	
(E)-Acetato de nerolidila *	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	0,4	0,8	15,5	-	1723	1717	
(2E,6E)-farnesoato de metila *	-	-	-	-	-	-	-	-	10,7	1,5	0,6	4,0	-	1787	1784	
<b>Total</b>	85,0	72,5	78,4	95,8	83,8	83,9	81,0	90,2	75,9	69,3	71,3	80,3	74,4	-	-	

\*Substância provável

tr = tr: ≤ 0,12%

IRc: Índice de retenção calculado

IRI: Índice de retenção da literatura (Adams, 2007)

Prim: Primavera; Ver: Verão; Out: Outono; Inv: Inverno

Dentre os acessos avaliados, observa-se que os óleos essenciais do Rio de Janeiro e de São Paulo apresentam perfil químico similar, enquanto os do Piauí e da Bahia diferem entre si e dos demais. Independente da estação do ano, observa-se que, o óleo essencial do acesso da Bahia apresenta composição química divergente dos demais acessos, com substâncias com elevada proporção relativa ausentes nos demais acessos, dentre elas o sesquiterpeno amorfa-4,7(11)-dieno, substância majoritária no óleo essencial da primavera. Este acesso apresenta composição química complexa. A análise do padrão de fragmentação dos espectros de massas em conjunto com os índices de retenção não permitiu a identificação de todas as substâncias, motivo pelo qual na Tabela 19 as mesmas foram atribuídas como substância provável. Para a identificação das mesmas será necessário o isolamento das substâncias e uso de técnicas auxiliares na identificação (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13).

Observou-se a dualidade presença-ausência de certas substâncias entre os acessos, como (*E*)-muurolo-4(14)-5-dieno, (*E*)-cadina-1,4-dieno, (*Z*)-calameneno,  $\delta$ -muuroleno e aromadendreno, que ocorreram somente no acesso do Piauí. O mesmo ocorreu com o acesso da Bahia, que apresentou 16 substâncias ausentes nos outros acessos, entre elas: triciclono,  $\beta$ -copaeno,  $\alpha$ -(*E*)-bergamoteno, acora-2,4(15)-dieno, (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila, (*E*)-acetato de nerolidila, 14-hidroxi- $\alpha$ -humuleno, amorfa-4,7(11)-dieno, selin-11-en-4- $\alpha$ -ol, 14-hidroxi-9-epi-(*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -muurolol, (*E,E*)-*n*-farneseno,  $\gamma$ -muuroleno,  $\beta$ -cubebeno, isodauceno e dauceno.

A única substância encontrada exclusivamente no acesso de São Paulo foi o  $\alpha$ -(*Z*)-bergamoteno, enquanto que o acesso do Rio de Janeiro foi o único com a presença de  $\beta$ -bisaboleno.

As proporções relativas de alguns dos compostos em comum apresentaram grande diferença entre os acessos dentro de uma mesma estação, como o  $\alpha$ -pineno, que registrou maiores proporções relativas nos acessos oriundos do sudeste, com média de 36,3% no acesso de São Paulo e de 46,5% no do Rio de Janeiro, do que nos do nordeste, com média de 3,3% para o acesso da Bahia e 5,6% no do Piauí na estação da primavera.

Devido ao fato do composto  $\alpha$ -humuleno ser um dos marcadores químicos mais utilizados pela indústria para controle de qualidade do óleo essencial de *V.*

*curassavica*, as proporções relativas nas estações do ano foram submetidas à análise de variância, com o intuito de ser observado se ocorre variação significativa do teor do composto no decorrer do ano (Tabelas 20 a 22).

**Tabela 20** – Análise de variância das proporções relativas de  $\alpha$ -humuleno em óleo essencial de acessos de *V. curassavica* em função das estações do ano. Botucatu/SP, 2015.

FV	GL	Quadrado médio
		Proporção relativa média (%)
Época	2	12,17 **
Acesso	3	1,15 *
Int. ÉxA	6	0,36 <sup>ns</sup>
Tratamentos	11	2,73 **
Blocos	3	0,52 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	9,83
Total	47	CV% = 50,21

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

**Tabela 21** – Proporção relativa média de  $\alpha$ -humuleno em óleo essencial de acessos de *V. curassavica*. Botucatu-SP, 2015.

Acesso	Proporção relativa média (%)
Bahia	2,08 a
São Paulo	0,47 b
Rio de Janeiro	0,70 b

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 22** - Médias de concentrações de  $\alpha$ -humuleno em óleo essencial de *V. curassavica* em função das estações do ano. Botucatu-SP, 2015.

Acesso	Concentração média (%)
Primavera	1,42 a
Verão	0,90 ab
Outono	0,75 b
Inverno	1,26 ab

- Médias seguidas de mesma letra expressam valores estatisticamente iguais pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que o acesso da Bahia se destaca quanto à proporção relativa de  $\alpha$ -humuleno (2,08%) em seu óleo essencial, chegando a registrar mais que o dobro da produção dos outros acessos analisados. Para o acesso do Piauí, na estação de primavera, a proporção relativa de  $\alpha$ -humuleno foi de 7,88%, muito superior as dos demais acessos, independente da estação do ano. O mesmo ocorre para o (*E*)-cariofileno, que alcança a proporção de 26,98%.

Quanto sua variação nas estações do ano dentro dos acessos, os resultados que demonstram que a produção de  $\alpha$ -humuleno durante as estações de primavera, verão e inverno são estatisticamente iguais (1,42%, 0,90% e 1,26%, respectivamente), ocorrendo decréscimo de produção somente na estação de outono (0,75%).

É importante salientar que as mesmas substâncias ocorreram dentro de um mesmo acesso em todas as estações do ano, ou seja, a diversidade química das amostras de cada acesso se manteve, alterando-se somente as proporções relativas dos compostos. Uma exceção foi registrada, onde na amostra de verão, o composto sabineno se mostrou ausente para o acesso da Bahia, estando presente nas outras estações do ano.

Resultados de outros experimentos registram a instabilidade de perfil químico de certos óleos essenciais em função da estação do ano, como os encontrados por Botrel et al. (2010) em estudo de *Hypis marrubioides*, onde a proporção monoterpênicos-sesquiterpenos se alterou drasticamente em função da estação do ano, além da alteração na concentração relativa dos compostos majoritários  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona, registrando maiores teores durante o inverno.

Em estudo de *Origanum maajorana*, Soliman et al. (2009) registraram mudança de rendimento e da classe de terpenos majoritários de seu óleo essencial de acordo com a estação do ano. Os maiores teores de monoterpênicos e de sesquiterpenos hidrocarbonetos foram encontrados na estação de outono e na primavera, respectivamente, enquanto os de monoterpênicos oxigenados foram registrados no verão e os sesquiterpenos oxigenados estiveram presentes no outono, não se apresentando em quantidade mensuráveis durante as demais estações do ano.

Khalid et al. (2014), ao acompanharem variações em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* ao longo das estações do ano, encontram uma alternância de proporção entre seus componentes terpênicos. Monoterpênicos e sesquiterpenos oxigenados

foram mais abundantes no verão, enquanto monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonetos foram mais os representativos no outono e no inverno.

Kpoviessi et al. (2011), averiguou a variação de componentes em óleo essencial de *Sclerocarya birrea* (marula), planta nativa da África, encontrando maiores teores de monoterpenos (em especial hidrocarbonetos) e sesquiterpenos oxigenados no mês de fevereiro, durante o verão, do que no mês de agosto, durante o inverno. O inverso ocorreu para os sesquiterpenos hidrocarbonetos, com maiores teores registrado durante o período de temperatura mais fria.

As alterações encontradas na composição dos óleos essenciais podem também estar relacionadas às estações, como demonstrado por Piva et al. (2014), em estudo do pau-santo, *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart, onde compostos como óxido de cariofileno e  $\alpha$ -cadinol foram encontrados em maiores quantidades na primavera do que em outras estações. Outro fato interessante registrado por Piva é a dualidade presença-ausência de alguns compostos, como o cubebol, que esteve presente no outono, mas ausente durante o verão e o inverno, e o dihidroeuodesmol que ocorreu nas amostras de verão, mas não nas de outono. Em seu experimento, realizou testes dos óleos quanto ao combate a diferentes espécies de bactérias e identificou que *Scherichia flexneri*, uma das cepas mais resistentes ao óleo essencial de pau-santo, demonstrou sensibilidade ao óleo coletado durante o período da primavera.

Não somente para a classe química dos terpenos se encontram variações em função da sazonalidade, outros compostos secundários também oscilam de acordo com o período do ano.

Ao trabalhar as espécies *Guapira graciliflora* (guapira) e *Pseudobombax marginatum* (embiratanha), plantas medicinais nativas da Caatinga, Chaves et al. (2013) observaram diferenças na produção de polifenóis e flavonoides durante os períodos de seca e de chuva, onde a maior produção de polifenóis para embiratanha foi encontrada durante períodos chuvosos, ao contrário do que para guapira, com os maiores teores obtidos durante a seca. Quanto aos flavonoides, na época de chuva ocorreu o aumento de produção desta classe de substâncias para guapira, chegando ao dobro do teor registrado durante a época de seca, enquanto embiratanha apresentou níveis muito próximos dos compostos entre os períodos de chuva e seca.

A grande diversidade de resultados encontrados em estudos de produção de compostos secundário, dentro do fator de variação de sazonalidade, demonstram a relevância de estudos de cada espécie de interesse, pois tanto os rendimentos quanto a concentração relativa de compostos, para óleo essencial quanto para extrato, podem variar em função da espécie e dos estímulos ambientais.

## 6. CONCLUSÕES

Dentre as substâncias presentes no óleo essencial, no estudo da variação de tempo de hidrodestilação, as mais representativas foram  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno; (E)-cariofileno e 9-epi-(E)-cariofileno, e o  $\alpha$ -humuleno, sendo que não ocorre diferença em suas concentrações em função do tempo de hidrodestilação, ou seja, a qualidade do óleo essencial, não é prejudicada com a escolha dos menores tempos de hidrodestilação, de 40 ou 60 minutos, que estão associados aos maiores rendimentos.

O rendimento de óleo essencial dos acessos é afetado pelo horário de coleta na primavera e verão. Os horários de coleta de maior produção de óleo essencial nestas estações foram os do começo da manhã, às 06h e às 09h, sendo que os acessos demonstraram queda de rendimento no período tarde. Nas estações de outono e inverno não foi detectada diferença de rendimento entre os horários de coleta.

Os acessos apresentaram incrementos no rendimento de óleo essencial em função das estações do ano, sendo que o de origem do Rio de Janeiro e da Bahia, mais produtivos no verão e inverno, respectivamente.

Em relação à concentração relativa de  $\alpha$ -humuleno, o acesso da Bahia se destacou, apresentando o dobro da concentração quando comparado aos demais

acessos. Quanto sua variação nas estações do ano, sua concentração não se altera na primavera, verão e inverno, ocorrendo comprometimento somente no outono.

Os perfis químicos dos óleos essenciais demonstraram que há grande diferença de composição em função do acesso analisado. Os acessos do sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro) apresentaram perfil químico similar, enquanto os do nordeste (Piauí e Bahia) divergiram entre si e em relação aos demais. Foram encontradas substâncias diferentes entre os acessos, bem como diferentes proporções relativas de compostos em comum dentro de uma mesma estação do ano.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação do tempo de hidrodestilação auxilia no planejamento de estudos que contem com amostras foliares da espécie estudada, quando seu óleo essencial for extraído por meio hidrodestilação em aparato Clevenger, diminuindo qualquer possível ônus resultante de maiores períodos de hidrodestilação.

Embora o acesso nativo do Piauí tenha apresentado maior proporção relativa de  $\alpha$ -humuleno que os demais, as plantas pertencentes a esta população apresentam algumas características que dificultariam sua inserção em uma cadeia produtiva relativa à obtenção de óleo essencial, como a baixa produção de biomassa foliar e baixo rendimento de óleo essencial. Logo, para fins produtivos, se fazem necessários trabalhos que visem o melhoramento vegetal desta população.

Com os dados dos perfis produtivos e químicos de espécies de uso medicinal, pode-se estabelecer protocolos de manejos adequados, de forma a garantir um produto final de qualidade, minimizando possíveis perdas ou alterações durante a manipulação.

Independentemente, é importante salientar a relevância da caracterização do perfil químico e produtivo de cada acesso em cada estação, pois a V.

*curassavica* é uma espécie utilizada para fins medicinais, sendo seu óleo essencial um insumo para a produção de medicamentos.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, F.; HASSANI, A. Chemical composition of the essential oils from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. **J. Mater. Environ. Sci.**, Guelma, v.1, n.6, p.207-213, 2015.

ABU-DARWISH, M.S.et al. Seasonal variation in essential oil yield and composition from *Thymus vulgaris* L. during different growth stages in the south of Jordan. **Natural Product Research**, v. 26, n. 14, p.1310-1317, jul. 2012. DOI: 10.1080/14786419.2011.576344.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation, ed.4, 2007.

ARRAIZA, M.P.; ARRABAL, C.; LÓPEZ, J.V. Seasonal variation of essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). **Not Bot Horti Agrobi**, v.40, n.2, p.106-108, 2012.

ASGHARI, G. et al. Diurnal variation of essential of the oil components of *Pycnocycla spinosa* Decne. ex Boiss. **J Nat Pharm Prod.**, v.9, n.1, p.35-8, fev.2014.

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

BATTEY, N.H. Aspects of seasonality. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.352, p.1769-1780, nov.2000.

BOTREL, P.P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Sci. Agron.**, v.32, n.3, p.533-538, 27 ago. 2010. DOI: 10.4025/actasciagron.v32i3.3415.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, n.161, p.839-851, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011, 126p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

CAMPIGLIA, E. et al. Use of Essential Oils of Cinnamon, Lavender and Peppermint for Weed Control. **Italian Journal of Agronomy**, n.2, p.171-175, 2007.

CARVALHO JR, P.M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal Of Ethnopharmacology**, v.95, n.2-3, p.297-301, dez. 2004. DOI: 10.1016/j.jep.2004.07.028.

CHANG, X.; ALDERSON, P.G.; WRIGHT, C.J. Variation in the essential oils in different leaves of Basil (*Ocimum basilicum* L.) at day time. **The Open Horticulture Journal**, v.2, p.13-16, 2009.

CHAVES, T.P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.8, p.847-853, 20 fev. 2013.

COSTA, O.B. et al. Essential oil constituents and yields from leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) collected during daytime. **International Journal of Forestry Research**, v.2014, p.1-6, fev.2014.

CUNHA, A.R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. **Irriga**, Botucatu, v.14, p.1-11, jan. 2009.

DAI, X. et al. Seasonal changes in the concentrations of plant secondary metabolites and their effects on food selection by *Microtus oeconomus*. **Mammalian Biology**, v.79, p.215–220, 2014.

DAL PIVA, A. et al. Seasonal variation of essential oil of *Cabralea canjerana*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.50, n.1, mar. 2014.

- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo, **Editora Unesp**, ed.2, 604 p., 2002.
- EHLERT, P.A.D. et al. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.2, p.79-80, 2006.
- EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.483, n.1-2, p.220-243, abr. 2015f DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
- ESMAEILIAN, Y. et al. Diurnal variability of stigma compounds of saffron (*Crocus sativus* L.) at different harvest times. Scholars Research Library. **Annals of Biological Research**, v.3, n.3, p.1562-1568, 2012.
- FEIJÓ, E.V. da S.; OLIVEIRA, R.A. de; COSTA, L.C. do B.. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.24, p.516-523, 2014.
- GATTI, A.B. et al. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Braz. J. Biol.**, v.74, n.3, p. S64-S69, 2014.
- GONELI, A.L.D. et al. Cinética de secagem de folhas de erva baleeira (*Cordia verbenacea* DC.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.434-443, 2014.
- GOURINE, N. et al. Seasonal Variation of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil from *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v.87, n.2, p.157-166, out. 2009. DOI: 10.1007/s11746-009-1481-5.
- HERMAN, A. et al. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. **Indian Journal of Microbiology**, v.53, n.2, p.232-237, nov. 2012. DOI: 10.1007/s12088-012-0329-0.
- HERNANDEZ, T. et al. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). **Journal Of Ethnopharmacology**, v.111, n.1, p.137-141, abr. 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2006.11.002.
- HERNÁNDEZ-OCHOA, L. et al. Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. **Journal of Food Science Technology**, v.51, n.5, p.957-963, dez. 2011. DOI: 10.1007/s13197-011-0598-3.
- KHALID, A.K; EL-GOHARY, A.E. Effect of seasonal variations on essential oil production and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) grow in Egypt. **International Food Research Journal**, v.21, n.5, p.1859-1862, 2014.
- KHAN, R.; SHAWL, A.S.; TANTRY, M.A. Determinations and seasonal variation of chemical constituents of essential oil of *Hyssopus officinalis* growing in Kashmir Valeey as

incorporated species of western Himalaya. **Chemistry of Natural Compounds**, v.48, n.3, p.502-505, jul. 2012.

KPOVIESSI, B.G.H.K. et al. Chemical variation of essential oil constituents of *Ocimum gratissimum* L. from Benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* leach. **Chemistry & Biodiversity**, v.9, p.139-150, 2012.

KPOVIESSI, D.S.S. et al. Chemical composition and seasonal variation of essential oil of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst subsp *birrea* leaves from Benin. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.18, p.4640-4646, set. 2011.

MOORE, B.D. et al. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v.201, n.3, p.733-750, out. 2013. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/nph.12526.

NCUBE, B.; FINNIE, J.F.; STADEN, V. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. **South African Journal of Botany**, v.77, p.387–396, 2011.

NIZIO, D.A. de C. et al. Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops And Products**, v.76, p.437-448, dez. 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.07.026.

O'REILLY-WAPSTRA, J.M.; MILLER, A.; POTTS, B.M. Variable patterns of inheritance of ecologically important plant secondary metabolites in an inter-specific eucalypt hybrid. **Forest Ecology And Management**, v.318, p.71-77, abr. 2014. DOI: 10.1016/j.foreco.2014.01.016.

OLIVEIRA, A.R.M.F. et al. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**, v.30, p.155-159, 2012.

OZKAN, G.; BAYDARB, H.; ERBASB, S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.205–209, 2010.

PASSOS, G.F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.2, p.323-333, mar. 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2006.09.032.

PICHERSKY, E; GANGA, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in de plant science**, v.5, n.10, out. 2000.

PRINS, C.L.; LEMOS, C.S.L.; FREITAS, S.P. Efeito de tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.4, p.92-95, 2006.

- ROBERT, A.; HALBERSTEIN, A.E.P. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Ann Epidemiol.**, v.15, n.9, p.686–699, out. 2005.
- ROLDÃO, E.F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.94–98, 2008.
- ROSA, D.D. et al. Ocorrência de *Dictyla monotropidia* Stål (Hemiptera: Tingidae) em *Cordia verbenacea* Al. DC no Brasil. **Neotropical Entomology**, v.37, n.2, p.236-238, 2008.
- SALEHI, S.; GOLPARVAR, A.R.; HADIPANAH, A. Effect of harvest time on yield and quality of *Thymus vulgaris* L. essential oil in Isfahan Province, Iran. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v.79, n.2, p.115-118, 2014.
- SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v.19, n.2, p.436-441, jun. 2009.
- SANTOS, M.S. et al. Harvest time and plant age on the content and chemical composition of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Horticultura Brasileira**, v.30, p.385-390, 2012.
- SANTOS, V.M.C.S. et al. Seasonal variation of vegetative growth, essential oilyield and composition of menthol mint genotypes at southern Brazil. **Biosci. J.**, v.28, n.5, p.790-798, set./out. 2012.
- SARRAZIN, S.L. et al. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, v.20, n.2, p.1860-1871, jan. 2015. MDPI AG. DOI: 10.3390/molecules20021860.
- SEIGLER, D.S. Plant secondary metabolism. **Kluwer Academics Publisher**, La Vergner, 759 p., 2010.
- SHIWAKOTI, S.; SINTIM, H.Y.; POUDYAL, S. Diurnal effects on *Mentha canadensis* oil concentration and composition at two different harvests. **Hortscience**, v.50, n.1, p.85–89, 2015.
- SILVA, E.B.P. et al. The seasonal variation of the chemical composition of essential oils from *Porcelia macrocarpa* R.E. Fries (Annonaceae) and their antimicrobial activity. **Molecules**, v.18, p.13574-13587, 2013. DOI:10.3390/molecules181113574
- SILVA, F. et al. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília v.40, n.4, p.323-328, abr. 2005.
- SOLIMAN, F.M. et al. Seasonal variation in the essential oil composition of *Origanum majorana* L. cultivated in Egypt. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, 2009.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion In Biotechnology**, v.23, n.2, p.136-141, abr. 2012. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG III. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, 3.ed., 2012.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal Of Food Science**, v.79, n.7, p.1231-1249, jun. 2014. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/1750-3841.12492.

TUREK, C.; STINTZING, F.C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v.12, n.1, p.40-53, jan. 2013. Wiley-Blackwell.

VALDÉS, R.; BALBIN, M.I. Curso de fisiología y bioquímica vegetal. **UNAH**. La Habana, Cuba, 89 p., 2000.

ZAWISLAK, G.Z. The chemical composition of essential Hyssop oil depending on plant growth stage. **Acta Scientarum Polonorum**, Hortorum Cultus, v.12, n.3, p.161-170, 2013.

ZHELJAZKOV, V.D.; ASTATKIE, T.; SCHLEGEL, V. Distillation Time Changes Oregano Essential Oil Yields and Composition but Not the Antioxidant or Antimicrobial Activities. **Hortscience**, v.47, n.6, p.777-784, 2012.

ZHELJAZKOV, V.D. et al. Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition. **Journal of Oleo Science**, v.62, n.4, p.195-199, 2013.