

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra*
megapotamica (Spreng.) Mez**

TESE DE DOUTORADO

Lúcio de Paula Amaral

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.)**

Mez

Lúcio de Paula Amaral

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann
Co-orientador: Prof. Dr. Solon Jonas Longhi**

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Amaral, Lúcio de Paula
Caracterização química e avaliação biológica do óleo
essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. /
Lúcio de Paula Amaral.-2014.
129 p.; 30cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Coorientador: Solon Jonas Longhi
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Canela-preta 2. Metabólitos secundários 3.
Bioatividade 4. Fenilpropanoides 5. Terpenoides I.
Heinzmann, Berta Maria II. Longhi, Solon Jonas III.
Titulo.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Lúcio de Paula Amaral. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: lpamaralengflorestal@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o material apresentado

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez**

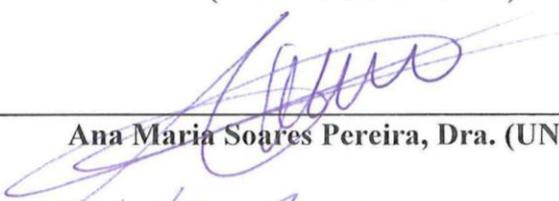
elaborada por
Lúcio de Paula Amaral

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA



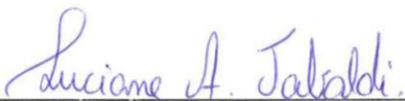
Berta Maria Heinzmann, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



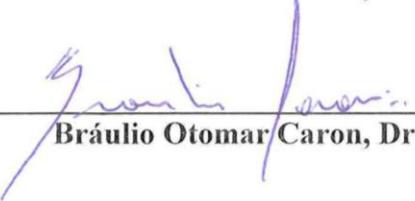
Ana Maria Soares Pereira, Dra. (UNAERP)



Lia Rejane Silveira Reiniger, Dra. (UFSM)



Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM)



Bráulio Otomar Caron, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 04 de agosto de 2014.

BIOGRAFIA

Lúcio de Paula Amaral, filho de José Ulisses Amaral e Vera Lúcia de Paula Amaral, agricultores, nasceu em Itararé, Estado de São Paulo, aos 28 de junho de 1981.

Cursou a primeira e a segunda série em escolas públicas na zona rural de Itararé-SP, e concluiu o primeiro grau na EEPG “Professora Adelaide de Oliveira Terron”, no Distrito de Santa Cruz dos Lopes, no mesmo município.

Cursou o segundo grau, entre os anos de 1996 e 1998, concomitantemente com o curso Técnico em Contabilidade na EMSEGES “Presidente Juscelino Kubitschek de Oliveira”, a conhecida “Escola de Comércio de Itararé”.

Em junho de 2000, concluiu o curso de Técnico Florestal, pela ETE “Dona Sebastiana de Barros” - CEETESP, o tradicional Colégio Agrícola de São Manuel-SP.

Concluiu o curso de graduação em Engenharia Florestal, em 08 de dezembro de 2006, pela Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu-SP, momento em que também recebeu da Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais - FEPAF, o “*Prêmio FEPAF de Destaque em Pesquisa*”.

Possui Especialização em Geomática, pelo Programa de Pós-Graduação em Geomática da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, obtido em janeiro de 2008. Possui Mestrado em Agronomia, obtido em maio de 2010, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná - UNICENTRO, Campus de Guarapuava-PR.

Em setembro de 2010, retorna à UFSM, para iniciar o curso de Doutorado em Engenharia Florestal, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Em março de 2012, ingressou também no curso de Mestrado Profissional em Agricultura de Precisão, do Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão do Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria, do qual também obteve o título de Mestre em janeiro de 2014. Quanto ao curso de Doutorado, o mesmo se encerra com a defesa da presente Tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por colocar em meus caminhos pessoas de bem e por proporcionar-me oportunidades apropriadas, das quais obtive importantes conquistas no período em que estive em Santa Maria-RS.

Agradeço a minha orientadora Prof^ª. Dra. Berta Maria Heinzmann, pela confiança depositada, orientação dedicada, troca de conhecimentos realizada e amizade construída durante o referido curso de Doutorado. Agradeço também de forma especial ao Prof. Dr. Solon Jonas Longhi, pelo grande auxílio dado à este trabalho, devido ao seu conhecimento das florestas em Santa Maria. Agradeço também, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela oportunidade concedida e por dar credibilidade à este trabalho. Agradeço também à todos os professores do curso, pelos ensinamentos transmitidos em suas respectivas disciplinas, bem como aos demais colegas de curso, pela amizade, interação e troca de experiências, que foram muito ricas.

A Regiane, minha querida companheira de todos os momentos, por estar sempre disposta a aceitar novos projetos e desafios, onde quer que seja. Agradeço, em especial, pelo amor, carinho e cuidados dedicados à nossa vida, e pela luta para tornar-nos profissionais de qualidade, independentemente da tarefa que nos é confiada.

Agradeço, de forma especial, aos meus pais, José Ulisses Amaral e Vera Lúcia de Paula Amaral, e à toda minha família, que compreendem a minha ausência, pela saudade e falta de convívio durante todos esses anos, desde o início de meus estudos fora de casa em 2000, devido a busca pela formação qualificada e melhores condições de vida. À eles, que me deram os primeiros ensinamentos e apoio incondicional, que foram a base para a formação profissional e formação de um cidadão de bem, o meu muito obrigado. Agradeço e dedico este trabalho, aos meus avós, Maria Aparecida Rodrigues de Paula e João Batista de Paula (*in memoriam*), pelo grande incentivo que me deram para continuar levar adiante os meus estudos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais - LABEVE, também o meu muito obrigado, por terem participado direta ou indiretamente deste trabalho, auxiliando na obtenção dos óleos essenciais e na realização dos experimentos, sem os quais não seria possível obter a presente Tese. Agradeço em especial, a Bianca Schindler e Nádia Helena Bianchini, bolsistas que contribuíram ativamente a este trabalho.

Por fim, o meu muito obrigado à todos as pessoas, orientadores, professores, amigos e colegas de trabalho ou de estudos, que permito-me não citar nomes para não cometer nenhuma injustiça, dos quais recebi muita ajuda e incentivos durante esta caminhada, para conseguir chegar até aqui, e nesta data, poder concluir este curso de Doutorado em Engenharia Florestal.

“Dai-me um ponto de apoio, e
eu moverei o mundo”

(Arquimedes)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez

AUTOR: LÚCIO DE PAULA AMARAL

ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

Santa Maria, 04 de agosto de 2014.

Nectandra megapotamica (Lauraceae) é abundante na Floresta Estacional Decidual em Santa Maria-RS. O seu óleo essencial (OE) vêm sendo estudado quanto às atividades biológicas, devido a sua ação anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, citotóxica contra células tumorais, dentre outras. Na prospecção do OE foram encontrados fenilpropanoides, além de atividades sedativas e anestésicas em *Rhamdia quelen*. Como hipótese, considerou-se que haja variabilidade sazonal e ocorrência de fenótipos químicos para os indivíduos na mesma população da espécie, com atividade biológica diferenciada para o OE. Os objetivos deste trabalho foram pesquisar o potencial de *N. megapotamica*, em uma população em Santa Maria, para a produção de OE; determinar o rendimento (R), a composição química e sua variação sazonal; avaliar a possível ocorrência de fenótipos químicos (composição química diferenciada); isolar constituintes de interesse; e por fim, realizar testes de atividades biológicas, para o OE e para o isolado. Os OE foram obtidos de folhas frescas, inicialmente separadas em jovens (FJ) e velhas (FV), por hidrodestilação em triplicata por três horas. As coletas ocorreram em função das estações do ano, em dois locais em Santa Maria-RS (Morro do Elefante e, na proximidade do km 318 da BR 158). Foram determinados os respectivos R, e os OE foram analisados por CG-EM. Algumas amostras também foram analisadas por CG-DIC, em triplicata. A composição química do OE dos indivíduos coletados foi analisada e agrupada por técnicas multivariadas, componentes principais e agrupamento hierárquico. Foi também realizado fracionamento do OE por CC, para o isolamento de uma substância, cuja identificação se deu por RMN. Determinados os grupos químicos (GQ) e o constituinte isolado, os grupos mais discrepantes (GQ2 e GQ5) foram testados quanto a atividade alelopática, inseticida e anestésica em peixes. A isoelemicina foi avaliada para esta última. O maior R do OE foi observado na primavera (FJ 0,24% e FV 0,14%), durante a floração, frutificação e foliação, e o menor no outono (FJ 0,13% e FV 0,11%), na rustificação e repouso. Os constituintes majoritários foram α -pineno, com maior R na primavera e verão (FJ 30,81% e FV 35,86%), e biciclogermacreno, com maior R no outono e inverno (FJ 24,19 e FV 21,73%). Estes formaram dois grandes GQ. No GQ do biciclogermacreno foi observada a presença de fenilpropanoides, que constituíram um grupo específico (GQ5). Já o GQ2 apresentou maiores teores de monoterpenoides. Do OE do GQ5 foi isolada a isoelemicina (fenilpropanoide). Nos testes biológicos realizados foram observadas atividade alelopática (menor germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas) para *Lactuca sativa* cv. regina, *Bidens subalternans*, *Glicine max*, *Avena strigosa*, *Lolium multiflorum* e *Oryza sativa*; atividade inseticida em *Nezara viridula* e sedação em *R. quelen*. O GQ5 foi superior ao GQ2, nos testes de alelopatia em *O. sativa*, mas ambos os grupos foram ativos na concentração de 15% de OE para as demais espécies, inibindo 100% da germinação de *B. subalternans* (GQ5) e de *A. strigosa* (ambos os grupos). Na ação inseticida com 5% do OE, o GQ5 promoveu 46,67% de mortalidade de *N. viridula*, e o GQ2 apenas 14,44%. Em *R. quelen* foi observada sedação associada à toxicidade, tanto pelo OE similar ao GQ5 (obtido do segundo local de coleta) como pela isoelemicina. O estágio de anestesia foi observado na concentração de 500 mg L⁻¹ de OE, mas o efeito foi inferior ao observado para o eugenol com 50 mg L⁻¹ (controle positivo). Conclui-se que a espécie, na população avaliada, possui potencial para produzir OE, como fonte de novas moléculas bioativas e mecanismos de ação biológica, que devem considerar a componente de toxicidade, o que exigirá novas pesquisas.

Palavras-chave: Canela-preta. Metabólitos secundários. Bioatividade. Fenilpropanoides. Terpenoides.

ABSTRACT

Doctoral Dissertation
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL EVALUATION OF *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. ESSENTIAL OIL

AUTHOR: LÚCIO DE PAULA AMARAL

ADVISER: BERTA MARIA HEINZMANN

Santa Maria, August 4th 2014.

Nectandra megapotamica (Lauraceae) is abundant in the Deciduous Forest in Santa Maria-RS. Its essential oil (EO) has been studied for biological activities due to its anti-inflammatory, antifungal, antimicrobial, and cytotoxic effects against tumor cells, among others. The presence of phenylpropanoids as well as sedative and anesthetic activities in *R. quelen* were observed in the prospect of EO of *Nectandra megapotamica*. As a hypothesis, we considered the seasonal variability and the occurrence of chemical phenotypes for the individuals in the same population of the species with different biological activities for the EO. The objectives of this study were to define the potential of *N. megapotamica* in a population in Santa Maria-RS for the production of EO; to determine the yield (Y), chemical composition and the seasonal variation of EO; to evaluate the possible occurrence of chemical phenotypes (differentiated chemical composition); to isolate compounds of interest; and to perform tests of biological activities for the EO and for the isolated compound. The EO samples were obtained from fresh leaves, which were initially separated in young (YL) and old leaves (OL) by hydrodistillation in triplicate for three hours. The collections occurred in function of the seasons in two locations in Santa Maria-RS (*Morro do Elefante*, and in the proximity of the 318 km of BR 158). The respective Y values were determined, and EO samples were analyzed by GC/MS. Some samples were also analyzed by GC-FID, in triplicate. The chemical composition of the EO was analyzed and grouped by multivariate techniques, main components and hierarchical grouping. The EO was also fractionated by CC, for the isolation of a compound, whose identification happened by NMR. The discrepant groups (CG2 and CG5) were tested for allelopathic, insecticide and anesthetic activities in fish. The compound obtained from CG5 was identified as isoelemicin (phenylpropanoid) and also tested for the anesthetic activity. The largest Y for the EO was observed in spring (YL 0.24% and OL 0.14%) during flowering, fruiting and foliation, and the lowest in autumn (YL 0.13% and OL 0.11%) in the rustification and at rest. The major constituents were α -pinene with greater Y in spring and summer (YL 30.81% and OL 35.86%), and bicyclogermacrene with greater Y in autumn and winter (YL 24.19% and OL 21.73%), which formed two large CG. In the CG of bicyclogermacrene, the presence of phenylpropanoids was observed and therefore it constituted a specific group (CG5). However, CG2 presented higher concentration of monoterpenoids. In the biological tests, the allelopathic activity (lower seed germination and seedling development) for *L. sativa* var. *regina*, *B. subalternans*, *G. max*, *A. strigosa*, *L. multiflorum* and *O. sativa* was observed when the seeds were submitted to the EO. Moreover, the insecticidal activity was observed in *N. viridula*, and also sedation in *R. quelen*. The CG5 was superior than CG2, concerning allelopathy in *O. sativa*; however, both groups were active at the concentration of 15% EO for the other species, which inhibits 100% germination of *B. subalternans* (QG5) and *A. strigosa* (both groups). Regarding the insecticidal action of EO at 5%, the CG5 promoted 46.67% mortality of *N. viridula*, and CG2 only 14.44%. Concerning *R. quelen*, we observed toxicity associated with sedation, both by the EO similar to CG5 and by isoelemicin. The stage of anesthesia was observed at the concentration of 500 mg L⁻¹ EO; however, the effect was lower than that observed for eugenol (positive control). In conclusion, the species in the population assessed has the potential to produce EO as a source of new bioactive molecules and biological action mechanisms that should consider the toxicity component, which requires further studies.

Keywords: Canela-preta. Secondary metabolites. Bioactivity. Phenylpropanoids. Terpenoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Distribuição de *Nectandra megapotamica* no Brasil 20
- Figura 2.** *Nectandra megapotamica* – aspecto geral da árvore fora da floresta (1.A); detalhes das folhas nos ramos (1.B); detalhes da inflorescência (1.C); detalhes dos frutos (1.D) detalhes da casca (1.E) 21

ARTIGO 1

- Figure 1.** Seasonal variability of the major constituents of the essential oils of *Nectandra megapotamica* in young leaves–YL (1.A) and old leaves–OL (1.B) collected in Santa Maria, RS, Brasil 34
- Figure 2.** Seasonal variability of the major constituents of the essential oils of *Nectandra megapotamica* grouped into classes: monoterpenes and sesquiterpenes in young leaves–YL (2.A) and old leaves–OL (2.B) collected in Santa Maria, RS, Brasil 35

ARTIGO 2

- Figura 1.** Dendrograma para el agrupamiento de las muestras de los AE de HJ (1.A) y HV (1.B) de *Nectandra megapotamica*, recolectadas en Santa Maria-RS 50
- Figura 2.** Dispersión de los casos para los AE de HJ (2.A) y HV (2.C), y de las variables para los AE de HJ (2.B) y HV (2.D) de *N. megapotamica* recolectadas en Santa Maria-RS 51

MANUSCRITO 1

- Figura 1.** Atividade alelopática do OE de *N. megapotamica* para o fator grupo químico 69
- Figura 2.** Atividade alelopática do OE de *N. megapotamica* para o fator concentração 70
- Figura 3.** Análise de tendência para as CP1 média das espécies dicotiledôneas (3.A) e monocotiledôneas (3.B) submetidas a ação alelopática dos OE de *N. megapotamica* 71
- Figura 4.** Atividade alelopática do OE de *N. megapotamica* para os tratamentos empregados 73

RESULTADOS ADICIONAIS

- Figura 1.** Material utilizado nos testes de avaliação de atividade inseticida. Placa de petri de vidro de 9 centímetros de diâmetro com 10 indivíduos adultos de percevejo da soja (1.A); borrifadores de vidro com válvula spray para aplicação de solução com OE (1.B); Forma de aplicação dos tratamentos (1.C) 87
- Figura 2.** Atividade inseticida dos OE do GQ5 e GQ2, obtidos das folhas velhas de *N. megapotamica* coletadas no Morro do Elefante, Santa Maria-RS 89
- Figura 3.** Variabilidade da precipitação acumulada (A), temperatura (B), umidade relativa do ar (C), insolação (D), pressão atmosférica (E) e rendimento do óleo essencial de *Nectandra megapotamica* para os dois períodos de coleta (F) em Santa Maria-RS 92

Figura 4.	Varição das classes químicas de constituintes no OE de <i>N. megapotamica</i> obtido de folhas coletadas nas proximidades do KM 318 da BR 158 em Santa Maria-RS	93
Figura 5.	Estrutura química da isoelemicina	99
Figura 6.	Estágios T2 e T3(a) do teste de atividade anestésica para diferentes concentrações do OE de <i>N. megapotamica</i> e isoelemicina aplicados em <i>R. quelen</i>	104
Figura 7.	Estágios T3(b) e T4 do teste de atividade anestésica para diferentes concentrações do OE de <i>N. megapotamica</i> e isoelemicina aplicados em <i>R. quelen</i>	105
Figura 8.	<i>Rhandia quelen</i> em estágio T4 sob concentração de 500 mg L ⁻¹ de OE de <i>N. megapotamica</i> similar aos do GQ5, dentro do aquário contendo o banho (1.A) e fora do aquário (1.B) para medida do comprimento e pesagem	106
Figura 9.	Tempo de recuperação do teste de atividade anestésica para diferentes concentrações do OE de <i>N. megapotamica</i> e isoelemicina aplicados em <i>R. quelen</i> ..	107

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1.** Descriptive statistics for the yield on dry bases of the EO in leaves of *Nectandra megapotamica* collected in *Morro do Elefante*, Santa Maria, RS, Brazil 32
- Table 2.** Major constituents common to all samples of EO of young leaves of *Nectandra megapotamica* collected in the four seasons of the year at *Morro do Elefante*, Santa Maria, RS, Brazi 33
- Table 3.** Major constituents common to all samples of EO of old leaves of *Nectandra megapotamica* collected in the four seasons of the year at *Morro do Elefante*, Santa Maria, RS, Brazi 33

ARTIGO 2

- Tabla 1.** Composición química de los AE de HJ de *N. megapotamica* colectadas em Santa Maria-RS 44
- Tabla 2.** Composición química de los AE de HV de *N. megapotamica* colectadas em Santa Maria-RS 47

MANUSCRITO 1

- Tabela 1.** Composição química dos OE de *N. megapotamica* classificados nos grupos químicos 2 e 5, obtidos de folhas coletadas em Santa Maria, RS, Brasil 64
- Tabela 2.** Valores médios das variáveis mensuradas nas espécies-alvo para atividade alelopática dos OE de *N. megapotamica* 66
- Tabela 3.** Componente principal 1 obtida para a atividade alelopática dos OE de *N. megapotamica* sobre a germinação e desenvolvimento das espécies-alvo avaliadas .. 68

RESULTADOS ADICIONAIS

- Tabela 1.** Percentagem da mortalidade acumulada de *Nezara viridula* ao longo de 24 horas após a aplicação dos tratamentos 88
- Tabela 2.** Rendimento (%) base úmida do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica* coletadas próximas ao km 318 da BR 158 em Santa Maria-RS 91
- Tabela 3.** Composição química dos OE de folhas de *N. megapotamica* coletadas próximo ao km 318 da BR 158 em Santa Maria-RS 94
- Tabela 4.** Composição química do OE de folhas frescas de *N. megapotamica* 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A;
ANOVA – Análise de variância;
CC – Cromatografia em coluna;
CCD – Cromatografia em camada delgada;
CG – Cromatografia gasosa;
CPs – Componentes principais;
D – Densidade;
DIC – Detecção iônica em chama;
DMAPP – Dimetil-alil-difosfato;
DXP – Deoxi-xilulose-5-fosfato;
EM – Espectrometria de Massas;
FJ – Folhas jovens;
FV – Folhas velhas;
g – Grama;
GPS – Global Position Systems;
GQ – Grupo químico;
HCA – Hierarchical Cluster Analysis;
IK – Índice de Kovatz;
IPP – Isopentenil difosfato;
L – Litros;
mL – Mililitros;
mv – Material vegetal;
NI – Não identificado;
OE – Óleo(s) essencial(ais);
PAL – Fenilalanina amônia liase;
PCA – Principal Component Analysis;
Rbu% – Rendimento em porcentagem base úmida;
Rbs% – Rendimento em porcentagem base seca;
RMN – Resonância magnética nuclear;
μL – Microlitros.

LISTA DE SÍMBOLOS

α – alfa;

β – beta;

δ – delta;

γ – gama;

τ – tau;

E – trans;

Z – cis;

® – Produto registrado;

% – Percentagem;

– Fenilpropanoides com perfil de fragmentação do espectro de massa semelhante a *E*-asarona;

@ – Fenilpropanoides com perfil de fragmentação do espectro de massa semelhante a *Z*-asarona;

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1** - Precipitação (mm) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B) 125
- Anexo 2** - Temperatura (°C) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B) 126
- Anexo 3** - Umidade relativa do ar (%) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B) 127
- Anexo 4** - Insolação (h) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B) 128
- Anexo 5** - Pressão atmosférica (hPa) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B) 129

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 HIPÓTESES	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 ARTIGOS	28
4.1 Artigo 1	28
Seasonal Influence on the Essential Oil Production of <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	29
Abstract	29
INTRODUCTION	29
MATERIAL AND METHODS	30
Extraction and characterization of the essential oil	30
Statistical analysis	31
RESULTS AND DISCUSSION	31
Analysis of the essential oil yields	31
Analysis of the major chemical composition of the essential oil	32
Seasonal and phenological influence	36
CONCLUSION	37
ACKNOWLEDGEMENTS	37
REFERENCES	38
4.2 Artigo 2	40
Variabilidad de la composición química del aceite esencial de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (Lauraceae)	41
Resumen	41
Abstract	41
INTRODUCCIÓN	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Lugar de recolección y material vegetal	43
Obtención del AE y análisis de la composición química	43
Análisis multivariado	43
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	54
AGRADECIMIENTOS	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
5 MANUSCRITO	57
5.1 Manuscrito 1	57
Óleo essencial de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (Lauraceae): composição química x efeito alelopático	58

Resumo	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	60
Obtenção dos óleos essenciais	60
Análise dos óleos essenciais	61
Análise da atividade alelopática	61
Espécies-alvo	61
Bioensaios	62
Análise estatística	63
RESULTADOS	63
Análise da composição química dos OE	63
Análise da atividade alelopática	66
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
6 RESULTADOS ADICIONAIS	86
6.1 Teste de atividade inseticida do OE de <i>N. megapotamica</i>	86
6.1.1 Parte experimental	86
6.1.2 Resultados	88
6.2 Segunda área de coleta	90
6.2.1 Parte Experimental	90
6.2.2 Resultados	91
6.3 Isolamento de um fenilpropanoide do OE de <i>N. megapotamica</i>	98
6.3.1 Parte Experimental	98
6.3.2 Resultados	98
6.4 Teste de atividade anestésica do OE de <i>N. megapotamica</i> em peixes	100
6.4.1 Parte Experimental	100
6.4.2 Resultados	101
7 DISCUSSÃO GERAL	108
8 CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	124

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é constituído pela apresentação dos resultados obtidos para compor a defesa da Tese de Doutorado em Engenharia Florestal. Inicialmente é apresentada uma breve introdução sobre o assunto, a fim de fornecer uma descrição sobre a espécie arbórea nativa em estudo e descrever aspectos relevantes relacionados à caracterização e atividade biológica do óleo essencial obtido. Logo em seguida, são descritas as hipóteses e os objetivos deste trabalho.

Os resultados estão organizados na forma de dois artigos científicos, com sua formatação específica, que encontram-se aceitos para publicação em periódicos da área, além de um manuscrito, a ser ainda submetido, e de resultados adicionais. O primeiro artigo trata da avaliação sazonal do rendimento e da composição química majoritária do óleo essencial de *Nectandra megapotamica*, e encontra-se aceito pelo periódico *Brazilian Archives of Biology and Technology* (BABT). Já o segundo artigo, trata da caracterização de perfis químicos do óleo essencial da espécie (fenótipos químicos) para os espécimes coletados em Santa Maria-RS, também aceito para publicação pelo periódico *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales e Aromaticas* (BLACPMA).

O manuscrito 1 descreve a ação alelopática do óleo essencial em sementes de culturas agrícolas (soja e arroz), espécies de plantas daninhas (picão-preto e azevém), e em espécies descritas na literatura especializada como bioindicadoras de alelopatia, tradicionalmente utilizadas em experimentos desta natureza (alface e aveia-preta). Foram comparados os efeitos de dois fenótipos químicos do óleo essencial, um com a presença de fenilpropanoides de interesse e outro sem a presença destes constituintes. Na sequência, são apresentados alguns resultados adicionais, como o rendimento e a composição química do OE obtido em uma segunda área de coleta, o isolamento de um fenilpropanoide, e a ação anestésica em peixes, do óleo essencial bruto contendo fenilpropanoides, bem como de um constituinte isolado pertencente a esta classe de metabólitos secundários presente nos óleos essenciais da espécie em estudo. É, também, apresentada uma discussão geral, para correlacionar os resultados obtidos, entre si e com a literatura, e fazer uma interpretação de todo o contexto construído ao longo dos experimentos realizados. A Tese é, então, finalizada, pelas conclusões e referências bibliográficas.

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira, que compõe as florestas nativas e demais formas de vegetação dos biomas, está, na atualidade, em destaque como fonte de matéria-prima para a produção de diversos produtos, a exemplo das indústrias de fármacos, cosméticos, produtos de higiene pessoal, para medicina veterinária, alimentícia, controle de pragas e doenças em plantas, dentre outras possibilidades (PROPERZI et al., 2013). Esse novo foco confere outra opção para o uso de espécies arbóreas, além da produção madeireira, abrindo uma variada gama de opções de matéria-primas a serem produzidas para a demanda da indústria, a exemplo dos óleos essenciais (OE). Este tipo de uso da floresta e de seus recursos, pode constituir uma fonte de renda para os agricultores e contribuir para mudar o conceito de que florestas nativas são áreas improdutivas e sinônimo de problemas para uma propriedade rural.

Os OE são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e de teores variáveis (SIMÕES e SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008), presentes em grande número de espécies vegetais, sintetizados e/ou armazenados em estruturas especializadas presentes nos órgãos das plantas, como frutos, sementes, cascas, folhas, flores, raízes e até mesmo na madeira (BIASI e DESCHAMPS, 2009). Sua extração pode ser realizada sem, necessariamente, envolver o corte raso da floresta ou corte de árvores, auxiliando na manutenção da floresta em pé, o que pode ser considerado um ponto positivo para a realização de manejo florestal visando a produção de óleos essenciais, bem como a de outros produtos não-madeireiros.

Dentre as inúmeras espécies de plantas das quais pode ser extraída uma grande variedade de óleos e essências, estão aquelas das famílias botânicas Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae, Zingiberaceae, entre outras (BRUNETON, 2001). Dentre estas, merecem destaque àquelas pertencentes à Família Lauraceae, a qual contém um grande número de espécies nativas do Brasil, dentre as quais há *Nectandra megapotamica* (Spreng) Mez (LORENZI e SOUZA, 2008), objeto do presente estudo. As Lauráceas têm distribuição pantropical, e estão bem representadas na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, e de maneira pouco expressiva no sul da África (ROHWER, 1993). No Brasil, são conhecidos 22 gêneros, que ocorrem em sua maior parte nas Florestas Pluviais e, também, nas Restingas e nos Cerrados (BARROSO et al., 2002), com cerca de 400 espécies (LORENZI e SOUZA, 2008).

N. megapotamica é conhecida, popularmente, por canela-preta no Rio Grande do Sul, um dos seus locais de ocorrência (Figura 1). Pode ser encontrada, também, nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e Santa Catarina (REITZ et al., 1988; LORENZI, 2002), além de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (CARVALHO, 2006), bem como no Paraguai, Argentina e Uruguai (BAITELLO, 2003). No Rio Grande Sul, a espécie apresenta ampla distribuição nas florestas nativas (BRENA e LONGHI, 2002; TONINI et al., 2003), participando da composição da Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual e Decidual (MARCHIORI, 1997).

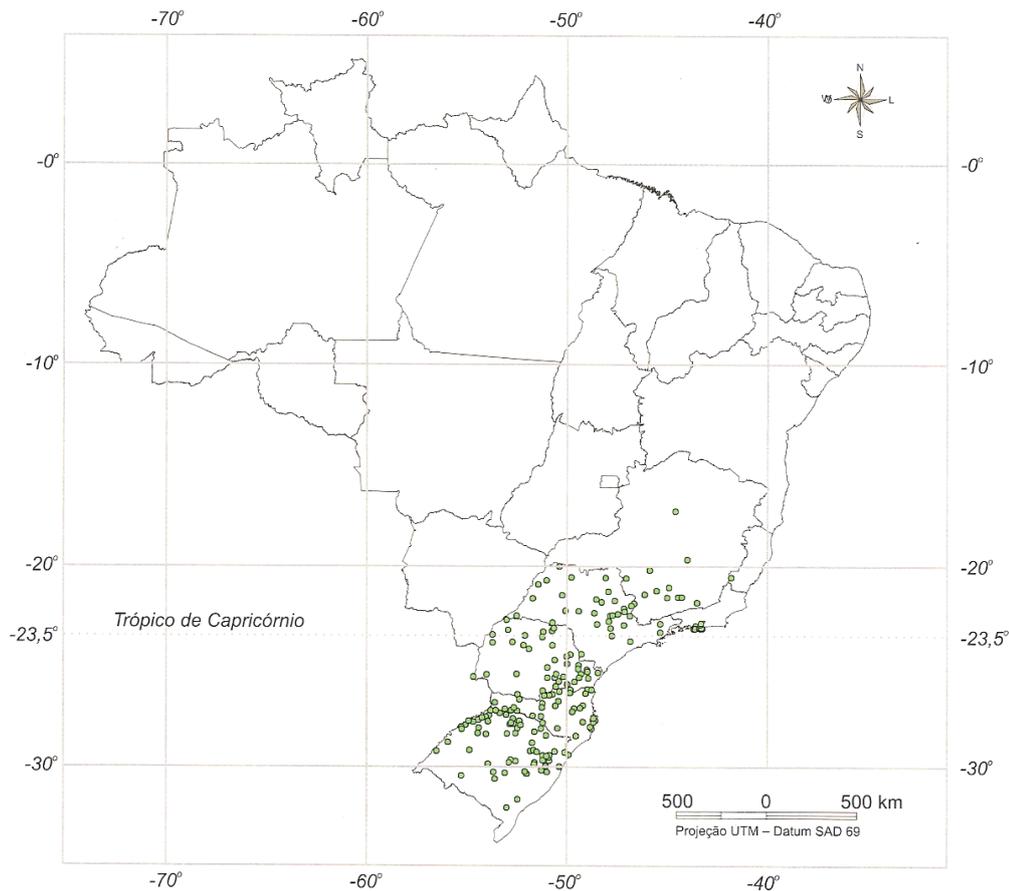


Figura 1 - Distribuição de *Nectandra megapotamica* no Brasil.

Fonte: Carvalho (2006).

A espécie é uma árvore de médio porte (Figura 2), de 15 a 30 m, com tronco geralmente tortuoso, acanalado, de até 80 cm de diâmetro, copa globosa quando jovem,

perenifólia, verde-escura, sem preferência definida por tipo de solo, e adaptada a condições de sombra. A casca, de cor castanha, desprende-se em pequenas placas, que deixam cicatrizes onduladas muito características (MARCHIORI, 1997; LORENZI, 2002). As folhas são alternas simples, coriáceas, glabras, providas de pecíolo de até 1,5 cm, lanceoladas, medindo de 7 a 15 cm de comprimento por 2 a 4 cm de largura. Possuem ápice acuminado, base aguda, margem inteira e nervação peninérvea. São verde-escuras na face adaxial, mais claras e desprovidas de domácias na abaxial (MARCHIORI, 1997).

As flores, são pequenas, com cerca de 6 mm, branco-amareladas, que se concentram em densas panículas axilares na extremidade dos ramos. Os frutos são ovoides, cerca de 15 mm, castanho-escuros, possuem cúpula de apenas 5 mm. As flores aparecem no final do inverno ou início da primavera e a maturação dos frutos ocorre em meados do verão (MARCHIORI, 1997). Para Lorenzi (2002), a espécie floresce a partir de junho, prolongando-se até setembro, e os frutos amadurecem entre novembro e janeiro.

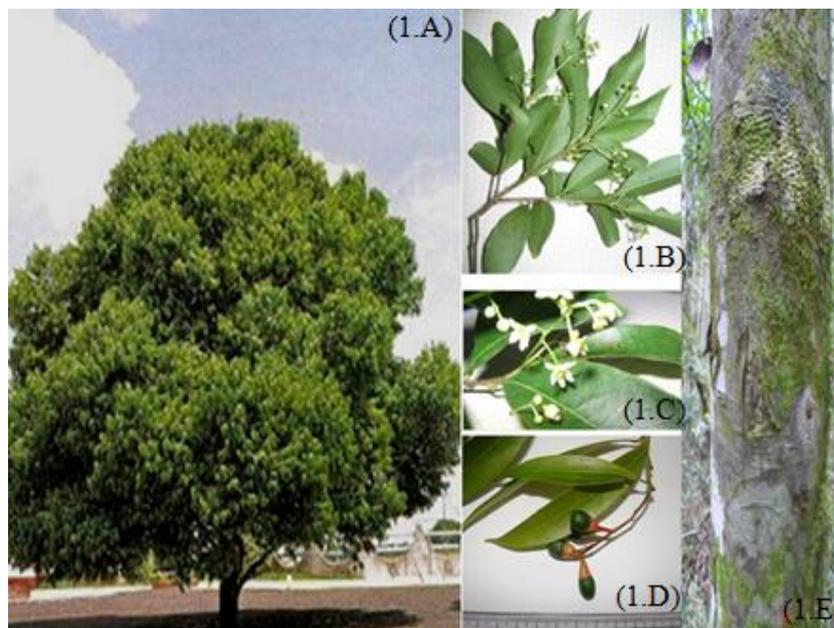


Figura 2 - *Nectandra megapotamica* – aspecto geral da árvore fora da floresta (1.A); detalhes das folhas nos ramos (1.B); detalhes da inflorescência (1.C); detalhes dos frutos (1.D); detalhes da casca (1.E).

Fonte: adaptado de Lorenzi (2002); FLORARS: Alexandre Korte (2010), Mateus Bise, (2012).

Sua madeira apresenta forte odor característico e muitas vezes desagradável, mas poderia ser utilizada na construção civil e naval devido as suas características xilotecnológicas

(MARQUES, 2001). A espécie também é indicada para a recomposição de matas ciliares, para o enriquecimento florestal ou adensamento de capoeirões, florestas exploradas ou devastadas (SOUZA e MOSCHETA, 2000). Adicionalmente, o consumo de seus frutos por aves é descrito na literatura (LORENZI, 2002; KRÜGEL et al., 2006; ALIBERTI e MORELLATO, 2010).

A espécie possui uso etnobotânico e medicinal. As folhas são usadas para o tratamento de tosses, gripes e como calmante. As cascas são utilizadas como analgésico, antirreumático e para o tratamento de abscessos, sendo que as raízes possuem propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SILVA FILHO et al., 2004; MELLO et al., 2005; ALVES et al., 2008). Garcez et al. (2009) obtiveram quatro constituintes no extrato etanólico das cascas do tronco, sendo eles elemicina, isoelemicina, (\pm)-eritro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol e (\pm)-treo-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol, e relataram sua atividade antifúngica *in vitro*.

O óleo essencial (OE) de *N. megapotamica* vem despertando o interesse de pesquisadores, uma vez que vêm sendo realizados estudos sobre seu rendimento, composição química e aplicação. Exemplificando os resultados obtidos Apel et al. (2006) descreveram sua ação anti-inflamatória, enquanto Brito (2009) avaliou a influência sazonal de três árvores no Parque Estadual do Ipiranga e descreveu sua atividade antifúngica e antimicrobiana, sendo que ambos os trabalhos foram realizados com OE obtido em materiais coletados em São Paulo. Tondolo et al. (2013) demonstraram sua ação anestésica em robalo-peva (*Centropomus parallelus*), a partir do OE de folhas coletadas em Santa Maria-RS. Já Torres et al. (2014) observaram, a inibição *in vitro* da atividade hemolítica do veneno de jararaca (*Bothrops diporus*), com OE obtido em material coletado em Loma de Vallejos, Corrientes, Argentina.

Os OE exercem, nas plantas, as funções de auto-defesa, atração de polinizadores, de dispersores de sementes e de inimigos naturais de insetos praga (WOLFFENBÜTTEL, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2013). Portanto, atuam na interação das plantas com o ambiente em que vivem, expressando as influências das relações com fatores bióticos e abióticos no rendimento e composição química do OE (PERES, 2004). Essa gama variada de funções é dada pela presença de constituintes originados por distintas rotas biossintéticas, a exemplo das rotas dos terpenoides e a dos fenilpropanoides, duas principais classes químicas de substâncias presentes nos óleos essenciais (PERES, 2004; BIASI e DESCHAMPS, 2009), que os tornam atrativos, como matéria-prima, para vários ramos da indústria.

A produção de OE e de outros metabólitos secundários, pode ser influenciada por diversos fatores, tais como a sazonalidade, índice pluviométrico, ritmo circadiano, radiação

ultra-violeta, composição atmosférica, herbivoria e ataque de patógenos, idade da planta, órgão onde é sintetizado, disponibilidade de água, teor de macronutrientes e micronutrientes, temperatura e altitude (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2013). Também influenciam a produção de OE, a genética (TAVARES et al., 2005; LAMIEN MEDA et al., 2010) e a fenologia ou estágio de desenvolvimento dos espécimes (MARTINS et al., 1995; BRITO, 2010; MARCO et al., 2011).

A formação da maioria dos constituintes dos OE se dá a partir da polimerização do isopreno (moléculas com 5 átomos de carbono), originado a partir do ácido mevalônico e resultando nos terpenoides. Já os fenilpropanoides, provém do ácido chiquímico (GUENTHER, 1977; SIMÕES et al., 2004). Segundo Taiz e Zeiger (2004; 2013), os terpenoides são sintetizados nos cloroplastos pela via plastídica e no citoplasma pela via da deoxi-xilulose-5-fosfato (DXP). Estes são classificados quanto ao número de carbonos contidos em suas estruturas, como os monoterpenoides (moléculas com 10 átomos de carbono), que são formados por duas unidades de isopreno. São os constituintes terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais, presentes em cerca de 90% dos mesmos. Geralmente são acompanhados pelos sesquiterpenoides (moléculas com 15 átomos de carbono), constituídos por três unidades de isopreno (SIMÕES e SPITZER, 2004). Já a síntese dos fenilpropanoides ocorre pela via do chiquimato. Essas vias metabólicas têm sido intensamente estudadas nos últimos anos, principalmente em trabalhos envolvendo a síntese de lignina e de compostos como chavicol, eugenol, metil-chavicol e metil-eugenol (TAIZ e ZEIGER, 2004; BIASI e DESCHAMPS, 2009).

Em função destas três rotas biossintéticas, que são influenciadas por fatores de diversas naturezas, há um número quase incontável de substâncias sintetizadas, resultando em uma enorme variação na composição química dos OE (BASER e BUCHBAUER, 2010). Os terpenoides e fenilpropanoides presentes nos OE são os principais constituintes que conferem suas características organolépticas, cor, odor, sabor (BIZZO et al., 2009), e, também, de bioatividade.

Na família Lauraceae, os OE podem ser observados em células secretoras, denominadas idioblastos, que são células que apresentam notáveis diferenças em relação às células adjacentes, quanto à forma, conteúdo e estrutura parietal. Estas células podem ser encontradas nas folhas, na casca e/ou no lenho (METCALFE, 1987; BARROS et al., 1997), sendo que, em algumas espécies desta família, a presença de idioblastos pode ser frequente ou de ocorrência rara (SILVA e MEDEIROS, 2000). Como *Nectandra megapotamica* é uma

espécie perenifólia, este trabalho dará enfoque para aos OE obtidos a partir de folhas, de maneira a atender a hipótese e aos objetivos elaborados.

Para tanto, foi coletado material vegetal da espécie em duas áreas na Floresta Estacional Decidual (IBGE, 2012) em Santa Maria, sendo a primeira na base do Morro do Elefante, referente ao período de coleta de novembro de 2010 à setembro de 2011, tendo de 114 a 172 m de altitude e face de exposição sul. Já o segundo local, referente ao período de novembro de 2011 à agosto de 2012, foi próximo ao km 318 da BR 158, no sentido Santa Maria à Itaara-RS, tendo de 232 a 249 metros de altitude e face de exposição oeste. Estes locais são próximos, distanciados a aproximadamente 5 km. O clima nesta região é do tipo Subtropical úmido *Cfa* (WREGE et al., 2011), com temperatura média anual entre 17,9 a 19,2° C, ocorrendo precipitação em torno de 1691 mm. Já os solos são da classe dos Neossolo Regolítico eutrófico léptico, unidade Charrua (Streack et al., 2008).

Devido ao fato das características do ambiente serem um dos fatores que influenciam a produção de OE (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2013), com destaque para as influências do clima, o mesmo foi brevemente descrito, para os dois períodos de coleta, utilizando dados da estação meteorológica convencional de Santa Maria-RS (Estação 83936), integrante da rede de estações do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Esta estação localiza-se a latitude Sul 29,70° e longitude Oeste 53,70°, a 95 metros de altitude (INMET, 2014). As variáveis disponíveis na mesma para os períodos de interesse foram precipitação (mm), temperatura (°C), umidade relativa do ar (%), insolação (h) e pressão atmosférica (hPa) (Anexos).

Segundo Caviglione (2000) e Wrege et al. (2011), a precipitação é definida como a deposição de qualquer forma de água, no estado líquido ou sólido, proveniente da atmosfera, tais como chuva (Anexo 1), ganizo, neve, neblina, chuvisco, orvalho, entre outros hidrometeoros. Normalmente é expressa em milímetros, sendo que uma chuva de 1 mm equivale ao volume de 1 L m⁻². A temperatura é a parte da radiação solar global que atinge a superfície terrestre e é absorvida e convertida em calor sensível, aquecendo o ar, influenciando o estado de agitação de suas partículas, sendo geralmente expressa em graus Celsius (°C) (Anexo 2).

Já a umidade relativa do ar representa o quanto de vapor de água existe na atmosfera em um determinado momento, em relação ao máximo de vapor que poderia conter a uma dada temperatura ambiente, sendo expressa em percentagem (Anexo 3). O número de horas de sol ou brilho solar definem a insolação, expressa em horas e décimos (Anexo 4). É a

radiação com incidência luminosa direta, sem a presença de nuvens, mais relacionada a radiação visível do que com os demais comprimentos de onda do espectro radiométrico, acumulada em um dado período, como dia, mês ou estação do ano. A pressão atmosférica refere-se ao peso exercido por uma coluna de ar, com secção reta de área unitária, que sobrepõe uma dada porção de área da superfície terrestre, em um dado instante e local (Anexo 5). Quando o ar é aquecido, suas moléculas ficam mais agitadas e o mesmo se expande, com o aumento de seu volume, ocorre a diminuição de seu peso sobre uma dada área, diminuindo também a pressão atmosférica. Já com o ar frio ocorre o processo inverso, resultando em aumento na pressão atmosférica (VAREJÃO-SILVA, 2006). Geralmente a pressão atmosférica é expressa em milímetros de mercúrio (mmHg), podendo ser também expressa em pascal (hPa).

2 HIPÓTESES

A hipótese básica do presente trabalho, é que ocorre influência sazonal sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial da espécie em questão, devido à síntese de constituintes distintos e/ou quantidades distintas, causada pela expressão gênica diferencial em indivíduos de uma mesma população em decorrência da adaptação a microclimas e condições ambientais locais, caracterizando fenótipos químicos. Devido a isto, os OE podem apresentar atividade biológica diferenciada.

A hipótese alternativa é que esse comportamento não ocorre, que não haja diferenças na composição química dos óleos essenciais e, em consequência, não apresentam atividade biológica diferenciada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pesquisar sobre o potencial farmacológico e atividade biológica de *Nectandra megapotamica* (Spreng) Mez., em uma população em desenvolvimento em Santa Maria-RS, em relação aos óleos essenciais.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng) Mez., obtido em folhas frescas em diferentes indivíduos e em diferentes estações do ano para avaliar a influência sazonal;
- ❖ Demonstrar a possível ocorrência de fenótipos em relação aos OE, por meio do agrupamento de amostras do óleo essencial obtido, com base na composição química das mesmas, com uso de métodos de análise multivariada;
- ❖ Realizar testes de atividade biológica, como avaliação para ação alelopática, de ação inseticida, e de atividade anestésico-sedativa em peixes, que possam apresentar respostas diferenciadas em função dos fenótipos químicos mais discrepantes;
- ❖ Obter substâncias isoladas do óleo essencial e testar sua atividade anestésico-sedativa em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*).

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1

AMARAL, L. P.; SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Aceito para publicação pelo periódico *Brazilian Archives of Biology and Technology* (BABT) em junho de 2014.

Seasonal Influence on the Essential Oil Production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez

Lúcio de Paula Amaral¹, Juliana Simoni Moraes Tondolo², Bianca Schindler³, Daniela Thomas da Silva¹, Carlos Garido Pinheiro¹, Solon Jonas Longhi¹, Carlos Augusto Mallmann⁴, Berta Maria Heinzmann^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, UFSM, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, RS, Brasil.

³ Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, UFSM, RS, Brasil.

⁴ Laboratório de Análises Micotoxicológicas, Centro de Ciências Rurais, UFSM, RS, Brasil.*
Author for correspondence: berta.heinzmann@gmail.com

Abstract

This study evaluated the seasonal influence on the yield and chemical composition of the essential oil (EO) of Nectandra megapotamica. Fresh young (YL) and old leaves (OL) obtained from three trees in each season (Nov/2010 to Sep/2011) collected in Santa Maria-RS were hydrodistilled in triplicate. The chemical composition was determined by the gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and the yield on dry basis was evaluated by two-way ANOVA (seasons, development stage). Spring (Sp) and summer (Su) showed higher average incomes (0.45 and 0.33%), which occurred when flowering, fruiting, and growth of YL and senescence of OL took place, while autumn (Au) presented the lowest yield (0.25%) during the rustification of OL. The highest yield was obtained for the YL in Sp (0.59%) and the lowest for the OL in Au (0.21%). The major constituents of the EO were independent from the season and were identified as α -pinene, bicyclogermacrene, β -pinene, germacrene D, and limonene. Seasonality and phenology influenced the production of EO probably due to morphological and metabolic alterations in the leaves as well as due to the needs of the tree, such as attraction and/or protection.

Palavras-chave: Lauraceae, phenology, variability of volatile oils, terpenes

INTRODUCTION

Approximately 390 species of the family Lauraceae Lindley are found in Brazil (Barroso 1978). *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez is important due to its wide distribution not only in Brazil, but also in other countries in South America such as Argentina, Paraguay and Uruguay (Baitello 2003). In Brazil, it can be found in the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), and Espírito Santo (ES) (Lorenzi 2002; Carvalho et al. 2006). In RS, the species is widely distributed in native forests (Tonini et al. 2003), participating in the composition of the Dense Ombrophilous Forest, Mixed Ombrophilous Forest, Seasonal Deciduous Forest and Seasonal Semideciduous Forest (Marchiori 1997).

The various biological activities described to essential oil (EO) of *N. megapotamica* and/ or its components have aroused interest of Latin American researchers working in the area of its occurrence. Among them are noteworthy the anti-inflammatory activity described by Apel et al. (2006) for EO obtained from specimens in Cananéia, SP, the anesthetic action on fat snook (*Centropomus parallelus*) obtained with EO of specimens occurring in Santa Maria, RS (Tondolo et al. 2013), the inhibition of

hemolytic activity of jararaca (*Bothrops diporus*) venom with EO obtained from plant material collected in Corrientes, Argentina (Torres et al. 2014), and the insecticidal activity against larvae of Coenagrionidae (Silva et al. 2014). All the described effects are directly influenced by the chemical composition of EO, and knowledge about the income of this extractive is fundamental to the planning and execution of further studies aiming practical applications.

Marked differences have been detected for the yield of EO in the fresh leaves of this species in different environments, ranging from 0.11 - 0.18% in São Paulo, SP (Romoff 2010) to 0.20-0.30% in Santa Maria, RS (Tondolo et al. 2013). However, Apel et al. (2006) reported a yield of 0.1% for the EO extracted from dried leaves collected from specimens occurring on the coast of São Paulo State, in Cananéia. Chemical variability has also been described, with bicyclogermacrene, α -pinene and germacrene D as major compounds in the EO obtained by Tondolo et al. (2013) in RS, while Romoff (2010) reported the highest yields of α -bisabolol and δ -elemene in the EO of leaves of this species obtained from trees in SP.

The production of secondary metabolites, which include the constituents of the EO, may be influenced by the seasonality, rainfall, circadian rhythm, ultraviolet radiation, atmospheric composition, herbivory and pathogen attack, plant age, availability of water and nutrients in the soil, temperature, and altitude (Gobbo-Neto and Lopes 2007). However, phenology and genetic or developmental stage of plant organs should also be considered (Lamien-Meda et al. 2010).

Studies related to the production of EO with seasonality have not been conducted for *Nectandra megapotamica* growing in RS until now. Additionally, knowing the ideal time to collect plant material with the aim of optimizing the production of active substances is essential in the management of natural populations of aromatic plants. Therefore, the aim of this study was to evaluate the performance of the production of EO and content of their major constituents, common to all the samples in the leaves of two stages of development from different individuals in a population over the seasons in a year.

MATERIAL AND METHODS

Extraction and characterization of the essential oil

Leaves were collected from nine adult trees of *Nectandra megapotamica*. Three of these trees were resampled at different seasons, i.e., three trees were sampled per season, resulting in 12 observations (Tables 2 and 3). This procedure was used in order to analyze the seasonal influence on the yield and major chemical compositions of the EO. The collections were conducted in Seasonal Deciduous Forest (IBGE 2012) at the base of *Morro do Elefante*, Santa Maria, RS, Brazil. The trees were located with GPS navigation, between 29° 40' 43" and 29° 40' 51" S latitude, and 53° 43' 08" and 53° 43' 16" W longitude, with altitude of 114-172 m. The climate in this region is classified as *Cfa* subtropical humid (EMBRAPA 2011), with an annual temperature average between 17.9 and 19.2°C, containing rainfall evenly distributed throughout the year, reaching 1691 mm. Soils of the class Regolithic Neosol eutrophic leptic, Charrua unit predominate onsite (Streck et al. 2008). The species was identified by Prof. Dr. Solon Jonas Longhi and a voucher specimen (SMDB in 13107) was deposited in the official Herbarium of University Federal of Santa Maria (UFSM). The collections of the leaves were individual and in triplicate for each season, held between 9:00 and 11:00 a.m. from November 2010 to September 2011. The leaves were classified into young (YL) and old (OL) according to their position and insertion on the branches, separation in nodes and internodes, color, size, texture, and particle deposition on the adaxial surface. Leaves presenting necrosis, yellowing, insect attack, signs of nutritional deficiency, among others were discarded. Further field observations were made on the phenology of the trees sampled.

Essential oils were obtained by hydrodistillation in triplicate for 3 h (European Pharmacopoeia 2007) using Clevenger type apparatus, a heater blanket and glass balloons of 5000 mL containing 500 g of fractionated fresh leaves and 3000 mL of distilled water. For each extracted sample, the moisture content of the leaves was obtained by drying the samples of plant material in an oven at 50°C until the

stabilization of the weight, determined on analytical balance. The volume of EO was determined in graduated cylinder (0.1 mL) and the mass was obtained on analytical balance aiming to calculate the dry basis yield (% w/w). Essential oils were stored in amber glass bottles at -4°C in the absence of light. The chemical composition was determined by the gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) on Agilent 6890N gas chromatograph with a 5973 mass detector. Prior to injection, samples of EO were diluted in hexane pesticide grade (1:1000). The split used was 1:100, and the ionization technique was electron impact at 70 eV. The analysis parameters were: silica capillary column HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm), volume of injection 1.0 μL , helium as carrier gas, with flow of 1.3 ml/min; injector and detector temperatures, 250 and 320°C , respectively, analysis program: 40 to 320°C at $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and delay of four minutes. The identification of the constituents was performed by comparison of the linear retention indices with literature data, and the fragmentation pattern of the mass spectra with the system database (Adams 2001; NIST 2005). For quantitative analysis, the percentage composition of the samples was calculated by area integration of the peaks in the chromatograms.

Statistical analysis

Yields were evaluated by descriptive statistics, performed in a spreadsheet (Excel $\text{\textcircled{R}}$). Analysis of variance – ANOVA was carried out on the program Assistat version 7.6 Beta on a bifactorial design (4x2): Factor 1 - seasons (spring - Sp, summer - Su, autumn - Au and winter - Wi), and Factor 2 - stage of development of the leaves (YL and OL), totalizing eight treatments with nine replications. Preceding the ANOVA, a Bartlett test was performed to check the homogeneity of variances. Since this is a native untamed species and it was possible to compare the unknown genotypes, the selective accuracy (SA) was used as a measure of experimental precision (Resende and Duarte 2007). This statistical tool replaced the coefficient of variation (CV%) and was classified as very high, high, moderate and low for $\text{SA} \geq 0.90$, ≥ 0.70 to <0.90 , ≥ 0.50 and <0.70 , and <0.50 , respectively (Cargnelutti Filho and Storck 2009). For the values of F calculated ≥ 1 , the SA was given by $\sqrt{1 - \frac{1}{F_{\text{calculated}}}}$. The major constituents common to all the samples and their respective classes were plotted for the visualization of their behavior in the seasons, using the general averages and trend curves. For these, the coefficient of determination (R^2) was calculated and when nonlinear trend was observed, the maximum technical efficiency was plotted (MTE), given by $x^+ = -\hat{b}_1 / (2\hat{b}_2)$ e $y^+ = \hat{b}_1 + 2\hat{b}_2 x^+$ (Storck et al. 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of the essential oil yields

The values of EO yields showed mean and median close to each other, but differed from the mode. This indicated the occurrence of asymmetric distributions for both the development stages of the leaves and seasons, classified as negative because the asymmetry values were less than zero (0), except for the yields of YL in Sp and OL in Au and Wi, which were symmetrical (Table 1). The flattening of the distributions resulted in platykurtic whose distributions were either flat or opened since their Kurtosis values were negative. The exception was for YL in Au and Wi, which presented leptokurtic whose distributions were acute or closed. This indicated some influence throughout the seasons in the synthesis of the EO constituents in the leaves, which were detected by the ANOVA.

Table 1. Descriptive statistics for the yield on dry bases of the EO in leaves of *Nectandra megapotamica* collected in *Morro do Elefante*, Santa Maria, RS, Brazil.

Factors	Yield on dry basis of the essential oil											
	Vmax	Vmin	Mean	SE	Mode	Median	S ²	S	CV%	K	A	ML%
Sp	0.75	0.49	0.59	0.03	Amodal	0.56	0.008	0.090	15.09	-0.56	0.73	60.39
Su	0.45	0.29	0.38	0.02	Amodal	0.38	0.003	0.058	15.33	-1.52	-0.34	50.59
Au	0.34	0.16	0.28	0.02	Amodal	0.29	0.003	0.055	19.77	2.15	-1.31	53.79
Wi	0.40	0.25	0.35	0.02	Amodal	0.37	0.002	0.048	13.82	0.91	-1.17	53.32
Sp	0.40	0.21	0.30	0.02	Amodal	0.30	0.005	0.071	23.57	-1.43	-0.15	51.68
Su	0.34	0.22	0.28	0.01	Amodal	0.28	0.002	0.044	15.53	-1.62	-0.25	48.17
Au	0.27	0.15	0.21	0.01	Amodal	0.20	0.002	0.040	18.82	-0.47	0.06	49.49
Wi	0.32	0.25	0.28	0.01	Amodal	0.28	0.001	0.029	10.06	-1.78	0.09	50.56

Legend: Sp - spring; Su - summer; Au - autumn; Wi - winter; YL - young leaves; OL - old leaves; Vmax - maximum value; Vmin - minimum value; SE - standard error; S² - variance; S - standard deviation; CV - coefficient of variation; K - kurtosis; A - asymmetry; ML% - mean moisture content of fresh leaves.

The yield on dry basis of the EO of YL and OL showed small and homogeneous variances by Bartlett's Test - χ^2 calculated (13.13) < χ^2 tabulated (14.07, $p > 0.05$; GL 71). The ANOVA showed a highly significant F test for season ($F = 39.30$ **, $p < 0.001$; GL = 3; GL Residue = 64; critical $F = 4.10$), stage of leaf development ($F = 91.10$ **, $p < 0.001$; GL = 1; GL residue = 64; critical $F = 7.05$), and also for the interaction between both the factors ($F = 17.77$ ** $p < 0.001$; GL = 3; GL residue = 64; critical $F = 4.10$). The experiment showed general mean of 0.33% (CV 16.98%), which corresponded to 0.17% yield on wet basis with medium moisture content in fresh leaves of 52.25%. The average yield (Tukey test $p > 0.05$) was statistically different for the seasons, being 0.45 (a), 0.33 (b), 0.25 (c) and 0.32% (b); with less significant difference (LSD) of 0.05 for Sp, Su, Au and Wi, respectively, as well as for the stages of the leaves, with 0.40 (a) for YL and 0.27% (b) for OL – with LSD of 0.03.

Differences were also observed for the interactions between both the factors, with averages of 0.60 (aA), 0.38 (bA), 0.28 (cA) and 0.35% (bcA) for the interaction of YL with Sp, Su, Au and Wi, and 0.30 (aB), 0.28 (abB), 0.21 (bbB) and 0.29% (aB) for the interaction of OL and seasons described above in the same order – being LSD of 0.07 to the stage of leaf development (capital letters), and 0.05 for the seasons (lowercase). The selective accuracy (SA) obtained was 0.99 for the factors 1 and 2, and 0.97 for the interaction between them, being classified as very high, despite the CV% obtained be considered medium.

The average yield of EO on wet weight (0.17%) was similar than those observed to date for this species growing in São Paulo, 0.11 - 0.18% for the samples collected in February and August 2007, respectively (Romoff 2010). The dried yield obtained in this work (Table 1) was superior than that observed by Apel et al. (2006) for trees collected in Cananéia, SP (0.10%). These discrepancies could be attributed to different populations compared and/or to biotic and abiotic factors (Gobo-Neto and Lopes 2007). Considering the yield described by Tondolo et al. (2013) obtained in Sp (November 2010) from trees belonging to the same population of Santa Maria, RS, the average did not differ from the yield observed in this work for the same season (2010/2011). In this period different phenological events occurred for the evaluated specimens, which frequently caused variability in EO observed (Lamien-Meda et al. 2010). However, the average reported by Tondolo et al. (2013) was superior to the results obtained in the work for Su, Au and Wi.

Analysis of the major chemical composition of the essential oil

Eight major constituents, common to all the samples of EO of YL and OL, were observed in each season, representing an average of 83% of the total composition (Tables 2 and 3). Constituents that were not found in all the samples of EO, the unidentified compounds, or the trace constituents have not been presented here.

Table 2. Major constituents common to all samples of EO of young leaves of *Nectandra megapotamica* collected in the four seasons of the year at *Morro do Elefante*, Santa Maria, RS, Brazil.

Constituents	LRI		Content (%)												M	
			---- Spring ----			---- Summer ----			---- Autumn ----			---- Winter ----				
	-- Exp.* --	Lit.	Tr 1	Tr 2	Tr 3	Tr 4	Tr 5	Tr 3	Tr 6	Tr 7	Tr 8	Tr 9	Tr 1	Tr 4		
α -Pinene ^M	929	935	932 ^N	33.0	44.2	22.5	20.9	31.1	33.0	34.7	18.6	11.1	14.5	20.5	17.4	25.1
Bicyclogerm. ^S	1495	1501	1500 ^A	7.9	6.0	32.3	38.5	23.8	36.5	20.9	26.3	33.3	25.8	20.2	23.3	24.6
β -Pinene ^M	971	975	974 ^N	18.3	22.1	13.0	14.6	19.6	12.1	22.3	13.4	5.9	7.3	10.0	13.8	14.4
Germ. D ^S	1479	1484	1483 ^N	4.9	2.9	11.4	12.3	10.0	9.0	5.6	12.3	10.3	8.6	10.8	11.0	9.1
Limonene ^M	1024	1028	1022 ^N	8.5	9.8	3.8	3.1	3.7	3.3	5.3	5.2	2.6	3.0	4.0	4.8	4.8
Caryophyllene ^S	1417	1421	1420 ^N	2.1	0.7	1.6	1.3	2.4	1.0	2.0	3.4	2.1	1.8	5.2	3.0	2.2
β -Mircene ^M	987	992	991 ^N	5.9	5.9	1.7	0.4	0.7	1.6	0.4	0.9	1.4	1.8	2.7	0.9	2.0
Eucalyptol ^M	1025	1029	1029 ^N	2.7	1.9	0.5	0.3	0.6	0.3	0.1	0.7	0.3	0.4	0.7	0.5	0.8
Monoterpenes				68.4	83.9	41.5	39.3	55.7	50.3	62.8	38.8	21.3	27.0	37.9	37.4	47.0
Sesquiterpenes				14.9	9.6	45.3	52.1	36.2	46.5	28.5	42.0	45.7	36.2	36.2	37.3	35.9
Total				83.3	93.5	86.8	91.4	91.9	96.8	91.3	80.8	67.0	63.2	74.1	74.7	82.9

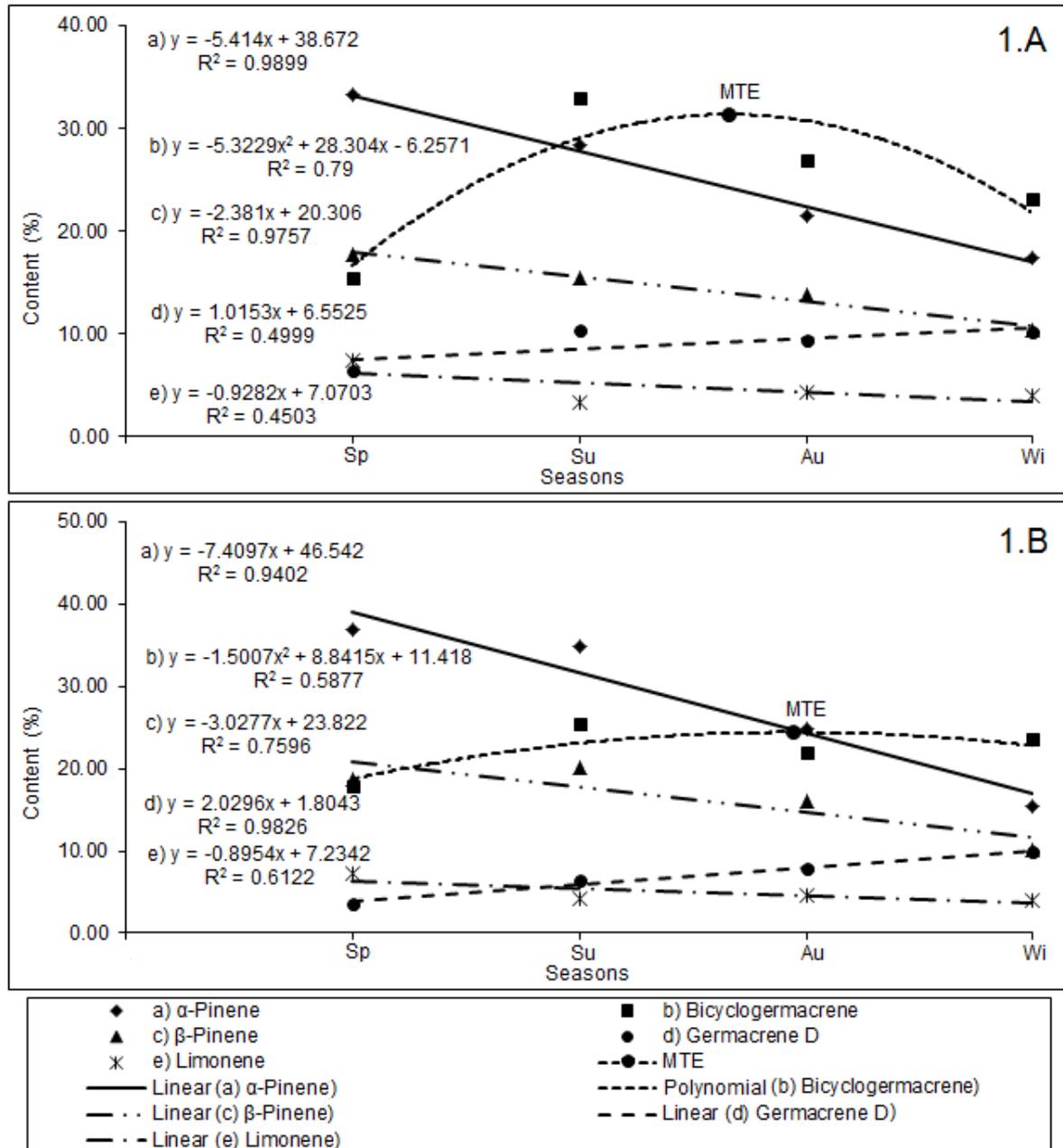
Legend: LRI – Linear Retention Index; Exp. – experimental data; * - LRI amplitude obtained for the samples; M - Average percentage of the constituents in all samples; Lit. - literature data; N - NIST (2005); A - Adams (2001); Tr – sampled Tree; Bicyclogerm. – bicyclogermacrene; Germ. D – germacrene D.

Table 3. Major constituents, common to all samples of EO of old leaves of *Nectandra megapotamica* collected in the four seasons of the year at *Morro do Elefante*, Santa Maria, RS, Brazil.

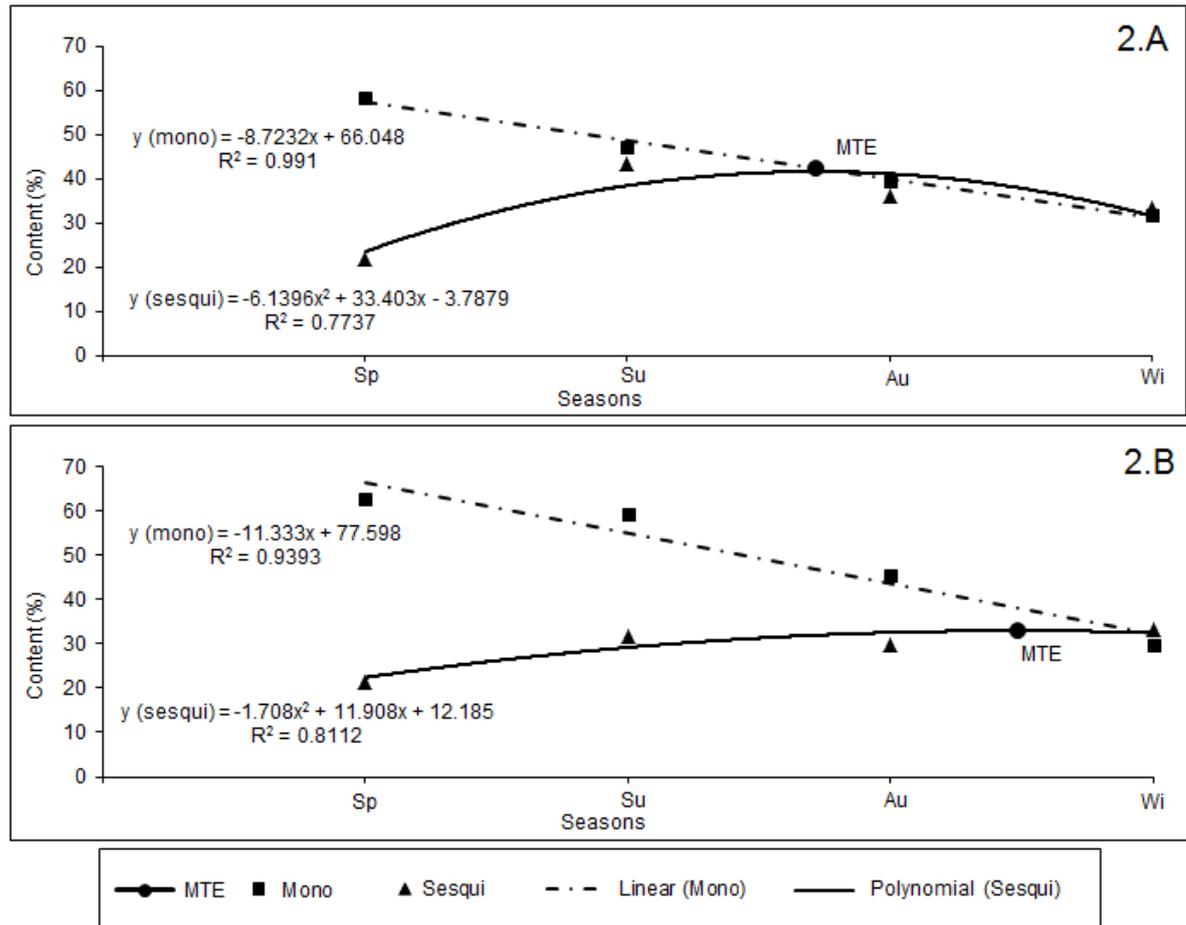
Constituents	LRI		Content (%)												M	
			---- Spring ----			---- Summer ----			---- Autumn ----			---- Winter ----				
	-- Exp.* --	Lit.	Tr 1	Tr 2	Tr 3	Tr 4	Tr 5	Tr 3	Tr 6	Tr 7	Tr 8	Tr 9	Tr 1	Tr 4		
α -Pinene ^M	929	935	932 ^N	37.8	42.4	30.4	29.3	36.2	39.1	41.6	21.5	11.5	15.1	15.6	15.8	28.0
Bicyclogerm. ^S	1495	1502	1500 ^A	5.2	7.4	41.3	21.4	23.9	31.2	15.8	24.5	26.0	24.9	20.8	25.1	22.3
β -Pinene ^M	972	975	974 ^N	20.3	23.0	13.0	20.6	24.9	15.2	26.0	15.4	6.5	7.8	9.4	13.0	16.3
Germ. D ^S	1479	1484	1483 ^N	2.6	2.9	5.1	7.6	5.7	5.8	3.3	8.8	11.4	7.2	10.9	11.3	6.9
Limonene ^M	1024	1028	1022 ^N	9.2	10.0	2.4	4.8	3.8	3.8	5.3	5.7	2.9	3.1	4.4	4.6	5.0
Caryophyllene ^S	1417	1421	1420 ^N	1.4	0.8	0.6	1.8	1.2	0.8	1.3	3.0	3.0	1.7	5.3	3.0	2.0
β -Mircene ^M	988	992	988 ^N	6.1	5.4	0.7	0.8	0.5	1.8	0.5	1.0	1.5	1.8	2.7	0.8	2.0
Eucalyptol ^M	1027	1029	1029 ^N	1.9	0.8	0.2	0.7	0.3	0.1	0.1	0.7	0.3	0.3	0.5	0.4	0.6
Monoterpenes				75.3	81.6	46.7	56.2	65.7	60.0	73.5	44.3	22.7	28.1	32.6	34.6	51.8
Sesquiterpenes				9.2	11.1	47.0	30.8	30.8	37.8	20.4	36.3	40.4	33.8	37.0	39.4	31.2
Total				84.5	92.7	93.7	87.0	96.5	97.8	93.9	80.6	63.1	61.9	69.6	74.0	83.0

Legend: LRI – Linear Retention Index; Exp. – experimental data; * - LRI amplitude obtained for the samples; M - Average percentage of the constituents in all samples; Lit. - literature data; N - NIST (2005); A - Adams (2001); Tr – sampled Tree; Bicyclogerm. – bicyclogermacrene; Germ. D – germacrene D.

A decrease in the percentage of monoterpenes, represented by α -pinene, β -pinene, and limonene was observed due to the change of the season from Sp toward Wi, while the opposite behavior was detected for the sesquiterpenes bicyclogermacrene and germacrene D in the EO of YL (Fig. 1a and 2a) and OL (Fig. 1b and 2b). The behavior of the monoterpenes was described by the linear equations, which presented high coefficients of determination (R^2) in most cases, showing the seasonal influence on the chemical composition of the EO of both YL and OL. Noteworthy was the fact that the behavior of the sesquiterpenes bicyclogermacrene and germacrene D was described by the polynomial equations, since they showed elevated percentages in Sp, reaching a peak (MTE) between Su and Au and decreased with the arrival of Wi.



Legend: Sp – spring; Su – summer; Au – autumn; Wi – winter; MET – maximum technical efficiency.
Figure 1. Seasonal variability of the major constituents of the essential oils of *Nectandra megapotamica* in young leaves-YL (1.A) and old leaves-OL (1.B) collected in Santa Maria, RS, Brazil.



Legend: Sp – spring; Su – summer; Au – autumn; Wi – winter; MTE – maximum technical efficiency; Mono – monoterpenes (except β -mircene and eucalyptol); Sesqui – sesquiterpenes (except Caryophyllene).

Figure 2. Seasonal variability of the major constituents of the essential oils of *Nectandra megapotamica* grouped into classes: monoterpenes and sesquiterpenes in young leaves- YL (2.A) and old leaves- OL (2.B) collected in Santa Maria, RS, Brazil.

The chemical composition of EO analyzed differed in relation to the works already performed with the EO of this species (Apel et al. 2006; Romoff et al. 2010). The proportion of different constituents could be related to the phenology and environmental conditions (attracting pollinators and seed dispersers, defense and protection against herbivores and microorganisms, among others). However, there were no significant differences in the chemical composition of EO in relation to seasonality. Yet, for the other genera of Lauraceae, several studies have analyzed the influence of seasonality and/or phenological stage on income and/or chemical composition of the EO. According to Marchetti et al. (2006), the best yield of EO in the leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner occurred in the reproductive phase compared to other phases of development. Li et al. (2013) observed large variations in the yield of EO of *Cinnamomum cassia* Presl., from 0.54 to 2.12%, in the leaves under different stages of development.

Leaves of rosewood, *Aniba roseodora* Duckei Kosterm, collected monthly in the Amazon Forest, Forest Reserve Ducke - INPA, Manaus-AM showed strong dependence on the yield of EO to the season, dry or wet, with lower yields in rainy season (Araujo et al. 2013). According to the authors, the water solubilized linalool, oxygenated monoterpenoid and major component, eliminating it from the EO producing cells due to rapid internal circulation of water in the tree. The other factor considered was the age of the leaves; the older the leaves, the lower the content of linalool presented. For leaves of *Aniba duckei*, also collected in the Reserve Ducke, Cunha (2011) observed higher

content of linalool (76.69/62.40%) and yield of EO (1.84/1.59%) for two samples obtained in the dry season (April and September) when the change of leaves and fruiting of the species occur, in comparison to the rainy season (November to February) when flowering takes place (60.38/56.26% linalool and 1.40/1.21% of EO). Leite et al. (2001) also observed the occurrence of high linalool content in YL of this species, 73-78%, higher values than the OL. Chantraine et al. (2009) studied the EO of *A. roseodora* in French Guiana and correlated the variation in the yield of EO to the organ of the tree, age, season, phenological stage, and geographic location. Castellani et al. (2006) found seasonal variation in the production of EO of *Ocoteia odorifera*, recommending the collection of leaves and twigs in the Sp because they had income of 0.86 and 0.83%, respectively.

The highest yield (1.13%) of EO of *Laurus nobilis* L. obtained from its dry above the ground collected in northwestern Iran was observed during the flowering, in September (Verdian-Rizi 2009). There was no significant variation in the chemical composition at different phenological stages (vegetative period, anthesis, peak flowering period and with the presence of seeds in plants), but the monoterpenes predominated at all stages evaluated, in the order of 70%. Therefore, the results of this work along with the data described in the literature indicated that the species of Lauraceae could show seasonal variation in yield and chemical composition of EO as well as suffer influence of the age of the tree or plant organ, affecting the content of different volatile constituents synthesized.

However, literature also described the occurrence of physiological varieties in the species of Laureaceae, such as in canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher), which in the cold weather of the Itajaí Valley in Santa Catarina, produced safrole as the major constituent and in the tropical climate in Rio de Janeiro produced methyleugenol and nitrophenylethane (Gotllieb 1999).

Seasonal and phenological influence

The phenological events for *N. megapotamica* are foliation, flowering, fruiting, rustification, and rest. Foliation, flowering and fruiting occur in the Sp. The buds emerge between late Au and early Wi, while in early Sp, the opening of flowers and leaf senescence take place with the formation of fruits between the end of this season and early Su (Souza and Moscheta 2000; Aliberti and Morellato 2010; Vogel et al. 2012). The fruits ripen in Su (Krügel et al. 2006), while the YL grow. In the Au, the rustification of these leaves occurs to withstand the rigors of Wi, where there is vegetative rest with differentiation of axillary buds in flower buds at the end of this season.

At the times of collection, it was observed that the events did not occur alone, and no control of the season on the phenology occurred, i.e., a given event might start at a season and extended over others, although the stimulus for the induction of the same was related to the changes in climate. There is a demand for energy obtained from the metabolism, which is stimulated by the light that overcomes the forest canopy, favored by the deciduousness of some species in the Sp. Senescence of the leaves of *N. megapotamica* in Seasonal Deciduous Forest takes place between August and December (Vogel et al. 2012). This could explain the difference in the yields of EO between YL and OL at this season, where there was probably a reallocation of resources from OL to other organs of the tree. In the Au, another factor that could have contributed to the lower yield observed was the change in the characteristics of light and solar radiation, compared to Sp and Su. According to Li et al. (1996), luminosity lower rates are associated with the reduction in the content of EO and may also influence their chemical composition. Zanon et al. (2013) analyzed the photoperiod (number of hours with natural light throughout the day) for Santa Maria-RS from August 25th, 2010 to June 16th, 2011, period that includes Sp, Su, Au and Wi. According to the authors, the photoperiod was longer in Sp (12.1-14.9 h light per day, mean 13.2 h day⁻¹) when compared to Wi (13.7-11.1 h day⁻¹, mean 12.5 h day⁻¹), which is the season where the highest and lowest mean incomes for the OE de *N. megapotamica* were observed.

In plants, terpenes act as phytoalexins, insect repellents, pheromones, plant hormones, signaling molecules, allelochemicals, agents of pollinic attraction, and defense against herbivores (Harbone 1993; Burt 2004). Between the two major classes of constituents detected in the EO analyzed, monoterpenes were smaller molecules of lower density and higher volatility, which facilitated their diffusion (Bandoni and Czepak 2008). These properties explain their role in attracting the pollinators (Oliveira et al. 2003). However, along with the sesquiterpenoids, they also help to protect the plant in

direct defense against the herbivores and indirectly in attracting the predators or parasitoids (Keeling and Bohlmann 2006; Mumm and Hilker 2006; Xiao et al. 2012). Hoskovec et al. (2005) demonstrated the high volatility of α -pinene compared to other compounds, which resulted in a high diffusion capacity in the environment. However, sesquiterpenes are larger, denser and less volatile molecules than the monoterpenes, which often have protective functions, such as the antimicrobial action of bicyclogermacrene (Cysne et al. 2005), and the fungitoxicity of germacrene D (Fach et al. 2002), among others. However, these classes of terpenic compounds may have structural and functional similarities because they have the same biosynthetic origin (mevalonate pathway in chloroplasts and via the deoxy-xylulose-5-phosphate in the cytoplasm) and are formed through the action of enzymes called terpene synthases (Taiz and Zeiger 2004; Degenhardt et al. 2009). The synthesis of monoterpenes requires fewer precursors as well as less enzymatic activity and energy in relation to sesquiterpenes. Thus, plants regulate the synthesis of terpenes in terms of their development and environment, where the space occupation during the growth may be related to greater metabolic efficiency and the need for defense and protection. These needs are initially performed by monoterpenes of higher volatility, which are widespread in the airspace surrounding the plant (Baby et al. 2010).

The relocation of resources from other plant organs for the structures on growing (YL and fruits) and/or with reproductive functions (inflorescences, flowers and seeds) is a common event during vegetative development of the plants, which occurs in Sp and Su for *N. megapotamica*. Thus, it would be reasonable to use the energy available to synthesize, for example in the leaves, monoterpenes, which require lower energy for their synthesis, and can also perform similar functions to the sesquiterpenes, such as protection and defense that would require greater energetic cost. This might have occurred in OL, which produced less sesquiterpenes and more monoterpenes compared to YL.

The switch between α -pinene and bicyclogermacrene as major compounds in the sampled trees seems not to be of genetic nature because the three individuals recollected in different seasons showed similar variation to that observed in the EO for the other individuals sampled, indicating a physiological variability. However, the analysis of genetic variability of the sampled trees was not performed. Thus *N. megapotamica* could be classified in the group of aromatic species that presented large genetic variability and physiological activities. These individuals may be responding differently to the prevailing environmental conditions, with qualitative and quantitative alterations in secondary metabolites, which hinders to obtain a standardized composition (Passinho-Soares et al. 2006). A similar event occurs in the population of *C. mandiocanna* in the Atlantic Forest, which in the southern coastal region of São Paulo shows predominance of germacrene D and bicyclogermacrene in its EO. However, there is a predominance of the synthesis of germacrene D also in the northern growing population. According to Telascrea et al. (2007), this is due to the pressure of environmental and/or ecological selection, characterizing a chemical adjustment to the prevailing environmental conditions.

CONCLUSION

Young leaves produced more essential oil (0.40%) compared to OL (0.27%). Both were more productive in Sp (0.59 and 0.30%), recommended season to collect plant material. Monoterpenes were most abundant in Sp and Su (56.87%) during the growth and reproduction, whereas sesquiterpenes showed higher concentrations in Su, Au and Wi (34.66%), i.e., during the growth of YL, rustification and rest. The largest discrepancies between mono and sesquiterpenes were observed in OL. The observed variability could possibly be related to the adaptation of individuals to environmental conditions as well as to the needs of the plant.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the CAPES and PPGEF-UFSM for the PhD scholarship granted to the first author, and FIPE/UFSM and PIBITI/CNPq for scientific initiation scholarship awarded to graduate student in Forest Engineering at UFSM.

REFERENCES

- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry. Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 2001; 455 p.
- Aliberti LF, Morellato LPC. Variation on fruit production of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) trees on the edge and interior of a semideciduous forest – a case study. *Naturalia*. 2010; 33: 57-68.
- Apel MA, Lima MEL, Souza A, Cordeiro I, Young MCM, Sobral MEG, et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). *Pharmacologyonline*. 2006; 3: 376-383.
- Araujo VC, Corrêa GC, Maia JGS, Silva ML, Gottlieb OR, Marx MC, et al. Óleos essenciais da Amazônia contendo Linalol. *Acta Amazonica* [Internet]. 1971 [cited 2013 Aug. 05]; 1(3): 45-47. Available from: <http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/1-3/PDF/v1n3a07>.
- Baby S, Raj G, Thaha ARM, Dan M. Volatile chemistry of a plant: mono-sesquiterpenoid pattern in the growth cycle of *Curcuma harita*. *Flavour Fragr J*. 2010; 25(1): 35-40.
- Baitello JB, Hernández FGJ, Moraes PLR, Esteves R, Marcovino JR. Lauraceae. In: Wanderlei MGL, Shepherd GJ, Giulietti AM, Melhem TS, editors. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. 3rd ed. São Paulo: Editora Rima; 2003. p. 149-223.
- Bandoni AL, Czepak MP. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes. 2008; 623 p.
- Barroso GM, Guimarães EF, Ichaso CLF, Costa CG, Peixoto AL. Sistemática de angiospermas do Brasil. 1nd ed. Rio de Janeiro: LTC/EDUSP. 1978; 255 p.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol*. 2004; 94(3): 223-253.
- Cargnelutti Filho A, Storck L. Medidas do grau de precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de milho. *Pesq Agropec Bras*. 2009; 44(2): 111-117.
- Carvalho PER. Espécies florestais brasileiras. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras. Brasília: EMBRAPA INFORMAÇÕES TECNOLÓGICAS/EMBRAPA FLORESTAS. 2006; 2: 627 p.
- Castellani DC, Casali VWD, Souza AL, Cecon PR, Cardoso CA, Marques VB. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. *Rev Bras Pl Med* 2006; 8(4): 104-107.
- Chantraine JM, Dhénin JM, Moretti C. Chemical variability of Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) essential oil in French Guiana. *J Essent Oil Res*. 2009; 21(6): 486-495.
- Cunha LN. Influência sazonal no teor de linalol do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans cultivada em ambiente natural na reserva florestal Duke. *Ciência e Natura*. 2011; 33(1): 7-15.
- Cysne JB, Canuto KM, Pessoa ODL, Nunes EP, Silveira ER. Leaf essential oil of four *Piper* species from the State of Ceará – Northeast of Brazil. *J Braz Chem Soc*. 2005; 16(6b): 1378-1381.
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochem*. 2009; 70: 1621-1637.
- EMBRAPA. Atlas climático da região sul do Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado/Colombo: Embrapa Florestas. 2011; 333 p.
- European Pharmacopoeia. European directorate for the quality of medicine. 6nd ed. Strassbourger: EDQM Publications; 2007.
- Fach A, Gregel B, Simionatto E, da Silva UF, Zanatta N, Morel AF, et al. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. *Planta Med*. 2002; 68(9): 836-839.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. Planta medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova*. 2007; 30(2): 374-381.
- Gottlieb OR. O reorganizador da natureza. *Revista Pesquisas Fapesp*. 1999; 43: 10-11.
- Harbone JB. Ecological biochemistry. 4nd ed. London: Academic Press. 1993; 318 p.
- Hoskovec M, Grygarová D, Cvačka J, Streinz L, Zima J, Verevkin SP, et al. Determining the vapour pressures of plant volatiles from gas chromatographic retention data. *J Chromatogr A*. 2005; 1083: 161-172.
- IBGE. Manual técnico da vegetação brasileira. 2nd ed. Rio de Janeiro: IBGE. 2012; 274 p.
- Keeling CI, Bohlmann J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol*. 2006; 170(4): 657-675.
- Krügel MM, Burger MI, Alves MA. Frugivoria por aves em *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) em um área de Floresta Estacional Decidual no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Ser Zool*. 2006; 96(1): 17-24.
- Lamien-Meda A, Schmiderer C, Lohwasser U, Börner A, Franz C, Novak J. Variability of the essential oil composition in the sage collection of the Genebank Gatersleben: a new viridiflorol chemotype. *Flavour Fragr J*. 2010; 25(2): 75-82.
- Leite AMC, Quiser RC, Sampaio PTB. Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) Lauraceae: informações sobre o sistema de plantio e o manejo sustentável da espécie. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 2001; 20 p.

- Li Y, Craker LE, Potter T. Effect of light level on essential oil production on sage (*salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). *Acta Hort.* 1996; (ISHS) 426: 419-426.
- Li YQ, Kong DX, Huang RS, Liang HL, Xu CG, Wu H. Variation in essential oil yields and compositions of *Cinnamomum cassia* leaves at different developmental stages. *Ind Crop Prod.* 2013; 47: 92-101.
- Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4th ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2002; 368 p.
- Marchetti CN, Telascrea AG, Tininis AG, Cavalheiro AJ. Dinâmica circadiana e sazonal dos principais componentes do óleo essencial de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). *Rev Bras Pl Med.* 2006; 8: 23-26.
- Marchiori JNC. Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacourtiáceas. Santa Maria: UFSM. 1997; 271 p.
- Mumm R, Hilker M. Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends Plant Sci.* 2006; 11(7): 351-358.
- National Institute of Standards and Technology, NIST. NIST/EPA/NIH mass spectral library & search/analysis programs NIST 02 update. Hoboken, USA: John Wiley & Sons; 2005.
- Oliveira RB, Godoy SAP, Costa FB. Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes. Ribeirão Preto: Editora Holos. 2003; 64 p.
- Passinho-Soares H, Felix D, Kaplan MA, Margis-Pinheiro M, Margis R. Authentication of medicinal plant botanical identity by amplified fragmented length polymorphism dominant DNA marker: inferences from the *Plectranthus* genus. *Planta Med.* 2006; 72(10): 929-931.
- Resende MDV, Duarte JB. Precisão e controle da qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. *Pesq Agropec Trop.* 2007; 37(3): 182-194.
- Romoff P, Ferreira MJP, Padilha R, Toyama DO, Fávero OA, Lago JHG. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). *Quim Nova.* 2010; 33 (5): 1119-1121.
- Silva DT, Silva LL, Amaral LP, Pinheiro CG, Pires MM, Schindler B, et al. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. *J Econ Entomol.* 2014; 107(4): 1713-1720.
- Souza LA, Moscheta IS. Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). *Acta Bot Bras* 2000; 14(1): 15-25.
- Streck EV, Kämpf N, Dalmolin RSD, Klant E, Nascimento PC, Schneider P, et al. Solos do Rio Grande do Sul. 2nd ed. Porto Alegre: EMATER/RS. 2008; 222 p.
- Storck L, Lopes SJ, Garcia DC, Estefanel V. Experimentação vegetal. 3rd ed. Santa Maria: Editora da UFSM. 2011; 198 p.
- Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal. 3rd ed. Santarém ER et al., translators. Porto Alegre: Artimed. 2004; 719 p.
- Telascrea M, Araújo CC, Marques MOM, Facanali R, Moraes PLR, Cavalheiro AJ. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. *Biochem Syst Ecol.* 2007; 35: 222-232.
- Tondolo JSM, Amaral LP, Simões LN, Garlet QI, Schindler B, Oliveira TM, et al. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotrop Ichthyol.* 2014; 11(3): 667-674.
- Tonini H, Finger CAG, Scheneider PR. O crescimento da *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez em floresta nativa na Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul. *Ciênc Rural.* 2003; 33(1): 85-90.
- Torres AM, Camargo FJ, Ricciardi GA, Ricciardi AIA, Dellacassa, E. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez: Phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. *J Essent Oil Res.* 2014; 26(3): 197-203.
- Verdian-Rizi M. Variation in the essential oil composition of *Laurus nobilis* L. of different growth stages cultivated in Iran. *J Basic Appl Sci.* 2009; 5(1): 33-36.
- Vogel HLM, Schumacher MV, Trüby P. Deposição de serapilheira e nutrientes por espécies nativas em uma Floresta Estacional Decidual em Itaara, RS, Brasil. *Floresta.* 2012; 42(1): 129-136.
- Xiao Y, Wang Q, Erb M, Turlings TCJ, Ge L, Hu L, et al. Specific herbivore-induced volatiles defend plants and determine insect community composition in the field. *Ecol Lett.* 2012; 15(10): 1130-1139.
- Zanon AJ, Streck NA, Kräulich B, da Silva MR, Bisognin DA. Desenvolvimento de plantas e produtividade de tubérculos de batata em clima subtropical. *Rev Ciênc Agron.* 2013; 44(4): 858-868.

4.2 Artigo 2

AMARAL, L. P.; SCHINDLER, B.; BIANCHINI, N. H.; LONGHI, S. J.; ALMEIDA, C. A. A.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). Aceito para publicação pelo periódico *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* (BLACPMA) em abril de 2014.

Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)

Variability of chemical composition of essential oil from *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)

Lúcio de Paula AMARAL¹, Bianca SCHINDLER², Nadia Helena BIANCHINI², Solon Jonas LONGHI¹, Carlos Alberto Araújo de ALMEIDA³, Carlos Augusto MALLMANN³ & Berta Maria HEINZMANN^{1,4*}

¹ Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, CCR/UFSM, Av. Roraima, 1000 – Prédio 44, Sala 5255, CEP 97.105-900, Santa Maria, RS, Brasil;

² Graduação em Engenharia Florestal, CCR/UFSM, Av. Roraima, 1000 – Prédio 44, CEP 97.105-900, Santa Maria, RS, Brasil;

³ Laboratório de Análises Micotoxicológicas, CCR/UFSM, Av. Roraima, 1000 – Prédio 44, CEP 97.105-900, Santa Maria, RS, Brasil;

⁴ Programa de Pós-graduação em Farmacologia, CCS/UFSM, Av. Roraima, 1000 – Prédio 21, CEP 97.105-900, Santa Maria, RS, Brasil;

* autora para correspondência: berta.heinzmann@gmail.com

Resumen

Este trabajo describe la variabilidad química del aceite esencial (AE) de *N. megapotamica*, utilizando análisis multivariado. Se colectaron hojas de tres individuos en una población en Santa Maria, Brasil, en cada estación durante un año y se clasificaron en hojas jóvenes y viejas. Los AE se obtuvieron por hidrodestilación y la composición química fue determinada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico para formación de grupos químicos (GQ) y análisis de componentes principales (ACP) para verificar cuáles constituyentes influenciaron la formación de grupos. Inicialmente se observaron dos agrupamientos en el dendrograma debido a concentraciones de α -pineno y biciclogermacreno, constituyentes mayoritarios. En el segundo corte se discriminaron cinco GQ, siendo este también el número de componentes principales con valores propios superiores a 1. Los isómeros de asarona se observaron solamente en el AE de dos individuos (GQ5), constituyendo los principales elementos de diferenciación.

Palabras clave: variabilidad poblacional, análisis multivariado, terpenoides, fenilpropanoides, *Nectandra megapotamica*.

Abstract

This work describes the chemical variability of the essential oils (EO) of *N. megapotamica* using multivariate analysis. Leaves of three individuals of a population in Santa Maria-RS were collected per season for a year, and classified into young and old. The EO were obtained by hydrodistillation and the chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). Cluster analysis (HCA) were performed for formation of chemical groups (CG), and principal component analysis was done (PCA) to determine which constituents influenced the formation of groups. Initially, two clusters were observed in the dendrogram, due to the concentration of α -pinene and bicyclogermacrene, major constituents of the EO. The second section showed five different CG, which is also the number of principal components with eigenvalues greater than 1. The occurrence of isomers of asarone was observed only in EO of two individuals (CG5), containing the main elements of differentiation.

Keywords: population variability, multivariate analysis, terpenoids, phenylpropanoids, *Nectandra megapotamica*.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) constituyen un producto no maderero importante para la generación de renta, y pueden contribuir con la conservación de bosques por medio del manejo y uso sostenible. Varias especies arbóreas nativas de América del Sur poseen potencial para la producción de AE, destacándose representantes de las familias Asteraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Piperaceae, Rutaceae y Verbenaceae, entre otras. La familia Lauraceae posee 50 géneros y entre 2500 a 3000 especies, con representación dominante en América y Asia, con informes también en Australia, Madagascar y de forma más dispersa en África Central (Rohwer y Kubitzki, 1993). Sólo en Brasil, esta familia está representada por 19 géneros y cerca de 390 especies (Ceolin *et al.*, 2009), con los géneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea* y *Licaria* que tienen el mayor número de especies aromáticas (Marques, 2001). El género *Nectandra* Rol. ex Rottb posee 43 especies brasileras, con una gran diversidad en los bosques Amazónico y Atlántico (Baitello *et al.*, 2003).

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez, ilustra el comportamiento de gran parte de las especies de esta familia en lo que se refiere a su distribución en América del Sur, las cuales se conocen en Argentina, Paraguay, Uruguay, en las regiones sur, sureste y centro-oeste de Brasil (Lorenzi, 2002; Baitello *et al.*, 2003; Grela y Brussa, 2003; Carvalho, 2006; Zanon *et al.*, 2009). Esta especie se destaca por ser una de las más frecuentes y características de los bosques de la ladera meridional de la Serra Geral en Rio Grande do Sul (Machado y Longhi, 1993; Farias *et al.*, 1994). Su nombre genérico, *Nectandra*, proviene del griego néctar (néctar) y anér (hombre) y el epíteto específico *megapotamica* se deriva del griego méga (grande) y potamós (río), en referencia al estado Rio Grande do Sul (Pedralli, 1986). En tupí-guaraní es conocida como *caá-ema* que significa “árbol de olor” (Longhi, 1995).

En la medicina popular, las hojas de *N. megapotamica* se utilizan en el tratamiento de tos, gripe y como calmante (Alves *et al.*, 2008). La cáscara de esta especie se usa como analgésica y antiinflamatoria (Silva Filho *et al.*, 2004) y en abscesos (Alves *et al.*, 2008). Las raíces poseen propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Mello *et al.*, 2005). Para algunas preparaciones a base de esta especie, se comprobaron diferentes actividades biológicas, como inhibición de las actividades hemolíticas, coagulantes y proteolíticas del veneno de *Bothrops diporus* (Torres *et al.*, 2014), efecto anestésico en *Centropomus parallelus* (Tondolo *et al.*, 2013), actividades antifúngica y antimicrobiana (Brito, 2009), antiinflamatoria y antitumoral (Apel *et al.*, 2006).

La especie presenta una serie de metabolitos secundarios bioactivos descritos en la literatura, como neolignan hexahidrobenzofuránicos y tetrahidrofuránicos obtenidos de extracto etanólico de hojas, para las cuales fue detectada una acción antagónica del FAP (factor de agregación plaquetaria) y presentaron actividad contra *Trypanosma cruzi* (de Luca *et al.*, 2004). Algunos lignanos tetrahidrofuránicos demostraron actividad leishmanicida, tales como machilina G y veraguensina, y actividad antimalárica contra *Plasmodium falciparum*, a ejemplo de la calopeptina. Adicionalmente, estos lignanos no presentaron citotoxicidad para células de mamíferos (da Silva Filho *et al.*, 2008). Hay relatos también de la ocurrencia de alcaloides para *Nectandra saligna* Nees, sinonimia botánica de *N. megapotamica* (Lorenzi, 2002), tales como la ocoteína (Baralle *et al.*, 1972). La presencia de fenilpropanoides en la especie fue descrita por Garcez *et al.* (2009), que obtuvieron cuatro constituyentes en extracto etanólico de las cáscaras del tronco, elemicina, isoelemicina, (\pm)-eritro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol e (\pm)-treo-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol, y relataron actividad antifúngica *in vitro* de los mismos. En la naturaleza *N. megapotamica* desempeña importantes funciones ecológicas, entre ellas se destaca el proveer de alimento a animales frugívoros como aves (Krügel *et al.*, 2006).

Estudios sobre la composición química de los AE de diferentes especies vegetales mencionan una gran variabilidad ocasionada por factores endógenos y exógenos (Barra, 2009). Datos con estas características se pueden analizar a través del análisis multivariado (Mardia *et al.*, 1994; Telascrea *et al.*, 2007; Subki *et al.*, 2013). El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad de la composición química del AE de hojas de *N. megapotamica* de acuerdo al siguiente diseño experimental: dos fases de desarrollo, clasificadas como jóvenes y viejas, recolectadas en diferentes individuos (tres por estación), en un período de un año (cuatro estaciones), en una población de un fragmento forestal en Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, por medio de análisis multivariado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de recolección y material vegetal

Se recolectaron hojas de nueve árboles adultos de *N. megapotamica* en el Bosque Estacional Deciduo (*Floresta Estacional Decidual – FED*) (IBGE, 2012), en la base del Morro do Elefante, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Con el objetivo de verificar si había variabilidad estacional en la composición química del AE, las hojas de estos árboles fueron recolectadas en cuatro estaciones del año (primavera, verano, otoño y invierno), con un total de 12 recolectas realizadas. Para conformar el total de recolectas los árboles 1, 3 y 4 se utilizaron dos veces en diferentes estaciones (tablas 1 y 2). Los árboles fueron localizados utilizando un GPS de navegación, entre 29° 40' 43" y 29° 40' 51" latitud sur y entre 53° 43' 08" y 53° 43' 16" longitud oeste, con altitud entre 114 y 172 m. El clima es del tipo *Cfa*, subtropical húmedo (EMBRAPA, 2011), con temperatura media anual entre 17,9 y 19,2 °C, precipitación distribuida regularmente durante el año, alcanzando 1691 mm. En la localidad predominan asociaciones de suelos de la unidad *Charrua: Neossolos Regolíticos Eutróficos lépticos* con suelos de la unidad *Ciriaco* degradada, *Cambissolos Háplicos Eutróficos* típicos y *Luvissolos Háplicos* típicos (Streck *et al.*, 2008).

La especie fue identificada por el Prof. Dr. Solon Jonas Longhi, y un ejemplar o exsiccata fue depositada (SMDB número 13107) en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidade Federal de Santa Maria. Las recolectas fueron individuales y la extracción fue en triplicado para cada uno de los tres árboles muestreados durante las cuatro estaciones evaluadas, realizadas entre las 9 y 11 horas de la mañana, en el período de noviembre/2010 a septiembre/2011. Las hojas fueron clasificadas en hojas jóvenes (HJ) y viejas (HV) de acuerdo con su posición e inserción en las ramas, nudos y separación entre nudos, color, tamaño, textura y deposición de partículas en la superficie adaxial, siendo descartadas las que presentaron necrosis, color amarillento, ataque de insectos, señales de deficiencia nutricional, entre otros problemas.

Obtención del AE y análisis de la composición química

Los AE se obtuvieron por hidrodestilación durante tres horas, en triplicado, de acuerdo con la metodología descrita por Sartor (2009), en un sistema tipo Clevenger, con manta de calentamiento y balones de vidrio de 5000 mL, con 500 g de hojas frescas fraccionadas y tres litros de agua destilada. Los AE se almacenaron en frascos de vidrio ámbar, a -4°C en ausencia de luz.

La composición química se obtuvo por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM), en cromatógrafo Agilent 6890N y detector de masas 5973. Previo a la inyección de las muestras, los AE se diluyeron en n-hexano para cromatografía gaseosa SupraSolv® - Merck (1:1000). Se utilizó la relación de división (Split) de 1:100 y como método de ionización el de impacto electrónico a 70 eV. Los parámetros de los análisis fueron: columna capilar de sílice fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); volumen de inyección 1,0 µL; gas portador Helio, a 1,3 mL min⁻¹; temperaturas del inyector y detector, 250° y 320°C, respectivamente, con programación desde 40 hasta 320°C, a una rata de calentamiento de 4°C min⁻¹, y tiempo de espera de 4 minutos. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250°C. Para la identificación de los componentes se consideraron dos parámetros: las diez primeras sustancias sugeridas por el banco de datos con modelo de fragmentación del espectro de masas semejante al del componente en análisis (NIST Mass Spectral Search Program, versión 2.0), y también por comparación de los Índices de Kovats (IK) con el banco de datos del equipo (NIST, 2002) y datos de la literatura (ADAMS, 2001). Para el análisis cuantitativo, la composición porcentual de las muestras se calculó por la integración del área de las señales de los cromatogramas obtenidos.

Análisis multivariado

Para la definición de los grupos químicos con los datos de la composición de los AE, se utilizaron técnicas multivariadas: análisis de agrupamiento jerárquico (AAJ), con la distancia euclidiana como medida de similitud, con dendrograma horizontal obtenido por el método Ward, y análisis de componentes principales (ACP), para verificar cuáles variables (constituyentes) influenciaron la formación de los grupos (Lattin *et al.*, 2011; Ferreira, 2008; Mardia *et al.*, 1994). Para efecto de

análisis, cada muestra de AE fue considerada como un “caso” y cada constituyente como una “variable descriptora”. Los análisis fueron realizados utilizando el programa Statistica 7[®].

RESULTADOS

En las doce muestras analizadas en el AE de las hojas jóvenes (HJ) se observaron 67 constituyentes y en las hojas viejas (HV) su número alcanzó a 79 componentes (Tablas N° 1 y 2).

Tabla N° 1
Composición química de los AE de HJ de *Nectandra megapotamica* colectadas en Santa Maria-RS

Constituyentes	Valores (%)														M			
	Estaciones			--- Primavera ---				---- Verano ----				--- Otoño ---				--- Invierno ---		
	Recolectas			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12		
	-- IK Exp. --	IK Lit.		Ar1	Ar2	Ar3	Ar4	Ar5	Ar3	Ar6	Ar7	Ar8	Ar9	Ar1		Ar4		
α -Pinoeno ^{HM}	929	935	932 ^N	33,0	44,2	22,5	20,9	31,1	33,0	34,7	18,6	11,1	14,5	20,5	17,4	25,1		
Canfeno ^{HM}	942	946	943 ^N	1,1	1,5		0,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,5	0,7	0,6	0,6		
NI1	960						0,1									0,1		
β -Pinoeno ^{HM}	971	975	974 ^N	18,3	22,1	13,0	14,6	19,6	12,1	22,3	13,4	5,9	7,3	10,0	13,8	14,4		
β -Mirceno ^{HM}	987	992	991 ^N	5,9	5,9	1,7	0,4	0,7	1,6	0,4	0,9	1,4	1,8	2,7	0,9	2,0		
Limoneno ^{HM}	1024	1028	1022 ^N	8,5	9,8	3,8	3,1	3,7	3,3	5,3	5,2	2,6	3,0	4,0	4,8	4,8		
Eucaliptol ^{MO}	1025	1029	1029 ^N	2,7	1,9	0,5	0,3	0,6	0,3	0,1	0,7	0,3	0,4	0,7	0,5	0,7		
β -E-Ocimeno ^{HM}	1036	1039	1040 ^N	1,0			0,2	0,2			0,4	0,2	0,3	0,5	0,5	0,4		
β -Z-Ocimeno ^{HM}	1045	1050	1047 ^N	6,4	0,3		1,1	1,0		0,3	2,6	1,5	2,1	3,0	2,6	2,1		
τ -Terpineno ^{HM}	1057		1058 ^N		0,2											0,2		
Terpinoleno ^{HM}	1084	1087	1085 ^N	0,6	0,6		0,1	0,3	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3		
β -Linalol ^{MO}	1098	1100	1099 ^N		3,1		0,1	0,3	0,8						0,3	0,9		
Terpineol ^{HM}	1175	1177	1176 ^N		0,3									0,1	0,1	0,2		
α -Terpineol ^{MO}	1188	1191	1190 ^N		0,2										0,1	0,2		
NI2	1328				0,1											0,1		
δ -Elemeno ^{HS}	1335	1338	1337 ^N	0,4	0,2	2,4	0,3	0,7	0,4	0,3	0,9	1,0	0,8	0,5	0,9	0,7		
α -Cubebeno ^{HS}	1349	1350	1345 ^N								0,2	0,1	0,1	0,1		0,1		
Ciclosativeno ^{HS}	1364	1365	1371 ^A								0,1			0,1		0,1		
Copaeno ^{HS}	1374	1377	1376 ^N	1,5			0,1	0,7		1,6	2,3	2,1	2,4	3,2	0,3	1,6		
β -Bourboneno ^{HS}	1384	1385	1384 ^N								0,2	0,4	0,3	0,1	0,2	0,3		
β -Cubebeno ^{HS}	1388	1392	1391 ^N	0,3				0,3		0,3	0,8	1,0	1,0	0,8		0,7		
β -Elemeno ^{HS}	1390	1393	1392 ^N	0,5			0,3	0,4	0,2	0,2	0,6	0,4	0,4	0,5	0,9	0,4		
NI3	1410						0,1									0,1		
Metil eugenol ^F	1404		1404 ^A												0,3	0,3		

Tabla 1 continúa en la próxima página

Constituyentes	Valores (%)														M	
	Estaciones		--- Primavera ---			---- Verano ----			---- Otoño ----			--- Invierno ---				
	Recolectas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
	-- IK Exp. --	IK Lit.	Ar1	Ar2	Ar3	Ar4	Ar5	Ar3	Ar6	Ar7	Ar8	Ar9	Ar1	Ar4		
α -Gurjuneno ^{HS}	1408	1409 ^N												0,3	0,3	
Cariofileno ^{SO}	1417	1421	1420 ^N	2,1	0,7	1,6	1,3	2,4	1,0	2,0	3,4	2,1	1,8	5,2	3,0	2,2
β -Copaeno ^{HS}	1428	1430	1432 ^A								0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
τ -Elemeno ^{HS}	1433	1439	1434 ^N								0,2	0,3			0,2	0,2
Alo-Aromadendreno ^{HS}	1436	1440	1434 ^N					0,2		0,1	0,3		0,3	0,3	0,3	0,2
α -Cariofileno ^{SO}	1451	1456	1454 ^N	1,1			0,2	0,4		2,1	1,4	1,6	1,6	2,9	0,6	1,3
α -Amorfenol ^{HS}	1478		1475 ^N					0,1								0,1
β -Farneseno ^{HS}	1459		1459 ^N			2,5										2,5
Aromadendreno ^{HS}	1459	1463	1463 ^N	0,2		3,3	0,2				0,2	0,2	0,2	0,7	0,5	0,7
Germacreno D ^{HS}	1479	1484	1483 ^N	4,9	2,9	11,4	12,3	10,0	9,0	5,6	12,3	10,3	8,6	10,8	11,0	9,1
α -Selineno ^{HS}	1488	1489	1488 ^N	1,1										2,2		1,6
Biciclogermacreno ^{HS}	1495	1501	1500 ^A	7,9	6,0	32,3	38,5	23,8	36,5	20,9	26,3	33,3	25,8	20,2	23,3	24,6
β -Bisaboleno ^{HS}	1504	1512	1506 ^A			3,4		0,1			0,5	0,4	0,4		0,5	0,9
NI4	1507	1507					0,2							0,6		0,4
NI5	1516							0,2								0,2
τ -Cadineno ^{HS}	1512		1513 ^N												0,3	0,3
δ -Amorfenol ^{HS}	1515	1515	1512 ^A								0,3	0,3				0,3
Cubebol ^{HS}	1515	1516	1515 ^A										0,3	0,3		0,3
δ -Cadineno ^{HS}	1521	1528	1526 ^N	1,7			0,3	0,5	0,2	2,7	1,9	2,1	2,1	4,1	1,0	1,6
<i>E</i> -Cadina-1,4-dieno ^{HS}	1533	1534	1535 ^A									0,1	0,1	0,1		0,1
<i>E</i> - γ -Bisaboleno ^{HS}	1539		1535 ^A			1,7										1,7
Silfiperfol-5-en-3-ol A ^{SO}	1558	1560	1560 ^A	0,2							0,7			0,4		0,5
Elemicina ^F	1559		1558 ^N												7,5	7,5
<i>E</i> -Nerolidol ^{SO}	1564	1573	1563 ^A	0,5			0,5	0,6			0,4	2,9	3,0	1,3	2,3	1,4
<i>E</i> -Isoelemicina ^{SO}	1566	1567	1570 ^A				3,7	0,1								1,9
Longicanfenoleno ^{SO}	1567	1568	1564 ^A									0,1	0,1		0,2	0,1
Espatuleno ^{SO}	1576	1580	1579 ^N						0,4	0,2	1,5	0,9	1,1	0,7	0,8	0,8
Isovalerato de nerilo ^{SO}	1578		1584 ^A					0,1								0,1
NI6	1589							0,2								0,2
Globulol ^{SO}	1582	1597	1585 ^N	0,2			0,2	0,3	0,3	0,2	0,8	0,9	0,7	0,6	0,9	0,5
Viridiflorol ^{SO}	1590	1605	1595 ^N	0,2			0,2	0,4	0,2	0,2	0,6	0,7	0,5	0,3	0,6	0,4
NI7 #	1602	1602										0,3	0,7			0,5
NI8	1602	1605								0,2	0,3	0,3		0,3	0,5	0,3
NI9	1612	1615				0,1	0,2							0,1		0,1
<i>Z</i> -Asarona ^F	1624	1624	1617 ^A									1,0	0,9			1,0
1-Epi-Cubenol ^{SO}	1630	1631	1629 ^A								0,2	0,2	0,1	0,2		0,2
τ -Muurolol ^{SO}	1644	1651	1643 ^N			0,1	0,2				0,4	0,3	0,3	0,3		0,3

Tabla 1 continúa en la próxima página

Constituyentes	Valores (%)														M
	Estaciones		--- Primavera ---				---- Verano ----				---- Otoño ----				
	Recolectas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	-- IK Exp. --	IK Lit.	Ar1	Ar2	Ar3	Ar4	Ar5	Ar3	Ar6	Ar7	Ar8	Ar9	Ar1	Ar4	
τ -Cadinol ^{SO}	1642	1642 ^N												0,5	0,5
δ -Cadinol ^{SO}	1648	1646 ^N								0,1					0,1
α -Cadinol ^{SO}	1655	1663	1657 ^N			0,2	0,2	0,2		0,5			0,5	1,0	0,4
NI10 @	1657	1657									9,1	11,9			10,5
<i>E</i> -Asarona ^F	1684	1684	1676 ^A								3,1	3,1			3,1
NI11	1691	1693									1,0	1,1		0,2	0,8
Total identificado			100	99,9	100	99,4	99,4	100	99,8	99,7	89,3	86,3	99,0	99,3	97,7
Número de Picos			24	17	12	29	31	18	22	38	39	37	39	39	
Hidrocarburos Monoterpénicos (HM)			74,7	84,6	40,9	40,5	57,0	50,6	63,4	41,8	23,3	29,8	41,6	40,9	49,1
Monoterpenos Oxigenados (MO)			2,7	5,4	0,5	0,4	0,9	1,1	0,1	0,7	0,3	0,4	0,8	1,0	1,2
Hidrocarburos Sesquiterpénicos (HS)			18,4	9,1	57,0	52,1	36,8	46,3	31,7	47,1	52,1	42,9	44,3	39,8	39,8
Sesquiterpenos Oxigenados (SO)			4,2	0,7	1,6	2,8	4,7	2,1	4,6	10,1	9,6	9,2	12,3	9,8	6,0
Fenilpropanoides (F)			0,0	0,0	0,0	3,7	0,1	0,0	0,0	0,0	13,4	16,7	0,0	7,8	3,5
No Identificados (NI)			0,0	0,1	0,0	0,6	0,4	0,0	0,2	0,3	1,3	1,1	1,0	0,7	0,5
Total			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

Leyenda: IK Exp.*- Amplitud del Índice de Kovats experimental para 12 observaciones; IK Lit. - Índice de Kovats de la literatura; Ar - árboles recolectadas; M - media; # - Fenilpropanoide con perfil de fragmentación semejante al de *Z*-asarona; @ - Fenilpropanoide con perfil de fragmentación semejante al de *E*-asarona; N - NIST, 2002; A - ADAMS, 2001.

El AE de hojas en las dos fases de desarrollo presentó como constituyente mayoritario el α -pineno, con porcentajes medios de 25,1 y 28,0% para HJ y HV, respectivamente, seguido de biciclogermacreno (24,6 y 22,2%), β -pineno (14,3 y 16,2%) y de los derivados de la asarona, codificados como NI10 @ y NI15 @ (10,5 y 10,7%). También se encontró germacreno D, elemicina y limoneno en cantidades significativas tanto en HJ como en HV, con el primero como el más abundante en el AE de HJ, mientras que en las HV la segunda predominó.

De los siete constituyentes citados anteriormente, sólo los derivados de la asarona codificados como NI10 @, NI15 @ y elemicina estaban ausentes en la mayoría de las muestras analizadas, excepto en las muestras de las recolectas 9 y 10, donde se detectaron los dos primeros constituyentes, y en la recolecta 12 para la tercera, obtenidas a finales de otoño y durante el invierno. Estos componentes son derivados de estructura fenilpropanoide, al contrario de los demás constituyentes mayoritarios, que poseen una estructura terpenoide.

Otro aspecto que llama la atención es el hecho que ocurrió una alternancia entre el monoterpenoide α -pineno (10 carbonos) y el sesquiterpeno biciclogermacreno (15 carbonos), como constituyente principal en el AE de HJ y HV, entre las 12 recolectas realizadas con los nueve árboles muestreados. En las recolectas 1, 2, 5 y 7 el α -pineno fue el constituyente mayoritario, tanto en HJ como en HV; ya en las recolectas 3, 4, 8, 9, 10 y 12 el biciclogermacreno fue detectado como componente mayoritario, tanto en HJ como en HV. Por lo tanto, ocurrió una alternancia en el constituyente mayoritario a lo largo de las estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno). Hubo predominio de α -pineno en la primavera y en el verano, con medias de 30,8% y 35,9% respectivamente para HJ y HV, mientras que el biciclogermacreno prevaleció en el otoño y en el invierno, con media de 25,0 % para el aceite esencial obtenido de hojas en ambas fases de desarrollo.

Tabla N° 2
Composición química de los AE de HV de *Nectandra megapotamica* colectadas en Santa Maria-RS

Constituyentes	Valores (%)														M			
	Estaciones			--- Primavera ---				---- Verano ----				---- Otoño ----				--- Invierno ---		
	Recolectas			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12		
	-- IK Exp. --	IK Lit.		Ar1	Ar2	Ar3	Ar4	Ar5	Ar3	Ar6	Ar7	Ar8	Ar9	Ar1		Ar4		
α -Pinoeno ^{HM}	929	935	932 ^N	37,8	42,4	30,4	29,3	36,2	39,1	41,6	21,5	11,5	15,1	15,6	15,8	28,0		
Canfeno ^{HM}	942	946	943 ^N	1,2	1,6		0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6		
NI1	960						0,1									0,1		
β -Pinoeno ^{HM}	971	975	974 ^N	20,3	23,0	13,0	20,6	24,9	15,2	26,0	15,4	6,5	7,8	9,4	13,0	16,3		
β -Mirceno ^{HM}	987	992	991 ^N	6,1	5,4	0,7	0,8	0,5	1,8	0,5	1,0	1,5	1,8	2,7	0,8	2,0		
α -Terpineno ^{HM}	1015		1012 ^N		0,1											0,1		
Limoneno ^{HM}	1024	1028	1022 ^N	9,2	10,0	2,4	4,8	3,8	3,8	5,3	5,7	2,9	3,1	4,4	4,6	5,0		
Eucaliptol ^{MO}	1025	1029	1029 ^N	1,9	0,8	0,2	0,7	0,3	0,1		0,7	0,3	0,3	0,5	0,4	0,6		
β -E-Ocimeno ^{HM}	1036	1045	1040 ^N	1,3			0,3			0,3	0,6	1,0	0,4	0,6	0,4	0,6		
β -Z-Ocimeno ^{HM}	1047	1050	1047 ^N	7,9	0,4	0,4	1,9	0,7			3,5	1,7	2,2	3,8	2,3	2,5		
τ -Terpineno ^{HM}	1057	1058	1058 ^N		0,2						0,1					0,2		
Terpinoleno ^{HM}	1084	1087	1085 ^N	0,5	0,6		0,3	0,1		0,1	0,4	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3		
β -Linalol ^{MO}	1098	1100	1099 ^N		2,1			0,1	0,4		0,1	0,2			0,2	0,5		
Terpineol ^{MO}	1174	1177	1176 ^N		0,3						0,1				0,1	0,2		
Z-3-Butirato de hexenila ^{MO}	1188		1184 ^N		0,2											0,2		
α -Terpineol ^{MO}	1190		1190 ^N		0,2											0,2		
Bergamol ^{MO}	1258		1257 ^N		0,2											0,2		
δ -Elemeno ^{HS}	1336	1339	1337 ^N	0,2	0,2	0,4	1,0	0,2	0,2		0,7	0,7	0,8	0,6	0,9	0,5		
α -Cubebeno ^{HS}	1349	1350	1345 ^N								0,2			0,2		0,2		
Eugenol ^F	1359		1356 ^N									3,3				3,3		
Ciclosativeno ^{HS}	1364	1365	1371 ^A								0,1			0,1		0,1		
Copaeno ^{HS}	1374	1377	1376 ^N	0,8			0,2	0,3		1,1	1,7	1,9	2,1	3,2	0,3	1,3		
β -Bourboneno ^{HS}	1384	1385	1384 ^N								0,4	0,8	0,5	0,3	0,2	0,4		
β -Cubebeno ^{HS}	1388	1392	1391 ^N	0,2				0,2		0,4	0,6	1,0	1,1	0,9		0,6		
β -Elemeno ^{HS}	1391	1393	1392 ^N	0,3		0,2	0,5		0,1		0,4	0,4	0,3	0,6	0,9	0,4		
Metil eugenol ^F	1404		1404 ^A												0,3	0,3		
NI2	1405						0,1									0,1		
α -Gurjuneno ^{SH}	1409		1409 ^N												0,3	0,3		
NI3	1410						0,1									0,1		
Cariofileno ^{SO}	1417	1421	1420 ^N	1,4	0,8	0,6	1,8	1,2	0,8	1,3	3,0	3,0	1,7	5,3	3,0	2,0		
β -Copaeno ^{HS}	1428	1430	1432 ^A								0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2		
τ -Elemeno ^{HS}	1433		1434 ^N												0,1	0,1		
NI4	1434										0,1					0,1		
Alo-Aromadendreno ^{HS}	1438	1440	1434 ^N				0,2				0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3		
NI5	1445											0,1				0,1		
α -Cariofileno ^{SO}	1451	1456	1454 ^N	0,7			0,3	0,2		1,4	1,0	1,4	1,5	3,0	0,6	1,1		
β -Farneseno ^{HS}	1458		1459 ^N			1,0										1,0		

Tabla 2 continúa en la próxima página

Constituyentes	Valores (%)														M	
	Estaciones			--- Primavera ---			---- Verano ----			---- Otoño ----			--- Invierno ---			
	Recolectas			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
	-- IK Exp. --	IK Lit.		Ar1	Ar2	Ar3	Ar4	Ar5	Ar3	Ar6	Ar7	Ar8	Ar9	Ar1		Ar4
Aromadendreno ^{SH}	1459	1463	1463 ^N	0,2		1,1					0,2	0,2		0,8	0,5	0,5
NI6	1461						0,2									0,2
Germacreno D ^{HS}	1479	1484	1483 ^N	2,6	2,9	5,1	7,6	5,7	5,8	3,3	8,8	11,4	7,2	10,9	11,3	6,9
α -Selineno ^{HS}	1488	1488	1488 ^N	0,7										2,5		1,6
Biciclogermacreno ^{HS}	1495	1502	1500 ^A	5,2	7,4	41,3	21,4	23,9	31,2	15,8	24,5	26,0	24,9	20,8	25,1	22,3
NI7	1501	1504								0,1					0,4	0,3
Valenceno ^{HS}	1505		1503 ^N								0,4					0,4
β -Bisaboleno ^{HS}	1506	1511	1510 ^N			1,3		0,1				0,5	0,3	0,6		0,6
NI8	1511									0,1						0,1
τ -Cadineno ^{HS}	1513		1513 ^N												0,3	0,3
δ -Amorfenol ^{HS}	1515		1512 ^A								0,3					0,3
γ -Cadineno ^{HS}	1515	1516	1514 ^A										0,3	0,5		0,4
Cubebol ^{SO}	1516		1515 ^A									0,4				0,4
δ -Cadineno ^{HS}	1521	1528	1526 ^N	0,8	0,1	0,3	0,4	0,2	0,1	1,6	1,4	1,7	1,7	4,1	0,9	1,1
<i>E</i> - γ -Bisaboleno ^{HS}	1537		1535 ^A			0,5										0,5
NI9	1549					0,1										0,1
Silfiperfol-5-en-3-ol A ^{SO}	1558	1561	1560 ^A	0,1							0,6			0,4		0,4
Elemicina ^F	1559		1558 ^A												8,6	8,6
<i>E</i> -Nerolidol ^{SO}	1564	1566	1563 ^A	0,2							0,4	3,2	2,9	1,4	2,2	1,7
<i>E</i> -Isoelemicina ^F	1566		1570 ^A				4,2									4,2
Longicanfenoleno ^{SO}	1568		1564 ^A								0,1					0,1
Nerolidol ^{SO}	1573	1573	1570 ^N			0,4	1,1	0,3								0,6
Espatuleno ^{SO}	1576	1581	1579 ^N		0,5				0,5	0,6	2,2	2,1	1,8	1,7	1,2	1,3
NI10	1581	1590		0,3		0,6	0,4	0,3								0,4
Oxido de cariofileno ^{SO}	1582	1587	1583 ^N	0,2					0,2	0,2		1,1		1,1		0,6
Globulol ^{SO}	1585	1596	1587 ^N		0,3		0,5	0,2			0,9		0,8		1,0	0,6
Viridiflorol ^{SO}	1593	1605	1595 ^A		0,1	0,2	0,3	0,1		0,2	0,6	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3
NI11 #	1602	1602										0,7	0,9			0,8
NI12	1603	1606									0,3	0,3		0,4	0,5	0,4
NI13	1612	1613									0,1		0,2	0,3		0,2
NI14	1616					0,2										0,2
<i>Z</i> -Asarona ^F	1624	1624	1617 ^A									1,2	1,2			1,2
1-Epi-Cubenol ^{SO}	1630	1631	1629 ^A								0,2			0,3		0,2
τ -Muurolo ^{SO}	1640	1652	1643 ^N		0,1		0,2	0,1	0,1		0,2			0,4		0,2
τ -Cadinol ^{SO}	1642		1642 ^N												0,5	0,5
δ -Cadinol ^{SO}	1644		1646 ^N								0,2					0,2
α -Cadinol ^{SO}	1655	1664	1657 ^N		0,2	0,1	0,2	0,2	0,2		0,4			0,7	1,0	0,4
NI15 @	1657	1658										8,3	13,1			10,7
NI16	1671	1672												0,2	0,3	0,2
<i>E</i> -Asarona ^F	1684	1684	1676 ^A									2,4	3,6			3,0
NI17	1689													0,1		0,1

Tabla 2 continúa en la próxima página

Constituyentes	Valores (%)														M		
	Estaciones		--- Primavera ---				---- Verano ----				---- Otoño ----					--- Invierno ---	
	Recolectas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
	-- IK Exp. --	IK Lit.	Ar1	Ar2	Ar3	Ar4	Ar5	Ar3	Ar6	Ar7	Ar8	Ar9	Ar1	Ar4			
NI18	1691	1694								1,0	1,3	0,1	0,4	0,7			
Total Identificado			99,7	99,4	100	98,8	99,7	100	99,8	99,4	89,7	84,5	98,9	98,4	97,4		
Número de Picos			24	25	21	30	24	17	19	43	37	33	40	38			
Hidrocarburos Monoterpénicos (HM)			84,3	83,7	46,7	58,5	66,6	60,2	74,1	48,5	25,7	31,1	37,4	37,8	54,5		
Monoterpenos Oxigenados (MO)			1,9	3,7	0,2	0,7	0,4	0,6	0,0	0,9	0,5	0,3	0,5	0,7	0,9		
Hidrocarburos Sesquiterpénicos (HS)			10,9	10,6	51,2	31,2	30,5	37,5	22,1	40,2	45,1	39,5	46,4	41,1	33,9		
Sesquiterpenos Oxigenados (SO)			2,6	1,4	1,8	4,2	2,2	1,8	3,6	9,9	11,6	9,0	14,6	9,9	6,1		
Fenilpropanoides (F)			0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	4,8	0,0	8,9	2,1		
No Identificados (NI)			0,3	0,6	0,1	0,9	0,0	0,0	0,2	0,6	10,3	15,5	1,1	1,6	14,8		
Total			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			

Leyenda: IK Exp.*- Amplitud del Índice de Kovats experimental para 12 observaciones; IK Lit. - Índice de Kovats de la literatura; Ar - árboles recolectadas; M - media; # - Fenilpropanoide con perfil de fragmentación semejante al de Z-asarona; @ - Fenilpropanoide con perfil de fragmentación semejante al de E-asarona; N - NIST, 2002; A - ADAMS, 2001.

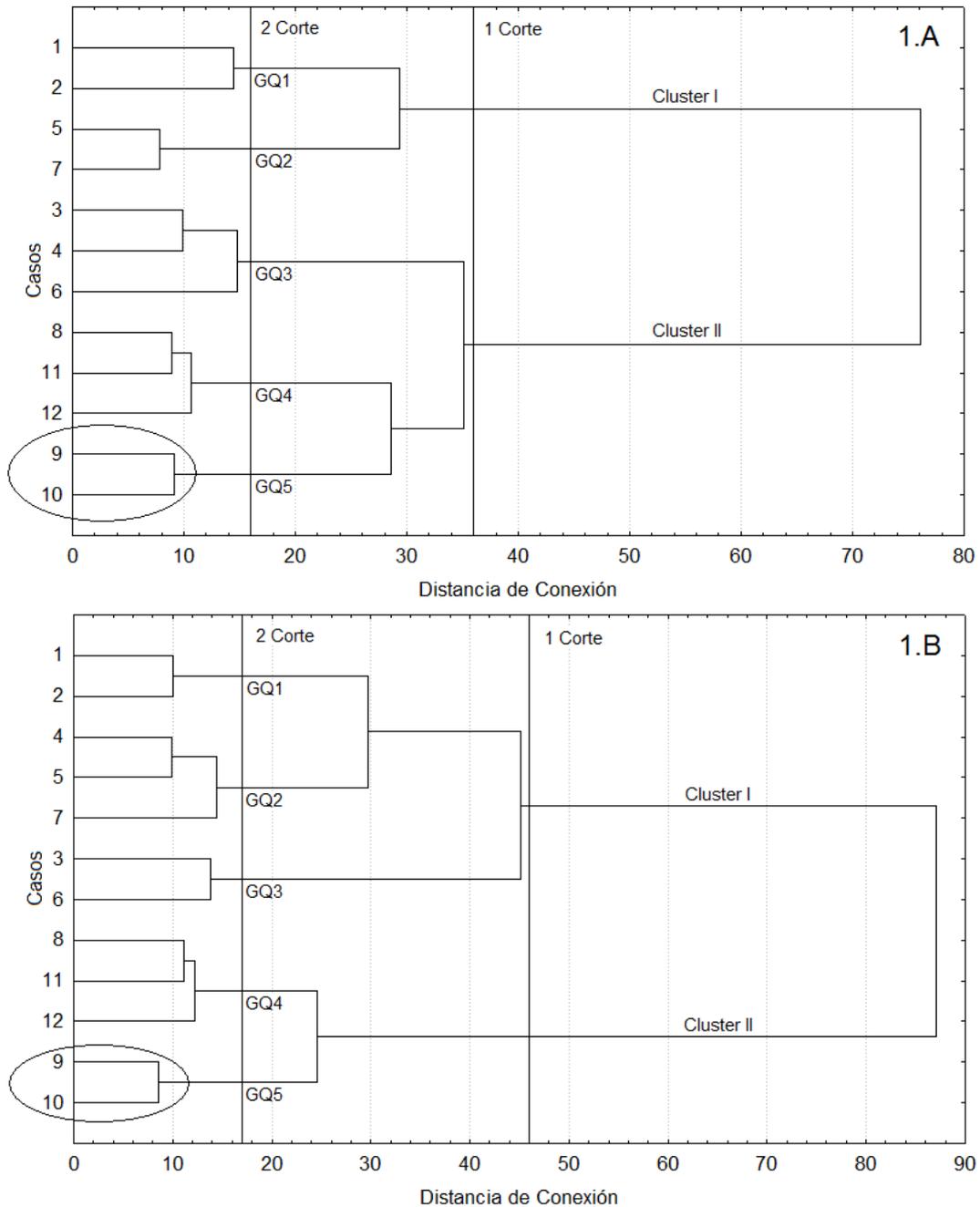
Los análisis AAJ para la composición química del AE de HJ y HV presentan inicialmente la formación de dos agrupamientos, con cortes en los dendrogramas en las distancias 36 y 46 (primer corte, Figuras N° 1 A y B, respectivamente). En estas distancias las muestras se agruparon de acuerdo con sus constituyentes mayoritarios, α -pineno o biciclogermacreno. Al realizar un segundo corte en las distancias 16 y 18 de los respectivos dendrogramas se observó la formación de cinco grupos distintos para el AE de las hojas en ambas fases de desarrollo.

Para los AE de las HJ, la matriz de distancia euclidiana entre los casos, generada por el AAJ, indicó las mayores distancias entre las muestras HJ2 y HJ9 (48,6), HJ2 y HJ4 (43,0) y entre las muestras HJ2 y HJ10 (42,2), por lo cual estas son las composiciones más diferenciadas. Las distancias menores se observaron entre las muestras HJ5 y HJ7 (7,8), HJ8 y HJ11/HJ12 (8,9), HJ9 y HJ10 (9,1) y entre HJ3 y HJ4 (9,9), por lo cual estas son las composiciones más similares. En el caso de las muestras de AE de las HV, se observaron las mayores distancias entre las muestras HV2 y HV9 (42,8), HV1 y HV10 (40,0) y entre HV2 y HV10 (39,7). Las menores distancias se obtuvieron entre las muestras HV9 y HV10 (8,6), HV4 y HV5 (9,9) y entre HV1 y HV2 (10,1).

Los grupos químicos (GQ) más próximos o de composición más semejante fueron el GQ4 y GQ5, y los grupos más distantes fueron el GQ5 y GQ1. La matriz de agrupamiento o de fusión generada por el AAJ por el método Ward mostró distancias de 87,06 entre las muestras de los GQ1 y GQ5 y distancia de 24,52 entre las muestras de los GQ4 y GQ5 para los AE de las HV. En el caso de los AE de HJ la distancia entre el GQ4 y el GQ5 fue 28,54 y 76,06 entre el GQ1 y el GQ5. Esto significa que las muestras tienen diferencias en la composición química debido a la variabilidad en los valores porcentuales de constituyentes comunes a todas las muestras (por ejemplo, α -pineno y biciclogermacreno, entre otros), y debido a la ocurrencia de algunos constituyentes en muestras específicas (por ejemplo, E-asarona y Z-asarona, entre otros), la cuales influyeron en la agrupación observada en los dendrogramas para muestras de AE de HJ y HV de *N. megapotamica*.

Las muestras de otoño e invierno fueron agrupadas en el cluster II (primer corte) para los AE de las HV, con excepción de la muestra 7 que fue agrupada en el cluster I, junto con las muestras de la primavera y el verano. El agrupamiento resultante del análisis de las muestras de HJ no diferenció entre las estaciones del año.

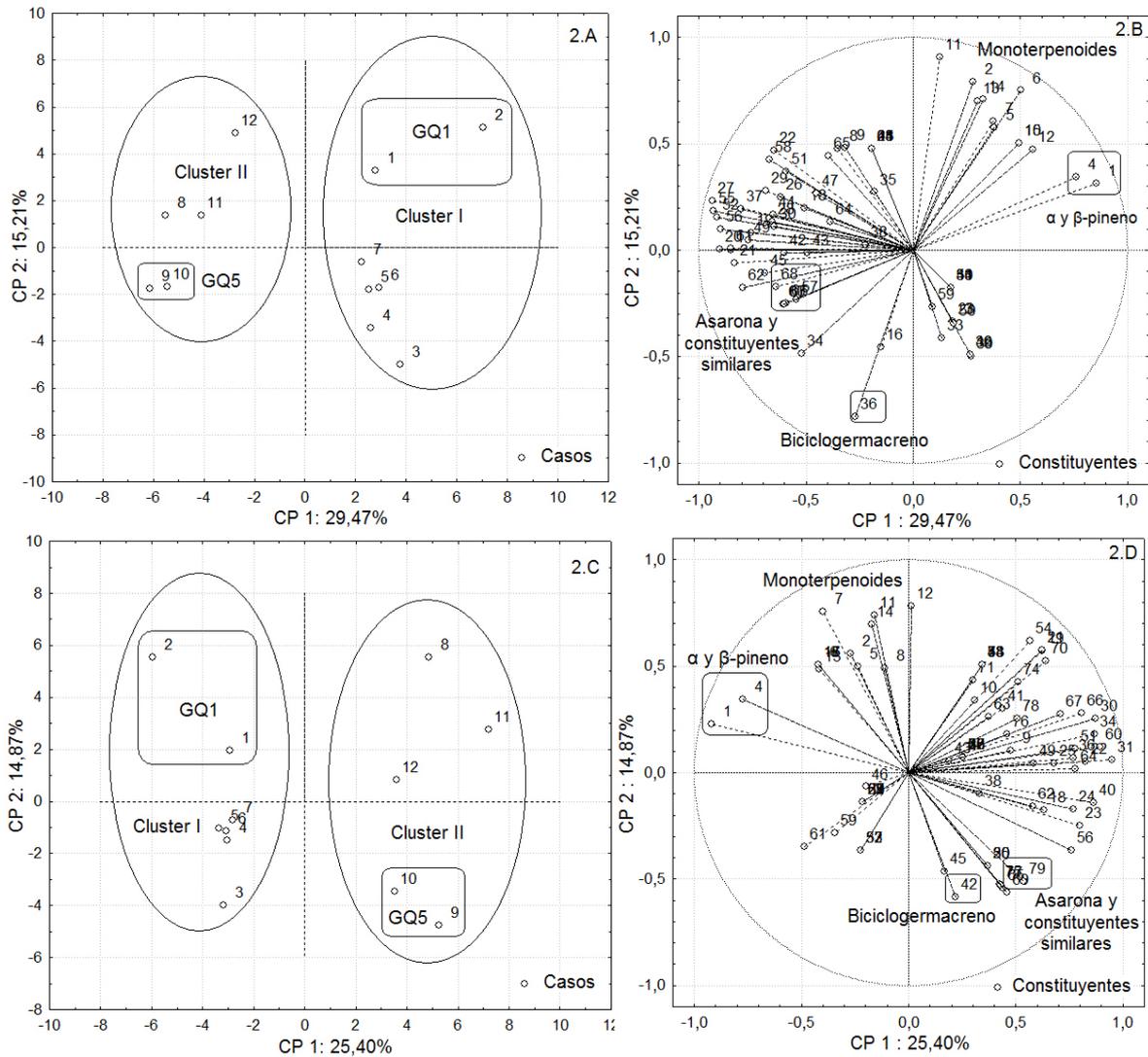
Figura N°1.
Dendrograma para el agrupamiento de las muestras de los AE de HJ (1.A) y HV (1.B) de *Nectandra megapotamica*, recolectadas en Santa Maria-RS. Las elipses destacan el grupo químico 5 (GQ5), formado por los AE de las recolectas 9 y 10.



Leyenda – Recolectaciones por estaciones del año (Casos): Primavera - 1, 2 y 3; Verano - 4, 5 y 6; Otoño - 7, 8 y 9; Invierno - 10, 11 y 12; GQ: grupo químico.

Figura N° 2

Dispersión de los casos para los AE de HJ (2.A) y HV (2.C), y de las variables para los AE de HJ (2.B) y HV (2.D) de *N. megapotamica* recolectadas en Santa María - RS



Leyenda – Recolectaciones por estaciones del año (Casos – 2.A y 2.C): Primavera - 1, 2 y 3; Verano - 4, 5 y 6; Otoño - 7, 8 y 9; Invierno - 10, 11 y 12; GQ: grupo químico; CP: componentes principales; Constituyentes en orden de ocurrencia, conforme la tabla 1: 1 - 67 (2.B) y 1 - 79 (2.D).

Las muestras 1, 2, 5 y 7 de las HJ (cluster I) presentaron α -pineno como constituyente mayoritario, con media de 35,7% así como 14,7% para biciclogermacreno. Sin embargo, las muestras 3, 4, 6, 8, 9, 10 y 12 (cluster II) presentaron el biciclogermacreno como principal constituyente, con media de 30,9%, seguido por el α -pineno con media de 19,7%. La muestra 11 es una excepción, ya que teniendo el α -pineno como constituyente mayoritario (20,5%) y menor tenor de biciclogermacreno (20,2%) fue agrupada en el cluster II, debido a otras características de la composición química, como el contenido total de sesquiterpenoides, y de monoterpenoides, que este último fue menor en las muestras del cluster I. Para las HV, las muestras 1, 2, 4, 5, 6 y 7 (cluster I) presentaron α -pineno como principal constituyente con media de 37,7%, seguido por biciclogermacreno, con media de 17,5%. La muestra 3 fue una excepción ya que a pesar de tener el biciclogermacreno como constituyente mayoritario (41,3%) y menor tenor de α -pineno (30,4%), fue agrupada en el cluster I. Sin embargo, las muestras 8,

9, 10, 11 y 12 (cluster II) presentaron el biciclogermacreno como constituyente principal con media de 24,2% y 15,9% de α -pineno.

Las muestras de AE de las hojas de las colectas 9 y 10 en ambos estadios de desarrollo resultaron más distantes en relación a las muestras restantes dispuestas en el dendrograma (Figura N°1, A y B), indicando que estos aceites tienen una composición química diferenciada. Estos AE presentaron los menores tenores de α y β -pineno y limoneno, siendo también las únicas muestras que presentaron los derivados de estructura fenilpropanoide *E*-asarona, *Z*-asarona, bien como los compuestos de estructura relacionada, codificados como NI7 # y NI11 # en las HJ, totalizando 15,0%. El mismo comportamiento puede ser observado en las HV, cuyos AE también presentaron los constituyentes de estructura semejante a la asarona, codificados como NI10 @ y NI15 @, con 15,6% (Tablas 1 y 2), siendo la presencia de estas sustancias la posible causa para la formación de este grupo químico diferenciado, denominado GQ5, destacado también por el ACP (Análisis de Componentes Principales). En este análisis, los gráficos de dispersión de los casos y de las variables descriptoras presentaron una proyección espacial semejante entre estos constituyentes de estructura fenilpropanoide y las muestras 9 y 10, en los AE de hojas en ambas fases evaluadas (Figura N° 2 A, B, C y D respectivamente).

El ACP generó 10 componentes principales (CP) con valores propios mayores que 1, cinco de los cuales contienen 76,76 y 75,60% de la variancia total acumulada en los datos, para los AE de HJ y HV, respectivamente. Los resultados de este análisis son coherentes con los obtenidos en el AAJ, ya que el número de las componentes principales representativas en el ACP es similar al número de grupos formados en el AAJ, cinco agrupamientos en este caso.

Los constituyentes NI7 #, NI11 #, NI10 @ y NI15 @ no pudieron ser identificados con ayuda del banco de datos del equipo. Sin embargo, estos constituyentes presentaron espectros de masas semejantes a los isómeros *Z* y *E* de la asarona e índices de Kovats diferentes, lo que también fue observado al comparar los modelos de fragmentación de los espectros de masas con los dos isómeros en el portal de la base de datos de referencia del National Institute of Standards and Technology (NIST). Estas moléculas son los principales caracteres diferenciadores entre los AE de la población analizada, caracterizados en el segundo corte de los dendrogramas.

DISCUSIÓN

En relación a la clase de terpenoides, el perfil químico de los AE analizados presentó alta proporción de hidrocarburos monoterpénicos (49,1 y 54,5% - HJ y HV, respectivamente), a diferencia de otros AE de Lauraceae, para los cuales fue descrita alta proporción de hidrocarburos sesquiterpénicos (Alcântara *et al.*, 2012, 2010; Ciccio y Chaverri, 2008; Telascrea *et al.*, 2008). No obstante, al considerar el constituyente mayoritario, este fue identificado como el hidrocarburo sesquiterpénico biciclogermacreno, con porcentajes de 24,6 y 22,3% para HJ y HV, respectivamente.

Otras investigaciones realizadas con los AE de las hojas de *N. megapotamica* incluyen un número menor de constituyentes que los informados en este trabajo para HJ y HV. Tondolo *et al.* (2013) detectaron 25 constituyentes en la composición de muestras de HJ y HV, para dos individuos de *N. megapotamica* colectados en el Morro do Elefante en Santa Maria-RS, en la primavera de 2010.

En hojas obtenidas de especímenes en São Paulo, Romoff *et al.* (2010) describieron la presencia de 19 constituyentes en cuatro muestras de AE de las hojas de dos individuos, mientras Brito (2009) observó 59 constituyentes en muestras de AE de las hojas de tres individuos colectados mensualmente, de febrero de 2006 hasta enero de 2007. Marin *et al.* (2010) observaron cómo componentes mayoritarios en AE de las hojas de *N. megapotamica* la presencia de β -cariofileno, *E*-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno y guaicol. Estos constituyentes también fueron detectados en las muestras analizadas en el presente trabajo, pero en concentraciones menores. Romoff *et al.* (2010) obtuvieron AE de las hojas de esta especie rica en α -bisabolol, con variación de 62,3 a 69,4%, además de 8,2 a 22,6% de δ -elemeno, presentando varios de los constituyentes observados en las muestras analizadas en esta investigación, pero en bajas concentraciones. Brito (2009) observó diferencias cualitativas y cuantitativas entre los AE de las hojas de diferentes individuos de *N. megapotamica*. Los constituyentes mayoritarios detectados fueron α -santaleno, β -santaleno, γ -amorfenol, α -*E*-bergamoteno, alo-himachalol y biciclogermacreno para dos de los individuos analizados, mientras que en un tercer

individuo predominaron muurola-4,10(14)-dieno-1- β -ol y δ -elemeno. De estos, sólo biciclogermacreno y δ -elemeno fueron observados en las muestras analizadas en esta investigación. Mello *et al.* (2005) obtuvieron distintas composiciones químicas para AE de individuos de la especie colectados en diferentes regiones del estado de São Paulo, uno conteniendo δ -elemeno y seicheleno como componentes mayoritarios, y en otro predominaron *E*-cariofileno, biciclogermacreno y germacreno D.

Torres *et al.* (2014) observaron mayores contenidos de sesquiterpenoides (58,5% a 68,9 %) en relación a los monoterpenoides (21,0% a 31,7 %) en AE obtenidos de individuos de *N. megapotamica* recolectados en diferentes fases vegetativas, durante el otoño en Corrientes (Argentina). Los autores describen diferencias en la composición química de estos aceites en relación a lo relatado en la literatura, comportamiento semejante al observado en las recolecciones realizadas en Santa María. Sin embargo, en el otoño, HJ y HV presentaron los menores rendimientos de AE, y el contenido de sesquiterpenoides fue superior al de monoterpenoides, con medias de 51,7% y 43,2% respectivamente. La comparación de los resultados de este trabajo con la composición anteriormente relatada para los AE de *N. megapotamica* permite inferir que la composición química observada posee constituyentes inéditos descritos para AE de la especie en estudio, como por ejemplo, las estructuras fenilpropanoides *E*-asarona, *Z*-asarona y derivados de estructura correlacionada.

Además las características genéticas pueden ser consideradas como el factor endógeno determinante para la variabilidad, la composición química debe estar sufriendo influencia de factores exógenos, como los relacionados con los diferentes biomas donde fueron realizadas las colectas (Sabino *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2014) y también a la diversidad climática existente entre ellos. El clima de Santa María-RS “*Cfa*” – subtropical húmedo, es similar al clima de Corrientes, “*Cfa*” sin estación seca (Mapoteca, 2014), local de recolectas de Torres *et al.* (2014), y ambas están en la misma latitud. Poseen mayor diferencia en relación al clima de São Paulo-SP, el cual es clasificado como “*Cwa*” – subtropical caliente y de invierno seco (Rolim *et al.*, 2007), local de colecta de los trabajos de Romoff *et al.* (2010) y de Brito (2009). Las diferencias en la composición química también pueden ser derivadas de factores como fenología, altitud, disponibilidad hídrica, temperatura, intensidad de luz, fertilidad del suelo (Chalchat y Özcan, 2008; Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Lima *et al.*, 2003), entre otros.

Los resultados de los trabajos anteriormente realizados para *N. megapotamica*, en comparación con los observados en este trabajo, sugieren la existencia de diferentes quimiotipos o ecotipos para la especie, comportamiento también sugerido por Torres *et al.* (2014), al comparar la composición química de AE de especímenes recolectados en Argentina con la descripción existente en la literatura. Sin embargo, análisis estacionales en los mismos individuos deben ser utilizados como base a esta suposición, eliminando así la influencia de factores como ambiente, fisiología o expresión génica diferencial. El comportamiento del AE de las hojas analizadas en este trabajo sugiere que las HV son más indicadas para un análisis estacional comparativo, ya que estas estuvieron expuestas a las variaciones climáticas que caracterizan las estaciones del año y expresaron estas influencias en la composición química de los respectivos EO, lo que no ocurrió con las HJ.

Las asaronas y los demás fenilpropanoides detectados en los AE fueron los principales factores de diferenciación entre grupos químicos, expresados genéticamente por diferentes individuos en la población de *N. megapotamica* evaluada. Fenilpropanoides y terpenoides son formados por rutas metabólicas distintas en los vegetales (Peres, 2004; Dixon *et al.*, 2002; Sangwan *et al.*, 2001) y, de esta forma, la presencia de *E* y *Z*-asarona, NI10 @; NI15 @ y elemicina en el AE caracteriza esa diferenciación. Así, como ocurre entre los diferentes isómeros de la asarona, la diferencia entre las moléculas no identificadas, posiblemente esté en la configuración del doble enlace de la cadena lateral, que frecuentemente confiere bioactividad diferenciada o en la posición de uno o más substituyentes en el anillo aromático. Sin embargo, la presencia de estos derivados no fue observada en los AE descritos para la especie en otros trabajos publicados hasta el momento. La presencia de fenilpropanoides es conocida en plantas de la familia Lauraceae (Gottlieb, 1972) y en el género *Nectandra* (Grecco *et al.*, 2013; Garcez *et al.*, 2009), siendo que la presencia de derivados de la asarona fueron descritos para el extracto etanólico de cáscaras de *N. megapotamica* (Santos Filho y Gilbert, 1975; Silva Filho *et al.*, 2004). De acuerdo con Dixon y Paiva (1995), los fenilpropanoides son respuestas químicas a estrés

bióticos y abióticos, como elevada irradiancia, radiación ultravioleta, ataque de patógenos, heridas, bajas temperaturas, deficiencia de fósforo, hierro y nitrógeno, entre otros.

CONCLUSIONES

Los análisis multivariados mostraron ser herramientas adecuadas para evaluar la variabilidad de los AE de *N. megapotamica*. La composición química de los AE de HJ y HV fueron similares, hubo alternancia entre α -pineno y biciclogermacreno como constituyentes mayoritarios, detectados por el AAJ y el ACP, formando dos agrupamientos diferentes entre individuos. Adicionalmente se obtuvieron cinco GQs en función de la composición, indicando presencia de quimiotipos o ecotipos. Se obtuvieron 10 CP, de estos cinco representan aproximadamente el 76,0% de la variabilidad de los datos. Los grupos similares (GQ4 y GQ5) se caracterizaron por el predominio de biciclogermacreno y la presencia de fenilpropanoides, entre ellos los isómeros de la asarona, hasta el momento no descritos para AE de esta especie, mientras que los grupos diferentes fueron GQ1, con predominio de α -pineno y GQ5.

AGRADECIMIENTOS

A la CAPES, FIPE-UFSM, CNPq y FAPERGS/PRONEX por el apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams RP. 2001. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry**, pp.63-372. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Alcântara JM, Yamaguchi KKL, Silva JRA, Veiga-Junior VF. 2012. Composição química de óleos essenciais de *Dicypellium manausense*, *Mezilaurus duckei*, *Mezilaurus itauba* e *Pleurothyrium vasquezii*, quatro espécies amazônicas da família Lauraceae. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 12(5): 469-475.
- Alcântara JM, Yamaguchi KKL, Silva JRA, Veiga-Junior VF. 2010. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amaz** 40: 567-572.
- Alves EO, Mota JH, Soares TS, Vieira MC, Silva CB. 2008. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciênc Agrotec** 32(2): 651-658.
- Apel MA, Lima MEL, Souza A, Cordeiro I, Young MCM, Sobral MEG. 2006. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacologyonline** 3:376-383.
- Baitello JB, Hernández FGL, Moraes PLR, Esteves R, MarcovinoJR. 2003. **Lauraceae**, pp. 149-223. In: Wanderlei MGL, Shepherd GJ, Giulietti AM, Melhem TS. Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. Ed. Rima, São Paulo, Brasil.
- Baralle F, Busch A, Vernengo MJ, Kuch AM. 1972. Isolation of ocoteine from *Nectandra saligna* and *Phoebe porfiria*. **Lloydia** 35(3): 300-302.
- Barra, A. 2009. Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. **Nat Prod Commun** 4(8): 1147-1154.
- Brito AFR. 2009. **Análise da variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez**. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil, pp.38-61.
- Carvalho PER. 2006. **Espécies florestais brasileiras**. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, pp.151-156. Ed. 1, v. 2, EMBRAPA INFORMAÇÕES TECNOLÓGICAS/EMBRAPA FLORESTAS, Brasília, Brasil.

- Ceolin GB, Rosito JM, do Canto-Dorow TS. 2009. Leaf surface characteres applied to Lauraceae taxonomy in a seasonal forest of Southern Brazil. **Braz Arch BiolTechno** 152(6): 1453-1460.
- Chalchat JC, Özcan MM. 2008. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and steam of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. **Food Chemistry** 110: 501-503.
- Ciccio JF, Chaveri C. 2008. Volatile constituents of the oils from *Povedadaphne quadriporata* (Lauraceae) from “Alberto M. Brenes” biological preserve, Costa Rica. **Quim Nova** 31: 605-609.
- da Silva Filho AA, Costa ES, Cunha WR, Silva MLA, Nanayakkara NPD, Bastos JK. 2008. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrifuran ligandans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research** 22(10): 1307-1310.
- de Luca AN, Nunomura SM, Yoshida M. Phytochemical analyses of Lauraceae species. 2004. **Rev Cubana Plant Med** 10(especial 05): 30.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Srinivasa Reddy MS, Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology** 3(5): 371-390.
- Dixon RA, Paiva N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell** 7: 1085-1097.
- EMBRAPA. 2011. Atlas climático da região sul do Brasil. Embrapa Clima Temperado/Embrapa Florestas, Pelotas/Colombo, Brasil.
- Farias JAC, Teixeira IF, Pés L, Alvarez Filho A. 1994. Estrutura fitossociológica de uma Floresta Estacional Decidual na região de Santa Maria, RS. **Ci FI** 4(1): 109-128.
- Ferreira DF. 2008. **Estatística multivariada**, pp. 341-394, 395-471, Ed. 1, Editora UFLA, Lavras, Brasil.
- Garcez FR, Garcez WS, Hamerski L, Miguita CH. 2009. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Quim. Nova** 32(2): 407-411.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. 2007. Planta medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova** 30(2): 374-381.
- Gottlieb, OR. 1972. Plant Chemosystematics and phylogeny. III. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry** 11: 1537-1570.
- Grecco SS, Martins EGA, Sartorelli P, Lago JHG. 2013. Fenilpropanóides isolados do extrato apolar de *Nectandra leucantha* Ness & Mart. (Lauraceae). Comunicacón de laXXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2013 (SBQ, Águas de Lindóia, SP, Brasil, 25-28 maio).
- Grela I, Brussa C. 2003. Relevamiento florístico y análisis comparativo de comunidades arbóreas de Sierra de Ríos (Cerro Largo – Uruguay). **Agrociencia** II(2): 11-26.
- IBGE. 2012. **Manual técnico da vegetação brasileira**, pp.39, 96-97. Ed. 2, IBGE, Rio de Janeiro, Brasil.
- Krúgel MM, Burger MI, Alves MA. 2006. Frugivoria por aves em *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) em uma área de Floresta Estacional Decidual no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia** 96(1): 17-24.
- Lattin JM, Carroll JD, Green PE. 2011. **Análise multivariada de dados**, pp. 94-1001, 215-252. Ed 1, Avritscher H (translator), Cenage Learning, São Paulo, Brasil.
- Lima HRP, Kaplan MAC, Cruz AVM. 2003. Influence of abiotic factors on terpenoids production and variability in the plant. **Floresta e Ambiente** 10(2): 71-77.
- Longhi RA. 1995. **Livro das árvores: árvores e arvoretas do sul**, pp. 49-50. Ed. 1, L&PM, Porto Alegre, Brasil.
- Lorenzi H. 2002. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Ed. 4(1), Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, Brasil, pp.139.
- Machado PFS, Longhi SJ. 1993. Aspectos florísticos e fitossociológicos do “Morro do Elefante”, Santa Maria, RS. **Rev do Centro de Ciências Rurais** 19(3-4): 261-280.
- Mapoteca, Ministerio de Educación Presidencia de la Nación. 2014. **Corrientes: Mapa Climático**. <http://mapoteca.educ.ar/mapa/corrientes/?tema=climatico> [Consulted April 17, 2014].
- Mardia KV, Kent JT, Bibby JM. 1994. **Multivariate analysis**, pp. 213-244, 360-384. Ed 9, Academic Press, London, UK.
- Marin R, Silva GT, Fontoura JB, Giordani RB, Henriques AT, Apel MA. 2010. Composição química do óleo essencial obtido de *Nectandra megapotamica* (Spreng) Chodat et Hassler do Sul do

- Brasil. Comunicação de laXXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2010 (SBQ, Águas de Lindóia, SP, Brasil, 28-31 maio).
- Marques CA. 2001. Importância econômica da Família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente** 8(1): 195-206.
- Mello NTK, Dias IEC, Yoshida M. 2005. Chemical constituents of *Nectandra saligna* Nees (Lauraceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 10 (especial): 319.
- National Institute of Standards and Technology, NIST. 2002. **NIST/EPA/NIH mass spectral library & search/analysis programs NIST.02 update**. John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
- Pedralli GA. 1986. Família Lauraceae Lindley no Rio Grande do Sul, Brasil: gênero *Nectandra* Rol. Ex Rottb. **Iheringia** 35: 133-149.
- Peres LEP. 2004. **Metabolismo secundário**, pp. 1-10. Ed. 1, ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil.
- Rolim GS, Camargo MBP, Lania DG, Moraes JFL. 2007. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na diferenciação de zonas agroclimáticas para o Estado de São Paulo. **Bragantia** 66(4): 711-720.
- Romoff P, Ferreira MJP, Padilha R, Toyama DO, Fávero OA, Lago JHG. 2010. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). **Quím Nova** 33(5): 1119-1121.
- Rohwer JG, Kubitzki K. 1993. Ecogeographical differentiation in *Nectandra* (Lauraceae), and its historical implications. **Botanica Acta** 106: 88-99.
- Sabino JFP, Reyes MM, Barrera CDF, Silva AJR. 2012. Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-MS e análise multivariada. **Quím Nova** 35(1): 97-101.
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. 2001. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation** 34: 3-21.
- Santos Filho D, Gilbert B. 1975. The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. **Phytochemistry** 14(3): 821-822.
- Sartor RB. 2009. **Modelagem, simulação e otimização de unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. Dissertação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp. 7-9.
- Silva DT. 2013. **Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, pp. 60-78.
- Silva Filho AA, Silva MLAE, Eberlin MN, Tomazela DM, Bastos JK. 2004. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **J Nat Prod** 67(1): 42-45.
- Streck EV, Kämpf N, Dalmolin RSD, Klamt E, Nascimento PC, Schneider P, Giasson E, Pinto LFS. 2008. **Solos do Rio Grande do Sul**, pp 86-100, 148, 157-158. Ed. 2, EMATER/RS; UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- Subki SYM, Jamal JA, Husain KA, Manshoor IN. 2013. Characterisation of leaf essential oils three *Cinnamomum* species from Malaysia by gas chromatography and multivariate data analysis. **Pharmacognosy Journal** 5(1): 22-29.
- Telascrea M, Araújo CC, Cavalheiro AJ, Marques MOM, Facanali R, Moraes PLR. 2008. Essential oil from leaves of *Cryptocarya spp* from the Atlantic Rain Forest. **Quím Nova** 31: 503-507.
- Telascrea M, Araújo CC, Marques MOM, Facanali R, Moraes PLR, Cavalheiro AJ. 2007. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology** 35: 222-232.
- Tondolo JSM, Amaral LP, Simões LN, Garlet QI, Schindler B, Oliveira TM, Silva BF, Gomes LC, Baldisserotto B, Mallmann, Heinzmann BM. 2013. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology** 11(3): 667-674.
- Torres AM, Camargo FJ, Ricciardi GA, Ricciardi AIA, Dellacassa E. 2014. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. *Journal of Essential Oil Research* DOI 10.1080/10412905.2014.882277 (online): 1-7.
- Zanon MMF, Goldenberg R, Moraes PLR. 2009. O gênero *Nectandra* Rol. Ex Rottb. (Lauraceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta bot bras** 23(1): 22-35.

5 MANUSCRITO

5.1 Manuscrito 1

AMARAL, L. P.; PINHEIRO, C. G.; BIANCHINI, N.; SCHINDLER, B.; GNOCATO, F. S.; ARALDI, D. B.; COSTA, E. C.; HEINZMANN, B. M. Óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae): composição química x efeito alelopático. A ser submetido, 2014.

Óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae): composição química x efeito alelopático

Lúcio de Paula Amaral¹; Carlos Garrido Pinheiro¹; Nádia Helena Bianchini²; Bianca Schindler²; Fernando Saccol Gnocato^{2,3}; Dani Block Araldi³, Ervandil Correa Costa^{1,3}; Berta Maria Heinzmann^{1,4}.

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, CCR, UFSM, RS, Brasil; ²Curso de Graduação em Engenharia Florestal, CCR, UFSM, RS, Brasil; ³Departamento de Defesa Fitossanitária, CCR, UFSM, RS, Brasil; ⁴Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, CCS, UFSM, RS, Brasil.

Resumo

Fenótipos com relação à composição de óleos essenciais (OE) foram observados em uma população de *Nectandra megapotamica* em Santa Maria, RS, Brasil. Este trabalho descreve a atividade alelopática dos OE de dois perfis químicos distintos, denominados grupos químicos (GQ) 2 e 5, sobre sementes de espécies-alvo mono e dicotiledôneas. Os OE foram analisados por CG-EM e DIC e sua atividade alelopática foi avaliada em diferentes concentrações (1, 5 e 15%), os quais foram diluídos separadamente em acetona, Tween 20[®] e água destilada, com posterior aplicação em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar Regina, picão-preto (*Bidens subalternans* DC.), soja (*Glicine max* (L.) Merr.), aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e arroz (*Oryza sativa* L.). Após a imersão nas soluções contendo o OE, as sementes foram transferidas para cinco placas de petri com 25 sementes por tratamento e levadas para câmara de germinação (BOD) com condições de temperatura e fotoperíodo ajustadas para cada espécie-alvo, sendo avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação, índice de velocidade de emergência e comprimento da parte aérea, radicular e total. Foram obtidas componentes principais (CP) para os dados de todas as espécies, tendo sido constatada suscetibilidade diferenciada das sementes em relação aos OE avaliados. O efeito alelopático foi dependente da concentração, no entanto, todas as espécies-alvo apresentaram menor porcentagem de germinação e menor desenvolvimento de plântulas na presença dos OE a 15%. Os OE apresentaram composições químicas variadas, com teores de monoterpenoides, sesquiterpenoides e fenilpropanoides, respectivamente, de 50,78; 38,35 e 0,88% para o GQ2, e de 37,86; 43,04 e 9,23% para o GQ5. As espécies-alvo mais afetadas foram aveia-preta, picão-preto e azevém. Já as espécies menos afetadas foram alface, soja e arroz. A atividade mais intensa do OE classificado como GQ5 em

relação ao GQ2 foi observada no teste com arroz. Porém, os dois grupos químicos foram estatisticamente equivalentes para as demais espécies e a classe de espécies monocotiledôneas foi a mais afetada pelos OE. Conclui-se que os OE utilizados apresentaram atividade alelopática sobre as espécies avaliadas, sem haver grande distinção entre os GQ2 e GQ5.

Palavras-chave: aleloquímicos, terpenoides, fenilpropanoides, bioherbicidas.

INTRODUÇÃO

O potencial dos óleos essenciais (OE) como fontes de novos herbicidas vem sendo pesquisado devido à ação alelopática descrita para muitos deles (ROMAGNI et al., 2000; DUKE et al., 2002; OOTANI et al., 2013; PROPERZI et al., 2013). Vários constituintes do metabolismo secundário sintetizados pelas plantas inibem a germinação de sementes (RICE, 1984). Segundo a International Allelopathy Society (IAS), a ação alelopática é decorrente do efeito de metabólitos secundários, chamados, nesta concepção, de aleloquímicos, os quais são produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, que influenciam o crescimento e o desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (MACÍAS et al., 2006).

Os aleloquímicos oferecem menor risco ambiental e para a saúde do homem nas práticas agrícolas, mais especificamente no controle de plantas daninhas, e, por esse motivo, são considerados alternativas para a obtenção de biodefensivos agrícolas (SODAEIZADEH et al., 2010; FAROOQ et al., 2011; OOTANI et al., 2013). Desta maneira, plantas de diversas famílias botânicas da flora brasileira são fontes ricas de novas moléculas e mecanismos de ação, com promissor potencial para o desenvolvimento de novos herbicidas e/ou bioherbicidas (DUKE et al., 2000), a exemplo dos terpenoides e dos fenilpropanoides presentes nos OE.

A família Lauraceae é uma das que se destacam quanto à ocorrência de espécies aromáticas no Brasil, bem como em vários outros países (AZOMIVA, 2012; MARQUES, 2001). A exemplo de outras espécies desta família, *Nectandra megapotamica* possui uso etnobotânico, em que as folhas são usadas no tratamento de tosses, gripes e como calmante, as cascas, como analgésico, antirreumático e no tratamento de abscessos, enquanto que as raízes possuem propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SILVA FILHO et al., 2004; MELLO et al., 2005; ALVES et al., 2008). Resultados de pesquisas descritas na literatura, como a atividade antiinflamatória, atividade antifúngica e antimicrobiana, além da ação anestésica (sedação leve e anestesia profunda) em robalos-peva (*Rhamdia quelen*) e inibição da atividade hemolítica do veneno de *Bothrops diporus* (APEL et al., 2006; BRITO, 2009; TONDOLO et

al., 2013; Torres et al., 2013), indicam o potencial desta espécie para a geração de moléculas bioativas. O uso etnobotânico, atrelado às diferentes atividades biológicas já descritas e à necessidade de obtenção de diferentes métodos de controle de plantas daninhas credenciam a espécie como objeto de pesquisas para a busca de alternativas voltadas para o controle dessas espécies.

Quanto à ação alelopática de espécies desta família, foi observada inibição de germinação e fitotoxicidade em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), plântulas de agrião-de-jardim (*Lepidium sativum*) e greengram (*Vigna radiata*) pelo OE de folhas de *Ravensara aromatica* Sonn., com três quimiotipos (ANDRIANJAFINANDRASANA et al., 2013). A notável inibição da germinação de sementes de *Lactuca sativa* pelo OE de *Cinnamomum camphora*, bem como por seu constituinte majoritário, o monoterpenoide cânfora, foram descritas por Satyal et al. (2013). Já Prichoa et al. (2013) observaram efeito alelopático do extrato aquoso de folhas das espécies arbóreas *Cryptocarya moschata* e *Ocotea odorifera* em sementes de alface.

A hipótese deste trabalho é que os OE extraídos de folhas frescas de *N. megapotamica*, possuem atividade alelopática e que esta varia em função de sua composição química diferenciada. Neste caso, espera-se que o OE contendo maior proporção de sesquiterpenoides e fenilpropanoides (GQ5) apresente efeito alelopático superior daquele com maior proporção de monoterpenuoides (GQ2), ambos descritos por Amaral et al. (2014a, b). Para confirmar essa hipótese, a atividade alelopática dos OE de *N. megapotamica* pertencentes aos dois GQ foi testada em diferentes concentrações, avaliando-se seu efeito na germinação e no crescimento de plântulas de espécies mono e dicotiledôneas consideradas plantas daninhas em lavouras, em espécies comumente utilizadas como bioindicadoras de alelopátia, e também, em culturas agrícolas, para as quais espera-se observar menor efeito alelopático dos OE utilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos óleos essenciais

Os OE foram obtidos por hidrodestilação, a partir de folhas frescas coletadas de nove às onze horas da manhã, entre o verão e outono para o GQ2 e, outono e inverno para o GQ5, em indivíduos de uma população de *N. megapotamica* localizada em Santa Maria, RS, Brasil. Uma vez que os OE de folhas dos indivíduos amostrados apresentaram variabilidade química, originaram cinco grupos químicos distintos (GQ1-GQ5) através de análises multivariadas

(AMARAL et al., 2014b), baseados nas semelhanças de sua composição química. Os pools correspondentes aos GQ2 e GQ5 foram selecionados para esse estudo, considerando-se a quantidade disponível e as diferenças químicas apresentadas entre os grupos.

Análise dos óleos essenciais

Alíquotas de 2 µL dos pools de OE dos GQ2 e GQ5 foram diluídas separadamente em 1 mL de n-hexano e analisadas por cromatografia gasosa com espectrometria de massas acoplada (CG-EM) em equipamento Agilent 7890 com detector de massas 5975C. Foram utilizados como parâmetros de análise: coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), volume de injeção 1,0 µL; gás carreador Hélio, 1,3 mL min⁻¹; Split inlet 1:100; temperatura do injetor e detector de 250° e 320° C, respectivamente. Programa de análise: 40° a 320° C, 4° C min⁻¹, tempo de espera 4 min; temperatura da linha de transferência: 250° C; ionização por impacto eletrônico a 70 eV. A quantificação dos constituintes foi realizada por CG-DIC no mesmo equipamento. Os parâmetros de análise foram os mesmos descritos para CG-EM, com injeção no modo Splitless, e temperaturas do injetor e detector ajustadas a 300° C.

Para a identificação dos constituintes foram utilizados dois parâmetros: as 10 primeiras substâncias sugeridas pelo banco de dados com modelo de fragmentação do espectro de massas semelhante ao do constituinte em análise (Nist Mass Spectral Search Program, versão 2.0), e, também, pela comparação do Índice de Kovats (IK) com o banco de dados do equipamento (NIST, 2010) e dados da literatura (ADAMS, 2009).

Análises da atividade alelopática

Espécies-alvo

Para a avaliação da atividade alelopática, foram utilizadas sementes das seguintes espécies de dicotiledôneas: alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar regina, picão-preto (*Bidens subalternans* DC.) e soja (*Glicine max* (L.) Merr.); já como espécies-alvo de monocotiledôneas foram selecionadas sementes de aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e arroz (*Oryza sativa* L.), representando, respectivamente, na ordem citada, dicotiledôneas e monocotiledôneas, espécie bioindicadora de alelopatia, planta daninha e cultura agrícola (FERREIRA e ÁQUILA, 2000; LORENZI, 2000; MOREIRA e BRAGANÇA, 2010; SANDERSON et al., 2013; SATYAL et al., 2013). As sementes de picão-preto foram coletadas no Campus da UFSM, Santa Maria-RS, em áreas

terraplanadas para construção (livres da aplicação de herbicidas), as de alface foram obtidas em casa de comércio, e as demais sementes foram obtidas junto a agricultores da região. Foram utilizados os lotes que apresentaram germinação em torno de 50% no teste prévio de germinação, realizado para cada espécie, antes da realização do experimento.

Bioensaios

As sementes das espécies-alvo, exceto as de alface que já possuíam tratamento contra microrganismos, foram desinfestadas seguindo metodologia adaptada de Rickli et al. (2011) e de Martinazzo-Portz e Müller (2009), conforme descrito a seguir. Inicialmente as sementes foram submersas em solução etanólica (70%) por dois minutos, com lavagem em água destilada, seguindo-se sua submersão em solução de hipoclorito de sódio (seis %) por cinco minutos, e nova lavagem. Logo após as sementes foram depositadas sobre papel toalha. As sementes de picão-preto foram submetidas ainda à escarificação mecânica em lixa abrasiva de textura fina, como método de superação de dormência, devido à ação do tegumento e para permitir a hidratação do embrião, com base na descrição de Adegas et al. (2003) para *B. pilosa*, espécie de morfologia e comportamento semelhante a *B. subalternans*. Na sequência, as sementes das espécies-alvo foram submetidas, separadamente, aos tratamentos, que consistiram na sua imersão em soluções de diferentes concentrações de OE (1, 5 e 15%) por 2 min.

As soluções, nas diferentes concentrações de OE dos dois grupos químicos avaliados, foram preparadas em béquer, através da diluição do OE pela adição de 0,1% de Tween 20[®], 0,9% de acetona e água destilada até completar o volume de 100 mL. O experimento foi composto por oito tratamentos, constituídos por aplicação de água destilada (T1), solução dos diluentes e água destilada (T2), soluções de OE do GQ2 (T3, T4 e T5), e soluções de OE do GQ5 (T6, T7 e T8), nas concentrações de 1, 5 e 15%, respectivamente. Logo após a imersão nas soluções, as sementes foram dispostas, em número de 25 por placa de petri de nove cm de diâmetro (cinco repetições), forrada com papel filtro entumescido com 2 mL de água destilada.

Os tratamentos foram acondicionadas em sacos plásticos e colocados em condições de ambiente controlado, conforme as necessidades de cada espécie indicadas pela literatura, para favorecer a germinação e o desenvolvimento das plântulas em câmara de germinação (B.O.D.). As sementes de aveia-preta foram incubadas a 20°C (± 2) com fotoperíodo de 24 h (SARTOR et al., 2009). Já as sementes das demais espécies foram incubadas a 25°C (± 2) com fotoperíodo de 12 h (BRASIL, 2009; FORTES et al., 2009; MAGIERO et al., 2009).

A contagem das sementes germinadas foi realizada diariamente, até o momento em que as plântulas apresentassem sinais de restrição ao seu crescimento dentro da placa de petri (necrose de folhas e radículas, amarelecimento das folhas, ataque de fungos, entre outros), com dias variando de cinco a sete dependendo da espécie. Foram mensuradas as variáveis porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento (cm) da parte aérea (CPA), radicular (CPR) e (CT). A %G foi obtida no último dia de contagem, momento em que as plantas foram seccionadas e os comprimentos total e das distintas partes foram mensurados (CPA, CPR e CT). O IVE foi obtido pela relação do número de plântulas germinadas em cada dia, segundo Maguire (1962): $IVE = N1/D1 + N2/D2 + \dots + NL/DL$, onde, N1; N2; NL = número de plântulas germinadas nas contagens sucessivas; e D1; D2; DL = número de dias, em relação ao início da germinação, relativos a cada contagem.

Análises estatísticas

A análise multivariada foi utilizada para os dados de cada espécie-alvo avaliada. Visando reduzir o número de variáveis, foi utilizada a Análise de Componentes Principais (ACP), a qual possibilitou a fusão das variáveis originais em variáveis sintéticas (componentes principais – CP), que capturam a maior porcentagem possível da variação total dos dados (LATTIN et al., 2011). A ACP foi realizada no software BioEstat 5.0. Os dados foram padronizados (divisão das repetições de cada variável por sua média geral para cada espécie), com a finalidade de eliminar as diferenças de escalas e unidades de medida.

As CP significativas foram utilizadas para obtenção de novos valores, aos quais foram aplicadas análises estatísticas não paramétricas na maioria dos casos. O teste de Kruskal-Wallis (MOORE e McCABE, 2002; SUSIN, 2009) foi também realizado no BioEstat 5.0. Já a ANOVA, foi realizado com o software Assistat 7.7 beta. Também foram realizadas análises de tendência em planilha eletrônica Excel[®], para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos (PRICHOA et al., 2013).

RESULTADOS

Análise de composição química dos OE

A análise da composição química dos OE obtidos de diferentes indivíduos de *N. megapotamica* (Tabela 1) resultou na confirmação de dois perfis químicos distintos descritos

por Amaral et al. (2014a, b), GQ2 e GQ5. Foi observada a predominância de monoterpenóides no OE do GQ2, bem como maior percentagem de sesquiterpenoides e fenilpropanoides no OE do GQ5.

Tabela 1 - Composição química dos OE de *N. megapotamica* classificados nos grupos químicos 2 e 5, obtidos de folhas coletadas em Santa Maria, RS, Brasil.

Constituintes	Classe	IK Experimental		IK Tab.	Fonte	%	
		GQ2	GQ5			GQ2	GQ5
α -Pinoeno	HM	935,65	934,14	930	N	21,09	16,14
Canfeno	HM	946,70	946,31	943	N	0,98	0,86
β -Pinoeno	HM	977,95	976,19	974	N	18,47	12,27
β -Mirceno	HM	989,87	989,59	991	N	1,24	1,73
NI	NI	---	1022,71	---	---	---	0,13
Limoneno	HM	1029,69	1028,33	1026	N	8,64	5,98
Eucaliptol	MO	---	1029,90	1029	N	---	0,45
β -E-Ocinemo	HM	1036,90	1036,69	1040	N	0,18	0,14
β -Z-Ocinemo	HM	1047,21	1047,08	1047	N	0,18	0,29
NI	NI	1128,86	1128,53	---	---	0,87	0,70
NI	NI	1196,37	---	---	---	0,49	---
NI	NI	1329,61	1329,61	---	---	0,55	1,01
α -Cubebeno	HS	1340,84	1341,12	1345	N	3,44	6,53
NI	NI	1351,68	---	---	---	0,20	---
β -Bourboneno	HS	1380,46	1379,16	1384	N	3,31	1,63
β -Cubebeno	HS	1388,12	1387,93	1391	N	0,26	0,41
β -Elemeno	HS	1393,26	1394,34	1392	N	1,07	1,75
NI	NI	1394,83	---	---	---	0,97	---
Cariofileno	SO	1424,99	1423,87	1420	N	5,25	4,72
τ -Elemeno	HS	1433,45	1433,26	1434	N	1,12	1,71
Allo-Aromadendreno	HS	---	1435,54	1434	N	---	0,29
NI	NI	1443,04	1442,88	---	---	0,38	0,51
NI	NI	1448,12	1447,93	---	---	0,44	0,71
α -Cariofileno	SO	1459,54	1457,80	1454	N	4,07	2,14
NI	NI	1464,72	1464,33	---	---	0,24	0,51
NI	NI	1466,61	1466,42	---	---	0,18	0,25
Germacreno D	HS	1482,08	1482,25	1483	N	2,49	4,28
α -Selineno	HS	1485,14	1485,08	1588	N	0,96	1,50
NI	NI	1495,66	1495,46	---	---	0,45	0,18
Biciclogermacreno	HS	1501,33	1501,36	1500	A	3,67	5,91
NI	NI	1508,38	---	---	---	0,18	---
Cubebol	SO	1518,27	1516,73	1515	A	0,51	0,30
Cadina-1(10),4-dieno	HS	1527,38	1525,64	1526	N	2,94	0,99

Tabela 1 continua na próxima página

Constituintes	Classe	IK Experimental		IK Tab.	Fonte	%	
		GQ2	GQ5			GQ2	GQ5
NI	NI	1546,52	---	---	---	0,23	---
NI	NI	1550,58	---	---	---	0,19	---
NI	NI	---	1489,93	---	---	---	0,35
NI	NI	1495,66	1495,46	---	---	0,45	0,18
Biciclogermacreno	HS	1501,33	1501,36	1500	A	3,67	5,91
NI	NI	1508,38	---	---	---	0,18	---
Cubebol	SO	1518,27	1516,73	1515	A	0,51	0,30
Cadina-1(10),4-dieno	HS	1527,38	1525,64	1526	N	2,94	0,99
NI	NI	1546,52	---	---	---	0,23	---
NI	NI	1550,58	---	---	---	0,19	---
Elemicina	F	1557,28	1558,82	1558	N	0,21	2,24
<i>E</i> -Nerolidol	SO	1565,91	1566,47	1563	A	0,61	2,55
<i>E</i> -Isoelimicina	F	1572,23	1572,13	1570	A	0,27	0,33
Espatulanol	SO	1586,90	1584,81	1588	N	5,42	5,00
Globulol	SO	1591,02	1590,29	1585	N	1,31	1,19
Viridiflorol	SO	1598,39	1598,22	1595	N	0,69	1,00
NI	NI	1605,19	1605,15	---	---	0,19	0,75
NI	NI	1610,16	1609,68	---	---	0,54	0,51
NI	NI	1616,00	1615,52	---	---	0,43	0,25
<i>Z</i> -Asarona	F	---	1621,94	1617	A	---	0,50
NI	NI	1624,59	1624,41	---	---	0,32	0,31
1- <i>epi</i> -Cubenol	SO	1629,05	1629,02	1628	A	0,18	0,32
NI	NI	1633,12	1632,83	---	---	0,28	0,18
τ -Cadinol	SO	1643,74	1643,20	1642	N	0,32	0,38
τ -Muurolol	SO	1645,99	1646,06	1652	N	0,70	0,44
NI	NI	1651,07	---	---	---	0,25	---
NI	NI	1652,96	---	---	---	0,17	---
4,6-Dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido	F	---	1655,93	1654	A	---	5,04
NI	NI	1659,92	1659,81	---	---	0,50	0,66
NI	NI	1670,44	1670,40	---	---	0,46	0,37
NI	NI	---	1676,24	---	---	---	0,13
<i>E</i> -Asarona	F	1682,55	1681,57	1676	A	0,40	1,11
NI	NI	---	1691,95	---	---	---	0,54
NI	NI	---	1720,39	---	---	---	0,53
NI	NI	---	1749,09	---	---	---	0,31
NI	NI	1753,85	1753,20	---	---	0,61	0,57
NI	NI	1786,24	1785,71	---	---	0,47	0,41
NI	NI	1794,21	---	---	---	0,31	---
NI	NI	1842,80	---	---	---	0,16	---
Total Identificado/Classes de Substâncias						89,95	90,13
Hidrocarbonetos Monoterpênicos (HM)						50,78	37,41
Monoterpenóides Oxigenados (MO)						0,00	0,45

Tabela 1 continua na próxima página

Classes de Substâncias	GQ2	GQ5
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos (HS)	19,25	25,00
Sesquiterpenóides Oxigenados (SO)	19,05	18,04
Fenilpropanoides (F)	0,88	9,23
Não Identificados (NI)	10,05	9,87
TOTAL	100,00	100,00

Legenda: IK - Índice de Kovatz; Tab. - tabelado; GQ - grupo químico; N – NIST (2010); A – Adams (2009).

Análise da atividade alelopática

As espécies-alvo, quando submetidas aos OE de *N. megapotamica* classificados nos GQ 2 e 5, principalmente nas maiores concentrações, apresentaram menores médias para as variáveis percentagem de germinação, velocidade de emergência, bem como para os comprimentos das partes aérea, radicular e total (Tabela 2).

A ACP propiciou a obtenção de CP significativas para as variáveis mensuradas em cada espécie-alvo submetida aos OE, mediante a fusão das mesmas. As CP1 apresentaram autovalores maiores que 1 e contém mais de 70% da variância total dos dados, exceto para o arroz que se aproximou dessa percentagem (Tabela 3). Com as equações obtidas na ACP foram calculados os valores das respectivas CP1 para os dados de cada repetição dos tratamentos empregados em sementes de espécies-alvo, e posteriormente foram realizadas as análises estatísticas.

Tabela 2 - Valores médios das variáveis mensuradas nas espécies-alvo para atividade alelopática dos OE de *N. megapotamica*.

Trat.	Var.	A	PP	SJ	AP	AZ	ARZ
T1	%G	97,60 ±4,44	54,40 ±9,02	99,20 ± 2,22	48,00 ±28,10	80,00 ±16,09	91,20 ±6,48
	IVE	17,12 ±3,24	3,92 ±1,04	25,90 ±0,70	3,52 ±2,32	14,29 ±3,44	37,49 ±3,39
	CPA	0,94 ±0,15	1,39 ±0,47	3,51 ±0,44	5,81 ±1,52	4,58 ±1,48	3,61 ±0,44
	CPR	3,53 ±0,20	2,28 ±1,28	5,26 ±1,13	3,24 ±0,73	5,80 ±2,15	7,90 ±0,81
	CT	4,47 ±0,33	3,67 ±1,70	8,77 ±1,40	9,06 ±2,15	10,38 ±3,62	11,51 ±1,06
T2	%G	100,00 ±0,00	45,60 ±9,02	91,20 ±11,33	55,20 ±31,49	80,80 ±16,25	100,00 ±0,00
	IVE	14,31 ±2,34	3,35 ±0,78	23,49 ±3,96	4,30 ±2,67	13,48 ±2,30	42,23 ±0,45
	CPA	0,95 ±0,29	1,70 ±0,29	3,10 ±0,78	6,69 ±1,63	4,31 ±0,79	3,57 ±0,54
	CPR	3,37 ±0,42	2,21 ±0,35	4,65 ±2,68	3,56 ±0,97	5,46 ±0,60	6,27 ±1,65
	CT	4,32 ±0,30	3,91 ±0,57	7,75 ±3,46	10,25 ±1,82	9,77 ±1,29	9,84 ±1,97

Tabela 2 contínua na próxima página

Trat.	Var.	A	PP	SJ	AP	AZ	ARZ
T3	%G	98,40 ±2,72	44,00 ±20,48	84,80 ±16,25	18,40 ±19,43	72,00 ±12,17	88,80 ±6,48
	IVE	11,89 ±1,00	2,72 ±1,29	22,25 ±3,93	1,22 ±1,19	9,65 ±2,46	37,43 ±2,78
	CPA	0,92 ±0,20	1,28 ±0,33	2,66 ±0,59	1,26 ±0,96	3,51 ±0,67	3,74 ±0,69
	CPR	3,09 ±1,46	2,25 ±0,96	3,75 ±1,83	0,55 ±0,96	3,87 ±0,88	7,25 ±2,74
	CT	4,01 ±1,41	3,53 ±1,23	6,41 ±2,38	1,81 ±2,81	7,38 ±1,32	10,99 ±3,35
T4	%G	98,40 ±4,44	24,00 ±7,02	100,00 ±0,00	4,00 ±4,97	58,40 ±15,94	80,80 ±13,78
	IVE	8,20 ±0,79	1,33 ±0,51	25,96 ±0,87	0,35 ±0,34	5,32 ±0,94	33,75 ±6,21
	CPA	0,84 ±0,05	0,89 ±0,38	2,15 ±0,11	0,04 ±0,14	2,84 ±4,91	4,29 ±0,48
	CPR	3,28 ±0,47	1,45 ±1,04	5,67 ±0,55	0,08 ±0,14	2,04 ±0,81	5,17 ±1,94
	CT	4,12 ±0,51	2,34 ±1,38	7,82 ±6,63	0,12 ±0,14	4,88 ±4,38	9,46 ±2,38
T5	%G	76,00 ±19,24	2,40 ±2,72	74,40 ±22,65	0,00 ±0,00	39,20 ±15,06	73,60 ±15,55
	IVE	4,94 ±1,22	0,10 ±0,11	18,60 ±4,32	0,00 ±0,00	2,17 ±1,19	29,55 ±6,06
	CPA	0,33 ±0,04	0,24 ±0,42	1,18 ±0,51	0,00 ±0,00	1,07 ±1,14	3,79 ±0,77
	CPR	1,30 ±0,52	0,12 ±0,14	1,64 ±1,34	0,00 ±0,00	1,77 ±1,36	3,97 ±1,38
	CT	1,63 ±0,53	0,36 ±0,52	2,82 ±1,69	0,00 ±0,00	2,85 ±1,53	7,76 ±2,06
T6	%G	100,00 ±0,00	38,40 ±27,34	100,00 ±0,00	2,40 ±4,44	77,60 ±6,66	91,20 ±9,55
	IVE	11,79 ±2,41	2,28 ±1,73	25,86 ±0,77	0,16 ±0,27	11,59 ±1,50	37,33 ±4,76
	CPA	0,52 ±0,10	1,03 ±0,46	3,27 ±0,32	1,01 ±2,41	4,16 ±0,36	2,41 ±0,71
	CPR	3,60 ±0,50	1,79 ±1,29	5,78 ±3,04	0,36 ±1,00	4,93 ±1,02	4,95 ±1,47
	CT	4,12 ±0,59	2,82 ±1,71	9,05 ±8,02	1,37 ±3,40	9,09 ±0,96	7,36 ±2,06
T7	%G	98,40 ±2,72	14,40 ±7,53	85,60 ±18,78	0,00 ±0,00	62,40 ±27,56	94,40 ±8,31
	IVE	9,99 ±0,64	0,67 ±0,31	21,16 ±5,57	0,00 ±0,00	4,27 ±2,04	40,11 ±1,65
	CPA	0,57 ±0,08	0,81 ±0,27	2,00 ±0,18	0,00 ±0,00	1,34 ±0,90	3,43 ±0,17
	CPR	2,58 ±0,53	1,24 ±0,78	4,79 ±1,46	0,00 ±0,00	1,72 ±1,31	7,26 ±2,78
	CT	3,15 ±0,53	1,91 ±1,05	6,78 ±3,59	0,00 ±0,00	3,06 ±1,79	10,68 ±2,91
T8	%G	53,60 ±25,95	0,00 ±0,00	90,40 ±13,87	0,00 ±0,00	11,20 ±6,48	77,60 ±9,68
	IVE	3,66 ±1,78	0,00 ±0,00	23,49 ±2,71	0,00 ±0,00	0,69 ±0,22	28,25 ±3,88
	CPA	0,30 ±0,04	0,00 ±0,00	1,60 ±0,13	0,00 ±0,00	0,85 ±0,80	1,33 ±0,43
	CPR	0,88 ±0,44	0,00 ±0,00	3,85 ±0,79	0,00 ±0,00	0,65 ±0,55	2,07 ±1,39
	CT	1,18 ±0,46	0,00 ±0,00	5,45 ±0,69	0,00 ±0,00	1,50 ±1,34	3,39 ±1,69

Legenda: Trat. – tratamentos; T1 – água destilada; T2 – diluentes e água destilada; T3, T4 e T5 – óleo essencial do grupo químico 2 a 1, 5 e 15%; T6, T7 e T8 – óleo essencial do grupo químico 5 a 1, 5 e 15%; Var. - variáveis; A - alface; PP - picão-preto; SJ - soja; AP - aveia-preta; AZ - azevém; ARZ - arroz; %G - % germinação; IVE - índice de velocidade de emergência; CPA - comprimento da parte aérea; CPR - comprimento da parte radicular; CT - comprimento total; ± intervalo de confiança – p0,05.

Para o fator grupo químico (GQ2 e GQ5), foram observadas diferenças estatísticas significativas na comparação das variáveis com os dados dos controles T1 (água destilada) e T2 (diluente). Os menores valores para as CP1 obtidas demonstram a atividade alelopática do OE de

folhas frescas de *N. megapotamica*, caracterizada pela inibição da germinação e do desenvolvimento de plântulas (Figura 1).

A Figura 1 apresenta as comparações realizadas entre o GQ2 (letras minúsculas) e GQ5 (letras maiúsculas) em relação aos demais tratamentos. As diferenças mais acentuadas foram observadas para as espécies aveia-preta e azevém (ambas monocotiledôneas, espécies consideradas bioindicadora e planta daninha, respectivamente), e também para picão-preto (planta daninha dicotiledônea). Já alface, soja e arroz (planta bioindicadora e culturas agrícolas, dicotiledôneas e monocotiledônea, respectivamente) foram as espécies menos afetadas pelo OE. A estatística H obtida pelo teste de Kruskal-Wallis para as espécies dicotiledôneas foram de 19,37 (p0,0002), 14,95 (p0,0019) e 8,77 (p0,0325), respectivamente para as espécies alface, picão-preto e soja. Já para as espécies monocotiledôneas, as estatísticas H obtidas foram de 24,83 (p<0,0001), 18,11 (p0,0004) e 9,67 (p0,0216), respectivamente para aveia preta, azevém e arroz.

Tabela 3 - Componente principal 1 obtida para a atividade alelopática dos OE de *N. megapotamica* sobre a germinação e desenvolvimento das espécies-alvo avaliadas.

		A	PP	SJ	ARZ	AP	AZ
Autovalor		4,08	4,47	3,92	3,33	4,64	4,09
% Total da Variância		81,62	89,39	78,48	66,56	92,86	81,76
Contribuição das Variáveis	G%	0,19	0,19	0,19	0,15	0,19	0,16
	IVE	0,20	0,19	0,21	0,20	0,19	0,23
	CPA	0,17	0,20	0,16	0,14	0,20	0,17
	CPR	0,22	0,20	0,21	0,25	0,21	0,21
	CT	0,23	0,21	0,23	0,26	0,21	0,23
Equações para obtenção da CP	CP1_A = (0,4321G%)+(0,4424IVE)+(0,4116CPA)+(0,4649CPR)+(0,4817CT)						
	CP1_PP = (0,4395G%)+(0,4413IVE)+(0,4477CPA)+(0,4483CPR)+(0,4590CT)						
	CP1_SJ = (0,4347G%)+(0,4557IVE)+(0,3995CPA)+(0,4603CPR)+(0,4815CT)						
	CP1_AP = (0,3893G%)+(0,4458IVE)+(0,3804CPA)+(0,4988CPR)+(0,5061CT)						
	CP1_AZ = (0,4382G%)+(0,4405IVE)+(0,4498CPA)+(0,4533CPR)+(0,4540CT)						
CP1_ARZ = (0,4025G%)+(0,4770IVE)+(0,4169CPA)+(0,4537CPR)+(0,4805CT)							
Legenda: A - alface; PP - picão-preto; SJ - soja; AP - aveia-preta; AZ - azevém; ARZ - arroz; G% - germinação (%); IVE - índice de velocidade de emergência; CPA - comprimento da parte aérea (cm); CPR - comprimento da parte radicular (cm); CT - comprimento total (cm).							

Para o fator concentração (1, 5 e 15%), a análise estatística também indicou a existência de diferenças na atividade alelopática dos OE avaliados em relação aos controles (T1 e T2), principalmente para as concentrações mais altas (Figura 2). As espécies alface, soja, azevém e

arroz foram analisadas por ANOVA, cujas respectivas estatísticas $F(p<0,001)$ foram de 72,61, 7,12, 69,27 e 10,28, todas superiores ao F crítico de 3,91. As espécies picão-preto e aveia-preta foram avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis, cujas estatísticas H foram respectivamente de 30,82 ($p<0,0001$) e 28,03 ($p<0,0001$).

Novamente observa-se que as espécies mais afetadas pela atividade alelopática dos OE foram aveia-preta, picão-preto e azevém, enquanto que as espécies menos afetadas foram alface, soja e arroz. A concentração mais ativa foi a de 15% para o OE de ambos os grupos químicos avaliados. De maneira geral, houve um decréscimo nos valores das CP1 com o aumento na concentração do OE, o que indica atividade alelopática.

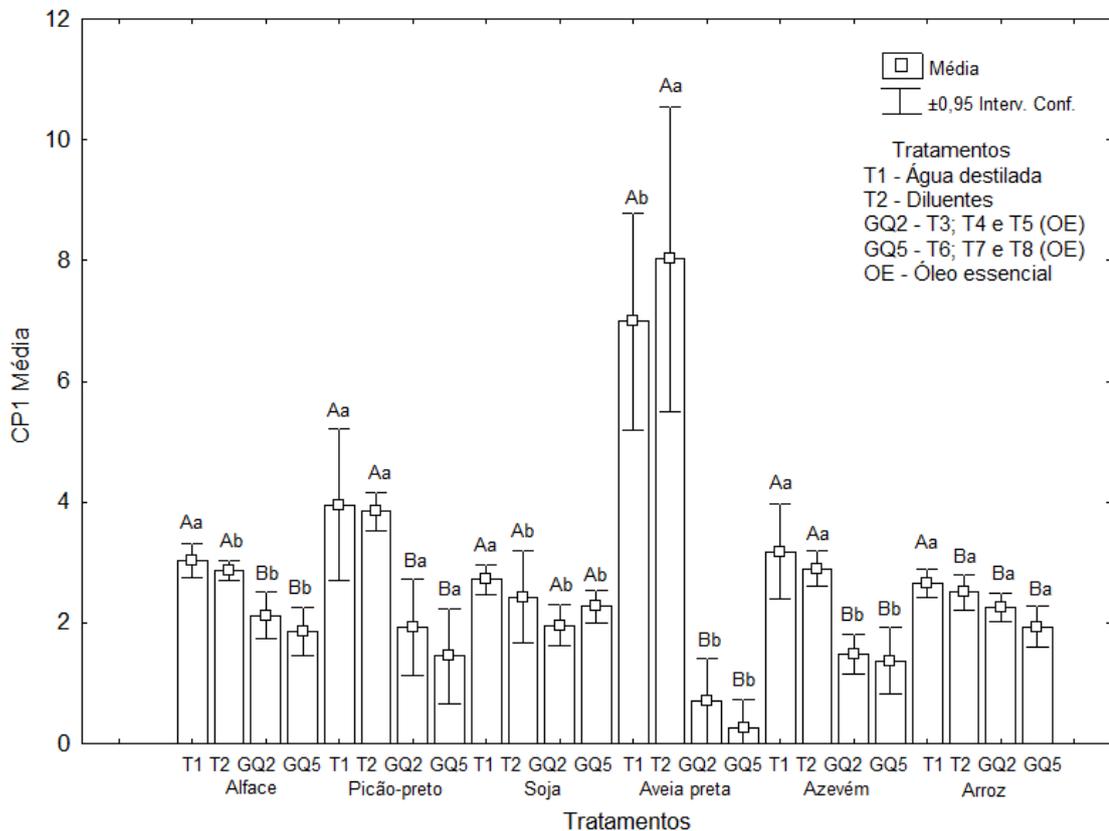


Figura 1 - Atividade alelopática do OE de *N. megapotamica* para o fator grupo químico.

Legenda: Teste de Dunn ($p0,05$) - letras maiúsculas: comparação entre GQ5 e demais tratamentos para cada espécie avaliada; Letras minúsculas: comparação entre GQ2 e demais tratamentos para cada espécie avaliada; Letras diferentes: diferença estatística significativa.

Quanto às análises de tendência realizadas, as mesmas demonstram a relação concentração versus efeito alelopático do OE, mas também indicam que os fatores grupo químico e concentração influenciaram de forma diferenciada a germinação e o desenvolvimento de plântulas de algumas espécies (Figura 3.A e 3.B). As espécies dicotiledôneas soja e alface (cultura e espécie bioindicadora) apresentaram-se menos suscetíveis em relação ao picão-preto (espécie indesejável/infestante), que foi mais afetada pelo OE, sem distinção dos grupos químicos (Figura 3.A). Aparentemente, a diferença de atividade entre os dois grupos químicos pode ser observada apenas na concentração de 15% de OE quando aplicado na soja, em que o GQ2 apresentou maior atividade alelopática (Figura 3.A).

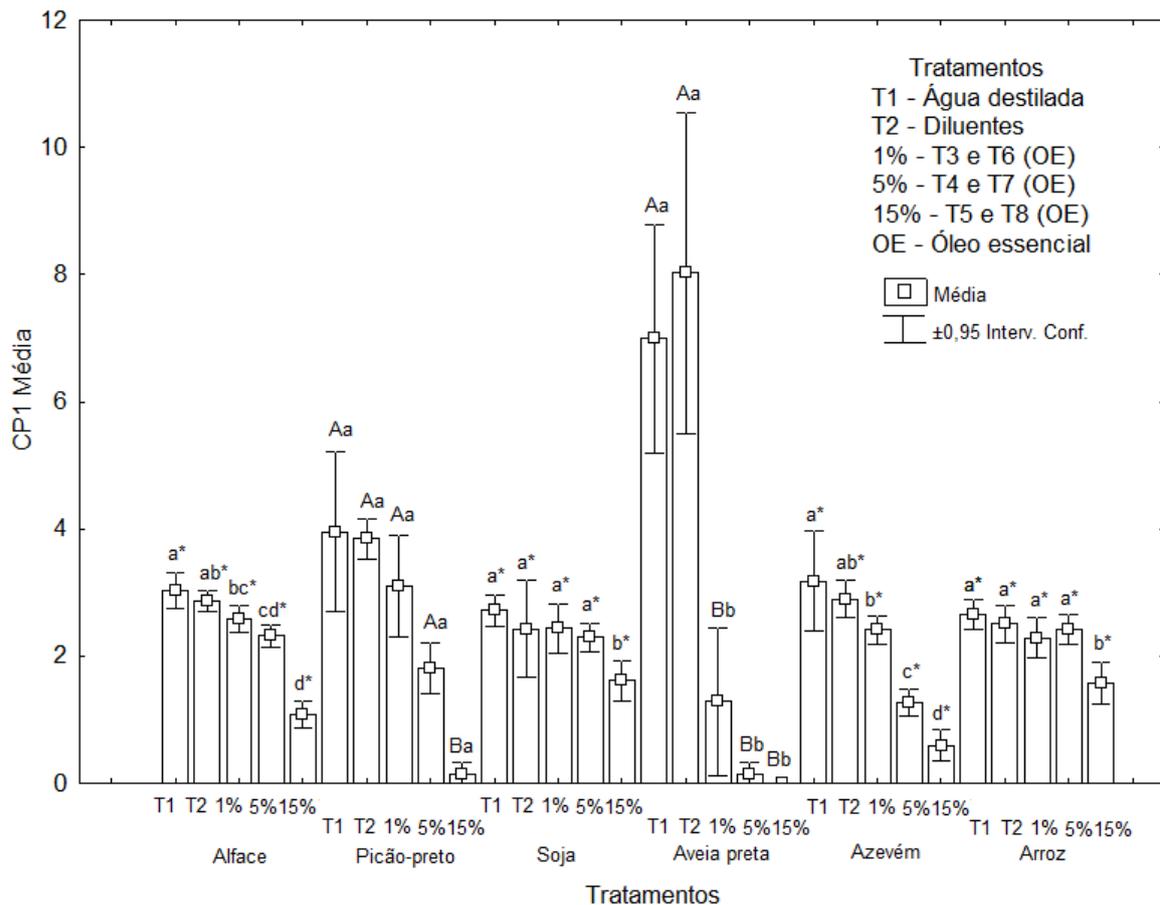


Figura 2 - Atividade alelopática do OE de *N. megapotamica* para o fator concentração.

Legenda: Teste de Dunn (p0,05) - letras maiúsculas: comparação entre 15% de OE e demais tratamentos para cada espécie avaliada; Letras minúsculas: comparação entre 5% de OE e demais tratamentos para cada espécie avaliada; Letras com asterístico: ANOVA – Teste de Tukey (p0,05); Letras diferentes: diferença estatística significativa.

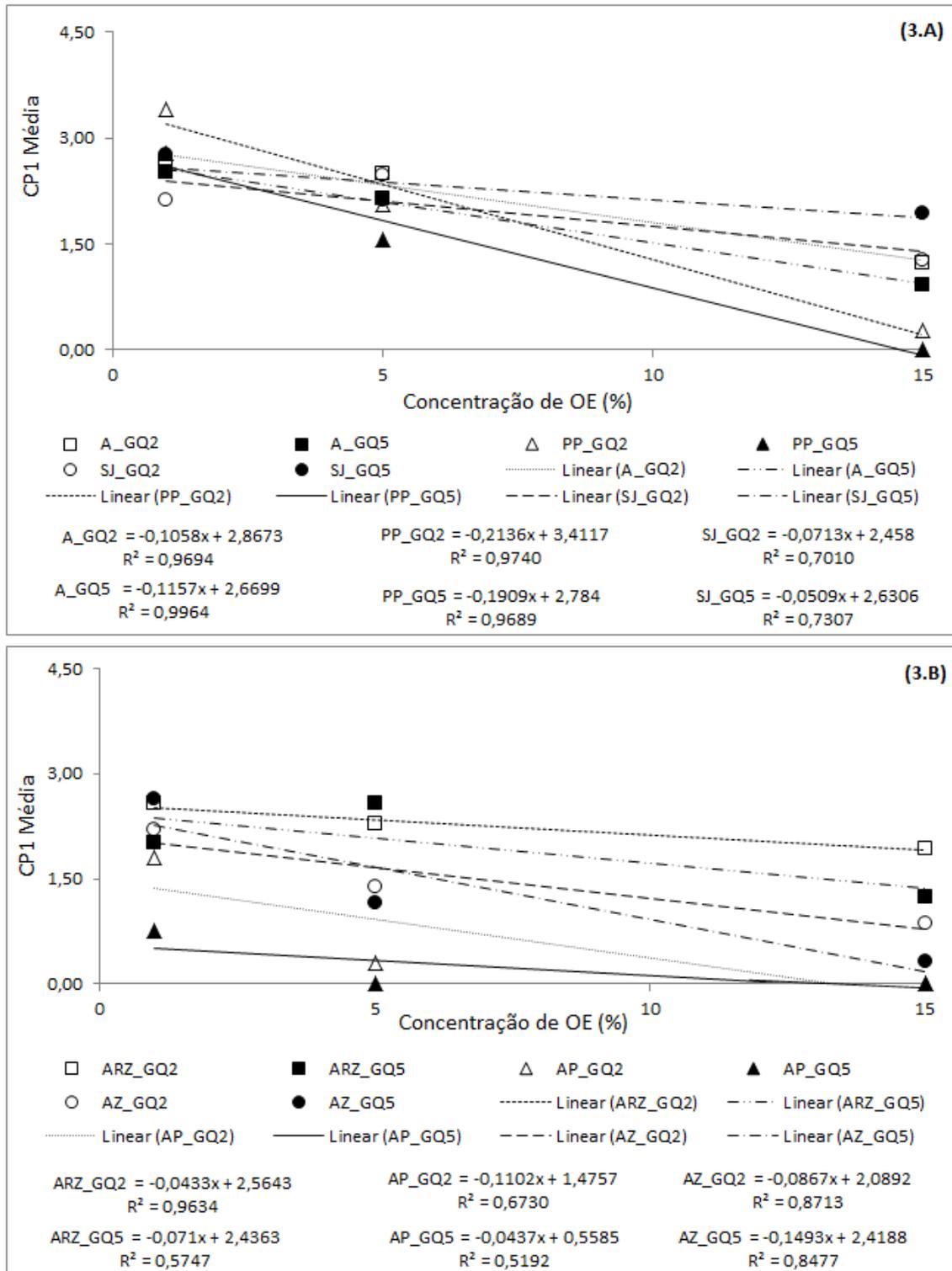


Figura 3 - Análise de tendências para as CP1 média das espécies dicotiledôneas (3.A) e monocotiledôneas (3.B) submetidas à ação alelopática dos OE de *N. megapotamica*.

Legenda: A – alfaxe; PP – picão-preto; SJ – soja; ARZ – arroz; AP – aveia-preta; AZ – azevém; GQ2 – grupo químico 2; GQ5 – grupo químico 5; R^2 – coeficiente de determinação.

Quanto às espécies monocotiledôneas, a aveia-preta foi a espécie mais suscetível, uma vez que pode ser observado já na concentração 1% atividade alelopática para o OE do GQ5, e por ter sua germinação totalmente inibida a 15% de OE de ambos os grupos avaliados (Tabela 2, Figura 3.B). Por outro lado, a análise de tendência indica que o azevém (planta daninha) foi mais suscetível em relação ao arroz (cultura), e novamente observa-se uma possível diferença entre os dois grupos químicos avaliados na concentração 15% frente às duas espécies.

A análise dos tratamentos utilizados confirma a concentração 15% como a mais efetiva quanto à atividade alelopática (Figura 4), sendo possível comparar os grupos químicos nesta concentração. As espécies soja e arroz foram analisadas por ANOVA, as estatísticas F ($p < 0,001$) foram respectivamente de 52,09 e 13,31, superiores ao F crítico de 3,26. As espécies picão-preto, soja, aveia-preta e azevém foram avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis, cujas estatísticas H foram respectivamente de 31,61 ($p < 0,0001$), 22,78 ($p < 0,0019$), 32,53 ($p < 0,0001$) e 35,73 ($p < 0,0001$). Nesta análise foi observada diferença significativa entre o GQ2 e GQ5 para o teste realizado com o arroz na concentração 15%, em que este último apresentou maior atividade alelopática (Figura 4). Foi observado, também, um estímulo à germinação e ao desenvolvimento das plântulas por parte dos diluentes (T2) para aveia-preta.

A comparação das espécies-alvo monocotiledôneas e dicotiledôneas indica que as primeiras foram as mais afetadas pela atividade alelopática dos OE. A estatística H foi de 96,80 ($p < 0,0001$), e as CP1 médias foram de 1,93 (A) e 1,34 (B), respectivamente para espécies dicotiledôneas e monocotiledôneas.

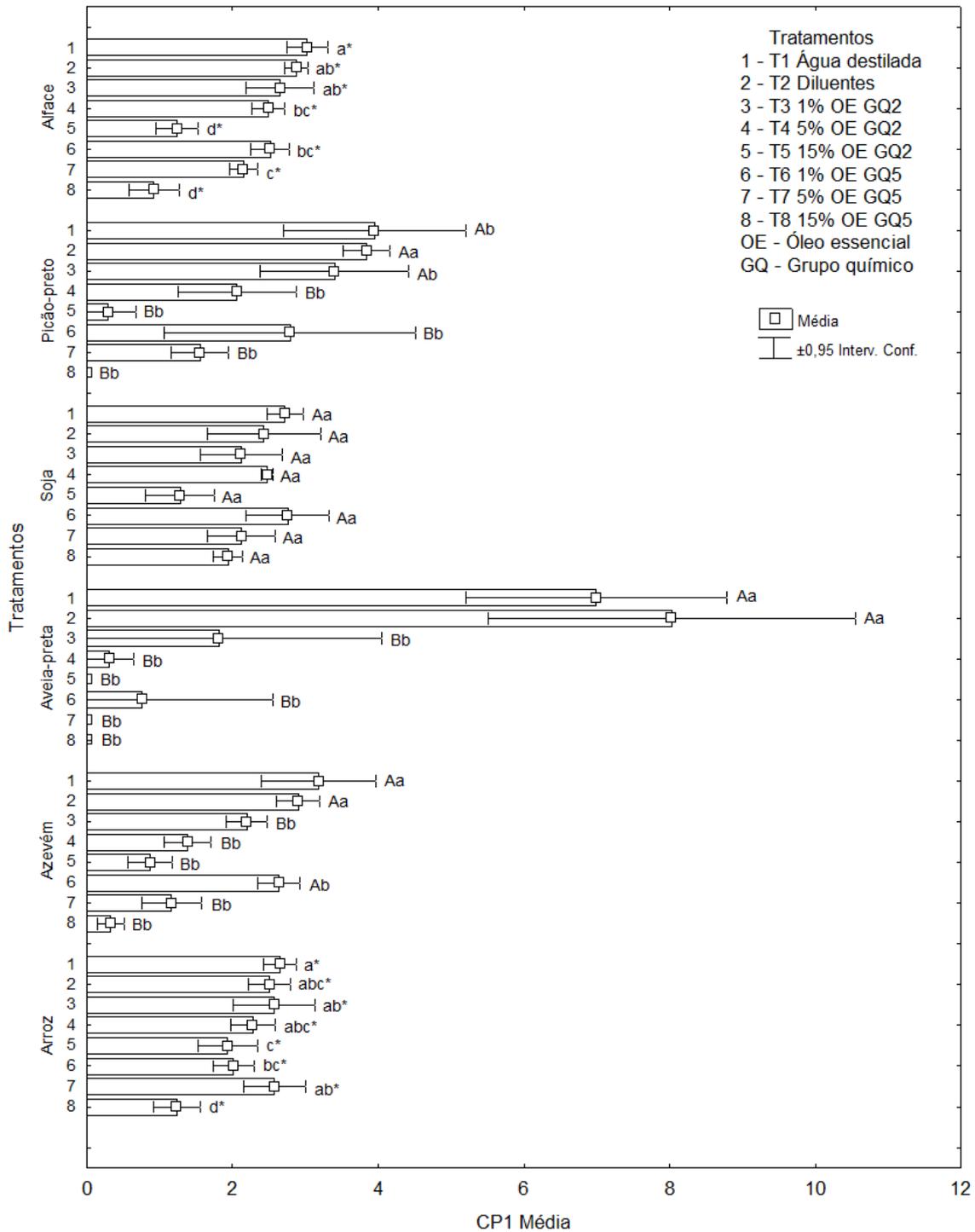


Figura 4 - Atividade alelopática do OE de *N. megapotamica* para os tratamentos empregados.

Legenda: Teste de Dunn $p(0,05)$ - letras maiúsculas: comparação entre T8 e os demais tratamentos para cada espécie avaliada; Letras minúsculas: comparação entre T5 e os demais tratamentos para cada espécie avaliada; Letras com asterístico: ANOVA – Teste de Tukey ($p(0,05)$); Letras diferentes: diferença estatística significativa.

DISCUSSÃO

O presente trabalho aborda o uso de óleos essenciais de *N. megapotamica* para o controle de plantas daninhas, mediante sua atividade alelopática, o que pode torná-lo uma fonte de moléculas bioativas para um possível herbicida natural, desde que não iniba o desenvolvimento das culturas agrícolas com a mesma magnitude que a observada sobre as plantas daninhas ou bioindicadoras. O uso prolongado de herbicidas comerciais acarretou na formação de gerações de plantas daninhas resistentes aos seus constituintes ativos. O azevém (*Lolium multiflorum*), introduzido no sul do Brasil é um exemplo típico de planta indesejável em algumas situações. Esta espécie foi trazida do sul da Europa, como forragem de inverno e/ou para a formação de palha no sistema de plantio direto. Após algum tempo sob controle de herbicidas comerciais, a exemplo daqueles à base de glifosato, adquiriu resistência, e constitui, hoje, um problema nas culturas de trigo, milho e soja (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2007; GALLI, 2009; MOREIRA e BRAGANÇA, 2010).

Existem, também, espécies nativas, de ampla ocorrência e com alta capacidade de infestação em lavouras, que desenvolveram resistência aos herbicidas comerciais inibidores das enzimas acetolactatosintase - ALS, como é o caso do picão-preto (*Bidens subalternans*) (GAZZIERO et al., 2003). Esta espécie faz parte de um conjunto de plantas muito agressivas quanto ao potencial de infestação, comumente encontradas nas lavouras do Centro-Sul do Brasil e, juntamente com *Bidens pilosa*, formam, geralmente, densas infestações e são, também, hospedeiras de algumas pragas. Desta forma, além da competição com as culturas agrícolas, podem, igualmente, constituir vetores de doenças (LORENZI, 2000; MOREIRA e BRAGANÇA, 2010).

Os resultados obtidos nos testes realizados mostram o efeito alelopático de dois perfis químicos do OE de *N. megapotamica*, que apresentaram forte inibição na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas em aveia-preta, picão-preto e azevém, bem como menor efeito para alface, soja e arroz, mediante o comportamento de resposta exibido pelas CP1 médias dos tratamentos realizados para cada espécie. Foi observado, também, maior efeito alelopático do OE do GQ5 em relação ao do GQ2 para o teste realizado com arroz. Esses resultados são dependentes da composição química apresentada pelos OE utilizados, também retratada neste trabalho.

O uso do detector por ionização em chama permitiu a detecção de traços da classe dos fenilpropanoides também no GQ2, não observados por Amaral et al. (2014b), que utilizaram análises por CG-EM. Este fato não elimina as diferenças entre as composições químicas dos

OE avaliados, apenas diminui a dissimilaridade entre os mesmos. As composições químicas do OE dos grupos químicos 2 e 5 apresentaram algumas diferenças quanto aos teores de monoterpenoides, sesquiterpenoides e de fenilpropanoides, que podem configurar diferentes fenótipos para o OE da espécie em questão. Alguns autores, a exemplo de Torres et al. (2014), sugeriram a ocorrência de quimiotipos e/ou ecotipos para o OE de *N. megapotamica*, devido a diferenças na composição química de OE obtidos em distintos locais de coleta. Já Amaral et al. (2014) observaram a ocorrência de quimiotipos dentro de uma mesma população de *N. megapotamica* em Santa Maria, RS, Brasil, indicando que a variabilidade para a espécie é maior do que aquela anteriormente relatada.

A ação alelopática do OE de folhas frescas de *N. megapotamica* neste trabalho não surpreende, uma vez que na literatura existem vários trabalhos que citam o efeito inibitório do OE de diversas espécies sobre a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas (SOUZA FILHO et al., 2006, 2009; KAUR et al., 2010; SATYAL et al., 2013), bem como para a diferenciação desta atividade devido à existência de quimiotipos para os OE (KOMAI et al., 1991; SAHARKHIZ et al., 2010; ANDRIANJAFINANDRASANA et al., 2013). Segundo Miller (1996), a atividade alelopática pode ser autotóxica (inibição da germinação das sementes e do crescimento de plântulas da própria espécie produtora de aleloquímicos) ou heterotóxica (ação inibitória sobre sementes e plântulas de outras espécies). Este estudo abrangeu apenas a avaliação da atividade alelopática heterotóxica dos OE de *N. megapotamica*. Para tanto, foram escolhidas espécies mono e dicotiledôneas consideradas bioindicadoras, daninhas e culturas agrícolas, para avaliar o potencial do OE desta espécie arbórea nativa, abundante nas florestas do sul do Brasil e que também ocorre em outros países sul-americanos, visando obter um produto natural que auxilie na resolução dos problemas na agricultura e que possa, também, configurar fonte de geração de renda. Outro ponto que, igualmente, foi considerado, é o menor impacto ambiental para o controle de plantas daninhas, que pode ser obtido com o uso de produtos naturais como os OE (OOTANI et al., 2013), que, geralmente, são menos nocivos à saúde humana e animal.

A variabilidade da atividade alelopática dos OE de ambos os grupos químicos sobre as espécies-alvo era esperada e foram de acordo com os relatos da literatura. Os OE de *N. megapotamica* comportaram-se de forma similar ao OE de *Ravensara aromatica* (Lauraceae), com ação alelopática variada sobre as espécies de plantas avaliadas (ANDRIANJAFINANDRASANA et al., 2013). Neste trabalho foi, também, possível observar a ação diferenciada de quimiotipos de OE de uma espécie da família Lauraceae, a

exemplo da observada no teste realizado com arroz. No trabalho acima citado, os autores observaram que o quimiotipo limoneno apresentou menor atividade alelopática em relação ao quimiotipo sabineno, que mostrou maior efeito fitotóxico na germinação de sementes e crescimento de plântulas desta espécie-alvo. Outro comportamento semelhante foi a menor suscetibilidade apresentada pelo arroz, frente ao OE de uma espécie da família Lauraceae, em relação a outras espécies.

Segundo Maraschin-Silva (2004) os metabólitos secundários de plantas podem prejudicar a assimilação de água, captação de nutrientes, síntese de proteínas e os processos bioquímicos da germinação. Os mesmos possuem diferentes modos de interação e ação com sítios ativos envolvidos na germinação de sementes, no crescimento de plantas, nas atividades de respiração celular nas mitocôndrias e na cadeia de transporte de elétrons no processo da fotossíntese (CÉSPEDES et al., 2000; CÉSPEDES et al., 2006).

Possivelmente os resultados obtidos foram decorrentes da ação sinérgica das classes de constituintes presentes no OE de *N. megapotamica*, uma vez que diversos de seus representantes apresentam ação alelopática (KING e AMBIKA, 2002; DE MARTINO et al., 2010). Deste modo, é difícil apontar um agente específico para a atividade alelopática observada no presente trabalho, ou determinar o local de sua ação. Porém, dentre as classes de compostos presentes nos OE utilizados, a dos monoterpenoides é a que possui mais registros de substâncias com a ação alelopática descrita na literatura (SINGH et al., 2002; KORDALI et al., 2007; DE MARTINO et al., 2010). Segundo Sikkema et al. (1995), as funções das membranas celulares podem ser alteradas por interações como monoterpenos de hidrocarboneto cíclico, que podem impedir o crescimento e a atividade celular, eventos necessários para ocorrer a germinação de sementes. Nishida et al. (2005) relatam que os monoterpenóides oxigenados podem causar redução de algumas organelas celulares como as mitocôndrias, acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma, provavelmente devido a inibição da síntese de DNA ou ruptura de membranas.

Os monoterpenoides α e β -pineno, limoneno, presentes com consideráveis teores nos OE avaliados (48,20 % no GQ2 e 34,39 % no GQ5), além do canfeno, linalol, timol, carvacrol, 1,8-cineol, cânfora, dentre outros, já tiveram atividade alelopática descrita na literatura (VOKOU et al., 2003; ANGELINI et al., 2003; KORDALI et al., 2007; MARCO et al., 2012; SATYAL et al., 2013). Já Komai et al. (1991) apontam maior atividade alelopática para OE de quimiotipos de *Cyperus rotundus* constituídos, principalmente, por

sesquiterpenoides que continham o grupo acetato ou hidroxila. Wang et al. (2009) relataram o efeito alelopático do (*E*)-cariofileno sobre *Brassica campestris* e *Raphanus sativus*.

Por outro lado, as substâncias fenólicas ou derivados do ácido cinâmico foram descritas por Rice (1984) como inibidoras de germinação e de crescimento de plantas. Sabidamente, estes são precursores da síntese de fenilpropanoides e de uma série de outros metabólitos como ligninas, esteroides e aminoácidos (VOGOT, 2010). Representantes desta classe totalizaram 9,23 % no OE do GQ5 e ocorrem apenas em traços no GQ2. Os fenilpropanoides podem inibir o transporte de elétrons nos cloroplastos, a exemplo do 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benzeno e do éster metílico do ácido 3,4-dihidroxi-*E*-cinâmico (CÉSPEDES et al., 2000; LATINA-HENNSEN et al., 2006). O primeiro composto possui semelhança estrutural com as moléculas de *Z*- e *E*-asarona, e 4,6-dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido, todas observadas em maiores porcentagens no OE do GQ5.

No entanto, Demarque e Baroni (2009) sugerem a retirada de grupos doadores de elétrons presentes nos fenilpropanoides, como as metoxilas ligadas ao anel aromático, e o alongamento de sua cadeia carbônica lateral, visando favorecer o encaixe de moléculas aos receptores (Teoria de Farrimond). Essa modificação estrutural configuraria uma distância mínima entre cargas positivas e negativas (0,50 nm), o que conduziria a uma maior atividade e favorecimento do efeito fitotóxico. Segundo os autores, uma molécula ativa seria aquela com maior densidade de cargas positivas no anel aromático e que tenha uma cadeia lateral com grupos eletronegativos. No estudo realizado por estes autores foi utilizado, como base para alongamento da cadeia lateral, o fenilpropanoide 2,4,5-trimetoxibenzaldeído obtido de *Duguetia furfuracea*. A partir deste foram obtidos os ácidos 2-(2,4,5-trimetoxifenoxi) acético, 2-(2,4,5-trimetoxifenoxi) propanóico e 3-(4-hidroxifenil) propanóico, dentre outros, consideradas moléculas otimizadas e com potencial para desenvolver ação auxínica ou de inibição de germinação (ação herbicida). Estes resultados com derivados de estrutura fenilpropanoide podem ser uma possível explicação para a diferenciação estatística entre os efeitos alelopáticos apresentados pelos OE dos dois perfis químicos distintos, em favor do OE do GQ5, principalmente no teste realizado com arroz. A diferença tênue na atividade alelopática dos OE classificados nos grupos químicos 2 e 5 pode ser justificada pelo fato de que, a respeito das diferenças químicas detectadas, estes apresentaram constituintes químicos comuns, como os mono e sesquiterpenóides que, embora apareçam em proporções distintas, perfazem a composição majoritária dos OE (Amaral et al., 2014a). Além disso, é provável que as diferenças de suscetibilidade das distintas espécies-alvo frente ao mesmo OE são devidas

às características inerentes a cada espécie avaliada, uma vez que a resistência e tolerância aos aleloquímicos é espécie-específica, existindo organismos mais sensíveis do que outros (FERREIRA e ÁQUILA, 2000). Também merece destaque o fato de que, principalmente no teste com arroz, foram detectadas diferenças entre o efeito dos OE classificados nos grupos químicos distintos, não deixando de considerar que ambos os grupos apresentaram inibição de germinação e desenvolvimento de plântulas.

Dentre as espécies avaliadas, o picão-preto é a única que possui ocorrência geográfica similar a da *N. megapotamica*. Estas espécies ocorrem nas mesmas formações vegetacionais, porém, na sequência sucessional, fazem parte de grupos distintos. A primeira compõe o grupo das espécies colonizadoras, que ocupam áreas abertas juntamente com espécies monocotiledôneas, classe de espécies cujo desenvolvimento foi mais afetado pelos OE. Ambas recobrem o solo e depositam material orgânico, preparando o ambiente para o estabelecimento das espécies arbustivas e arbóreas da floresta. Já *N. megapotamica* é uma das espécies mais importantes na Floresta Estacional Decidual ou Floresta Caducifólia. Está presente nos componentes de regeneração desta tipologia e, quando em idade reprodutiva ocupa o segundo estrato, entre as árvores remanescentes da floresta madura (BRENA e LONGHI, 2002). É considerada, ainda, adaptada às condições de floresta secundária, capoeirões (REITZ et al., 1983; DELLA et al., 2004) ou áreas alteradas, principalmente pela ação antrópica, ambiente de elevada competição entre espécies vegetais. As alterações na sucessão de espécies, na estrutura, na dominância e composição de comunidades vegetais já foram anteriormente relacionadas ao efeito alelopático (FERREIRA e ÁQUILA, 2000; CHOU, 2006). Isso poderia explicar a intensa atividade alelopática sofrida pelo picão-preto e pelas espécies monocotiledôneas, aveia preta e azevém, pois possivelmente *N. megapotamica* utiliza a alelopatia para obter sucesso na ocupação dos espaços na floresta e na colonização de ambientes alterados.

A metodologia e o materiais empregados foram adequados, e os resultados obtidos foram satisfatórios, demonstrando a atividade alelopática dos OE de *N. megapotamica*. No entanto, sugerem-se a realização de testes com frações, contendo classes de constituintes do OE separadas, ou substâncias isoladas para estabelecer os potenciais aleloquímicos oriundos desta espécie, bem como os seus respectivos mecanismos de ação.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *N. megapotamica* apresentaram composição química variada, devido, principalmente, à ocorrência de fenilpropanoides em maiores quantidades (9,23%) no OE do GQ5, que, também, apresentou menor teor de monoterpenoides (37,86%) em relação ao GQ2 (50,78%). Essas diferenças sugerem a ocorrência de fenótipos para o OE desta espécie.

Estes OE apresentaram atividade alelopática, detectada através da redução na percentagem de germinação de sementes e menor crescimento de plântulas de espécies bioindicadoras de alelopatia (alface e aveia-preta), bem como espécies de plantas daninhas (picão-preto e azevém), com variada intensidade. Já as culturas agrícolas, soja e arroz, foram as espécies-alvo menos afetadas. A diferença entre os grupos químicos 2 e 5 foi observada no teste com arroz. O grupo das plantas monocotiledôneas foi o mais afetado pela ação alelopática do OE em relação às dicotiledôneas.

A maior susceptibilidade das sementes das espécies-alvo monocotiledôneas e de picão-preto aos OE de *N. megapotamica* parece estar relacionada à co-evolução desta última, com uma gama de espécies na dinâmica de sucessão da vegetação nas formações em que ocorre. Mais especificamente, ao fato de que os grupos de espécies aos quais as primeiras são inclusas, precederem espécies arbóreas como *N. megapotamica*, que as suprimem do sistema quando ocorre colonização do ambiente pelas árvores. Possivelmente *N. megapotamica* utilize a alelopatia como mecanismo para competir e ocupar espaços na floresta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil componentes by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4 ed., Allured Business Media: Carol Stream, 2009, 804 p.
- ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 21-25, 2003.
- ALVES, E. O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. B. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência Agrotecnica**, v. 32, n. 2, p. 651-658, 2008.
- AMARAL, L. P.; SCHINDLER, B.; BIANCHINI, N. H.; LONGHI, S. J.; ALMEIDA, C. A. A.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Boletín**

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Aceito para publicação em abril de 2014(a).

AMARAL, L. P.; TONDOLO, J. S. M.; SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; PINHEIRO, C. G.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, aceito para publicação em junho de 2014(b).

ANDRIANJAFINANDRASANA, S. N. et al. Allelopathic effects of volatile compounds of essential oil from *Ravensara aromatica* Sonnerat chemotypes. **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 2, p. 333-344, 2013.

ANGELINI, L. G.; CARPANESE, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, L.; MACCHIA, M.; FLAMINI, G. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6158-6164, 2003.

APEL, M. A.; LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, A. S. I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacologyonline**, Salerno, v. 3, p. 376-383, 2006.

AZIMOVA, S. S. **Lipidic, lipophilic componentes and essential oil from plant sources**. Springer Science LLC, 2012, p. 810.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNDA/MA. 2009.

BRENA, D.; LONGHI, S. J. Inventário florestal. In: ITAQUI, J (Org.). **Quarta Colônia: Inventários técnicos**. Condesus Quarta Colônia: Santa Maria, 2002, 256 p.

BRITO, A. F. R. **Análise da variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** 2009. 121f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CÉSPEDES, C. L.; ALVARADO, G.; RAMOS, E.; SAJAZAR, J. R.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; CALDERÓN, J. S. Allelopathy activity of endemic *Cosmos* spp. (Asteraceae) from Mexico. **TIP Revista Especializada en Ciências Químico Biológicas**, v. 2, n. 3, p. 69-74, 2000.

CÉSPEDES, C. L.; MARÍN, J. C.; DOMÍNGUEZ, M.; AVILA, J. G.; SERRATO, B. Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. **Lead molecules from natural products: discovery and new trends**, v. 2, p. 373-410, 2006.

- CHOU, C. H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLES, L. (Eds). **Allelopathy**: a physiological process with ecological implications. Dordrecht: Springer, 2006.
- DELLA, J. F. B.; DURLO, M. A.; SPATHELF, P. Modelo de incremento para árvores singulares *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 1, p. 165-177, 2004.
- DEMARQUE, D. P.; BARONI, A. C. M. Desenho de novos modelos de herbicidas naturais: transformações químicas em derivados de fenilpropanóides e avaliação fitotóxica. In: 10 ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMS, 2009. **Anais ...**, Campo Grande, 2009.
- DE MARTINO, L. et al. The antigerminative activity of twenty-seven monoterpenes. **Molecules**, v. 15, p. 6630-6637, 2010.
- DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as source from new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, n. 8/10, p. 583-589, 2000.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; SCHIRADER, K. K.; ALIOTTA, G.; OLIVA, A.; ROMAGNI, J. G. Chemical from nature for weed management. **Weed Science**, v. 50, n. 2, p. 138-151, 2002.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Atlas climático da região sul do Brasil**. Embrapa Clima Temperado/Embrapa Florestas, Pelotas/Colombo, Brasil, 2011.
- FAROOQ, M.; JABRAN, K.; ZAHID, A. C.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, Weinheim, v. 67, n. 5, p. 493-506, 2011.
- FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, edição especial, p. 175-209, 2000.
- FORTES, A. M. T.; MAULI, M. M.; ROSA, D. M.; PICCOLO, G.; MARQUES, D. S.; REFOSCO, R. M. C. Efeito alelopático de sabugueiro e capim-limão na germinação de picão-preto e soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 241-246, 2009.
- GALLI, A. J. B. **A molécula glyphosate e a agricultura brasileira**. In: VELINI et al. Glyphosate. Botucatu: FEPAF, 2009, p. 17-19.
- GAZZIERRO, D. L. P.; PRETE, C. E. C.; SUMIYA, M. Manejo de *Bidens subalternans* resistente aos herbicidas inibidores da Acetolactato Sintase. **Planta daninha**, v. 21, n. 2, p. 283-291, 2003.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. 2 ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2012, 275 p.
- KAUR, S.; PAL SINGH, H.; MITTAL, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Phytotoxic effects of volatile oil from *Artemisia scoparia* against weeds and its possible use as a bioherbicide. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 1, p. 54-61. 2010.
- KING, S. R.; AMBIKA, R. Allelopathic plants. 5. *Chromolaena odorata* (L.). **Allelopathy Journal**, v. 9, p. 35-41, 2002.
- KOMAI, K.; TANG, C. S.; NISHIMOTO, R. K. Chemotypes of *Cyperus rotundus* in Pacific Rim and basin: inhibitory of their essential oils. **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 1991.
- KORDALI, S.; CAKIR, A.; SUTAY, S. Inhibitory effects of monoterpenes on seed germination and seedling growth. **Zeitschrift für Naturforsch B**, v. 62c, n3-4, p. 207-214, 2007.
- LATTIN, J. M.; CARROLL, J. D.; GREEN, P. E. **Análise multivariada de dados**. AVRITSCHER, H. (Tradutor), São Paulo: Cengage Learning, 2011. 455 p.
- LATINA-HENNSEN, B.; KING-DIAZ, B.; AGUILAR, M. I.; HERNANDEZ TERRONES; M. G. Plant secondary metabolites: Targets and mechanisms of allelopathy, p. 229-266. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLES, L. (ed.). **Allelopathy: A physiological Process with Ecological implications**. Springer, 2006.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2000.
- MACÍAS, F. A.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. **Steroids**, v. 71, p. 603-608, 2006.
- MAGIERO, E. C.; ASSMANN, J. M.; MARCHESE, J. A.; CAPELIN, D.; PALADINI, M. V.; TREZZI, M. M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARASCHIN-SILVA, F. **Extração aquosa de aleloquímicos e bioensaios laboratoriais de alelopatia**. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

- MARCO, C. A. et al. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 1, p. 157-160, 2012.
- MARQUES, C. A. Importância econômica da Família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.
- MARTINAZZO-PORTZ, T.; MÜLLER, S. F. Germinação de sementes de *Bidens pilosa* submetido a preparados homeopáticos de *Bidens pilosa*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 4484-4488, 2009.
- MELLO, N. T. K.; DIAS, I. E. C.; YOSHIDA, M. Chemical constituents of *Nectandra saligna* Nees (Lauraceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, n. especial, p. 319, 2005.
- MILLER, D. A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.
- MOORE, D. S.; Mc CABE, G. P. **Introdução à prática da estatística**. 3 ed., LTC: Rio de Janeiro, 2002, 536 p.
- MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de identificação de plantas infestantes: arroz**. FMC Agricultural Products: São Paulo, 2010, 854 p.
- NATIONAL INSTITUTE of STANDARDS and TECHNOLOGY. **NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/ analysis programs**. Nist 02 update, Hoboken, USA: John Wiley & Sons, 2010.
- NISHIDA, N. et al. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1187-1203, 2005.
- OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.
- PRICHOA, F. C.; LEYSER, G.; OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L. Comparative allelopathic effects of *Cryptocarya moschata* and *Ocotea odorifera* aqueous extracts on *Lactuca sativa*. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 197-202, 2013.
- PROPERZI, A.; ANGELINI, P.; BERTUZZI, G.; VENANZONI, R. Some biological activities of essential oils. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 2, n. 5, p.1-4, 2013.
- REITZ, R.; KLEIN, R.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e de Abastecimento, 1983, 524 p.
- RICE, A. R. **Allelopathy**. 2 ed., Academic Press Orlando, Florida, 1984.

- RICKLI, H. C.; FORTES, A. M. T.; SILVA, P. S. S.; PILATTI, D. M.; HUTT, D. R. Efeito alelopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. Em alface, soja, milho, feijão e picão-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 473-484, 2011.
- ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineol. **Plant Physiology**, v. 123, n. 2, p. 725-732, 2000.
- ROMAN, E. S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M. A.; MATTEI, R. W. Resistência do azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 22, p. 301-306, 2004.
- SAHARKHIZ, M. J.; SMAEILI, S.; MERIKHI, M. Essential oil analysis and phytotoxic activity of two ecotypes of *Zataria multiflora* Boiss. Growing in Iran. **Natural Products Research**, v. 24, n. 17, p. 1598-1609, 2010.
- SANDERSON, K.; BARICCATTI, R. A.; PRIMIERI, C.; VIANA, O. H.; VIECELLI, C. A.; JUNIOR, H. G. B. Allelopathic influence of the aqueous extract of jatropha on lettuce (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids) germination and development. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 11, n. 1; p. 641-643, 2013.
- SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009, 75f. Dissertação (Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- SARTOR, L. R.; ADAMI, P. F.; CHINI, N.; MARTIN, J. A. M.; SOARES, A. B. Alelopatia de acículas de *Pinus taeda* na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Avena strigosa*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1653-1659, 2009.
- SATYAL, P.; PAUDEL, P.; POUDEL, A.; DOSOKY, N. S.; POKHAREL, K. K.; SETZER, W. N. Bioactivities and compositional analysis of *Cinnamomum* essential oils from Nepal: *C. camphora*, *C. tamala*, and *C. glaucescens*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 12, p. 1777-1784, 2013.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Revista de microbiologia**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.
- SILVA FILHO, A. A. et al. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 42-45, 2004.
- SINGH, H. P. et al. Comparative phytotoxicity of for monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of applied biology**, v. 141, n. 2, p. 111-116, 2002.
- SODAEIZADEH, H. et al. Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L. and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 385-94, 2010.

- SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; VASCONCELOS, M. A. M.; ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, R. L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 389-396, 2009.
- SPRENT, P.; SMEETON, N. C. **Applied nonparametric statistical methods**. Boca Raton: Chapman & Hall. 2007, 530 p.
- SUSIN, C. Basic statistical analysis for dental research. In: RODE, S. M.; DIAS, K. R. H. C.; FRANÇA, C. M. **Handbook of scientific methodology**. IADR Latinoamericana, 2009.
- TONDOLO, J. S. M.; AMARAL, L. P.; SIMÕES, L. N.; GARLET, Q. I.; SCHINDLER, B.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, B. F.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Anesthesia and transport of fast snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 667-674, 2013.
- TORRES, A. M.; CAMARGO, F. J.; RICCIARDI, A. I. A.; DELLACASSA, E. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2013.
- VARGAS, L.; BIANCHINI, M. A.; RIZZARDI, M. A. Resistência. **Cultivar**, v. 9, n. 97, p. 5-7, 2007. (suplemento).
- VOGOT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n.1, p. 2-20, 2010.
- VOKOU, D.; DOUVLI, P.; BLIONIS, G. J.; HALLEY, J. M. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent growth. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 10, p. 2281-2301, 2003.
- WANG, R. et al. Cloning, expression and wounding induction of E-caryophyllene synthase gene from *Mikania micrantha* H.B.K. and potential of E-caryophyllene. **Allelopathy Journal**, v. 24, p. 35-44, 2009.

6 RESULTADOS ADICIONAIS

6.1 Teste de atividade inseticida do OE de *Nectandra megapotamica*

6.1.1 Parte experimental

Para a realização do teste de atividade inseticida foram utilizados OE dos grupos químicos 2 e 5, descritos no segundo artigo e no manuscrito 1. Anterior ao teste propriamente dito foi necessário padronizar uma metodologia, que envolveu a escolha de solvente, emulsificante, forma de aplicação, local de acondicionamento dos insetos, volume de solução a ser aplicado, número de repetições, número de insetos por placa, dentre outros. Isso consumiu um volume razoável de OE bem como um número considerável de insetos. Estabelecido um protocolo mínimo, foi possível realizar um experimento para testar o método padronizado, com aplicação de uma solução contendo 5% de OE, que resultou em aproximadamente 50 % de mortalidade pelo grupo químico mais ativo, o GQ5.

Os insetos utilizados foram indivíduos adultos de *Nezara viridula*, família Pentatomidae (LINEUS, 1758), insetos conhecidos popularmente como “percevejo da soja” (SOSSA-GÓMEZ et al., 2010), disponíveis na época em que o experimento foi realizado (Safrá 2011/2012). Os percevejos foram coletados manualmente em uma área experimental para produção de sementes de soja sem aplicação de inseticida, no Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, localizado no campus da UFSM. Os insetos foram armazenados numa caixa plástica com tela nas laterais até a realização do experimento.

Os OE do GQ2 e GQ5 (50 µl) foram solubilizados em 9 µl de acetona, depois emulsionados com 1 µl de Tween 20[®], totalizando 10% da solução final, que foi de 1000 µl, obtida com adição posterior de 940 µl de água destilada. Foram utilizados também um tratamento denominado branco, sem aplicação de soluções, um controle positivo, com uso de solução contendo o inseticida comercial Conect[®] a 1% (1 µl do inseticida em 999 µl de água destilada), e um controle para os diluentes (9 µl de acetona, 1 µl de Tween 20 e 990 µl de água destilada). As aplicações de cada tratamento foram realizadas com o auxílio de borrifadores de vidro individuais, que continham válvula *spray*. Com essa forma de aplicação,

procurou-se simular a pulverização agrícola que ocorre para o controle deste inseto nas áreas de cultivo de soja.

Foram elaborados cinco tratamentos ao acaso (branco, controle positivo, controle dos diluentes, GQ2 e GQ5), cada qual com três repetições, constituídas por 10 insetos dispostos em placa de Petri de vidro com nove cm de diâmetro (Figura 1).

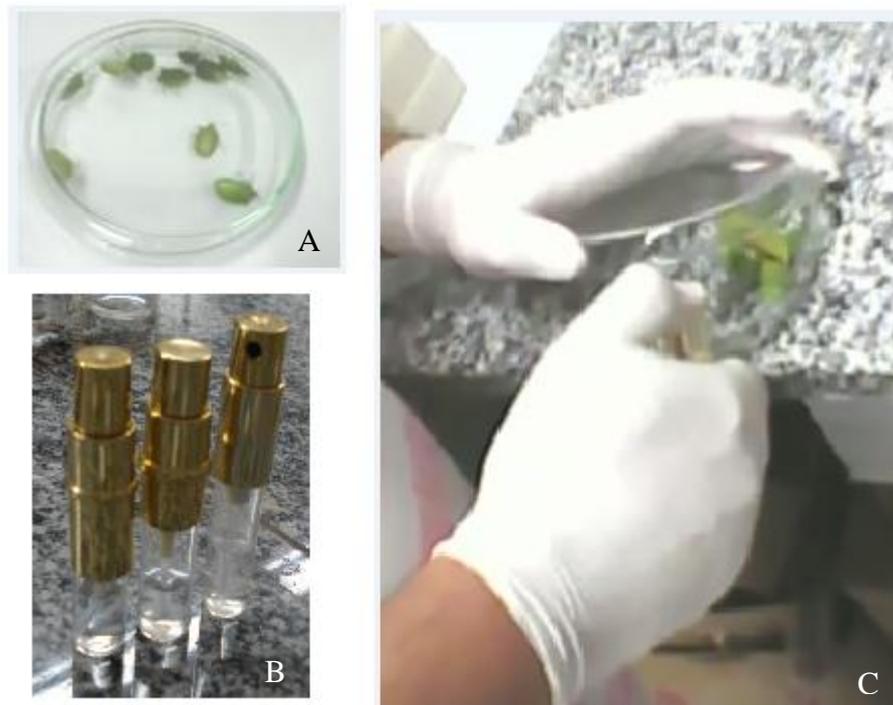


Figura 1 - Material utilizado nos testes de avaliação de atividade inseticida. Placa de petri de vidro de 9 centímetros de diâmetro com 10 indivíduos adultos de percevejo da soja (1.A); borrifadores de vidro com válvula *spray* para aplicação de solução com OE (1.B); Forma de aplicação dos tratamentos (1.C).

Fonte: Autor.

Foram realizadas contagens de percevejos mortos em cada placa, devido à aplicação dos tratamentos, a 1, 14, 20 e 24 horas após a aplicação dos mesmos. Os insetos foram estimulados com a ponta de um bastão de vidro para verificar se tinham capacidade de locomoção, sendo considerados mortos quando não mais reagem ao estímulo. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para os dados obtidos 24 horas após a aplicação dos tratamentos, com uso do o programa Assistat versão 7.6 Beta (2012). A curva de mortalidade acumulada (%) foi plotada em função do tempo, para os OE dos dois grupos químicos avaliados.

6.1.2 Resultados

Os insetos apresentaram perda de coordenação, agitação e movimentos involuntários com alta frequência nos tratamentos contendo OE. A Tabela 1 apresenta a mortalidade acumulada (%) em função do tempo para *Nezara viridula* em função dos tratamentos utilizados. O controle positivo apresentou já na primeira hora altas taxas de mortalidade. Já o controle com os diluentes apresentou alguma toxicidade para os percevejos, e o tratamento em branco apresentou uma pequena taxa de mortalidade, decorrente da condição dos insetos. As médias de mortalidade deste controles foram subtraídas dos respectivos tratamentos contendo OE, como forma de correção dos dados.

Tabela 1 - Percentagem de mortalidade acumulada de *Nezara viridula* ao longo de 24 horas após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	Repetições	Tempo após a aplicação (horas)					Tempo após a aplicação (horas)			
		1	14	20	24		1	14	20	24
Branco	1	0	0	10	10		0	0	0	0
	2	0	0	0	0		0	0	0	0
	3	0	0	0	0		0	0	0	0
Média		0,00	0,00	3,33	3,33		0,00	0,00	0,00	0,00 (c)
Controle +	1	60	100	100	100		60	100	100	100
	2	50	100	100	100		50	100	100	100
	3	70	100	100	100		70	100	100	100
Média		60,00	100,00	100,00	100,00		60,00	100,00	100,00	100,00 (a)
Diluentes	1	0	20	20	20	Dados Corrigidos	0	0	0	0
	2	10	10	10	20		0	0	0	0
	3	0	10	10	10		0	0	0	0
Média		3,33	13,33	13,33	16,67		0,00	0,00	0,00	0,00 (c)
GQ2	1	30	50	50	50		26,67	36,67	36,67	36,67
	2	0	0	0	0		0	0	0	0
	3	0	20	20	20		0	6,67	6,67	6,67
Média		10,00	23,33	23,33	23,33		8,89	14,44	14,44	14,44 (c)
GQ5	1	20	60	60	60		16,67	46,67	46,67	46,67
	2	20	40	60	60		16,67	26,67	43,33	46,67
	3	30	60	60	60		26,67	46,67	46,67	46,67
Média		23,33	53,33	60,00	60,00		20,00	40,00	45,56	46,67 (b)

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados obtidos para os OEs em análise indicam diferença de atividade inseticida entre os grupos químicos comparados. A mortalidade acumulada observada no tratamento GQ5 (46,67%) foi estatisticamente superior a observada para o GQ2 (14,44%), 24 horas após a aplicação dos tratamentos (Tabela 1, Figura 2).

A ANOVA realizada para o teste de atividade inseticida com os dados corrigidos 24 horas após a aplicação dos tratamentos, apresentou um Teste F altamente significativo ($F = 70,7194^{**}$, $p < 0,001$; $GL = 14$) e F crítico de 5,99. As médias de mortalidade acumulada (%) foram estatisticamente diferentes para os tratamentos utilizados (Tabela 1). A diferença mínima significativa (DMS) foi de 23,50 % e o coeficiente de variação (CV) foi de 27,11 %. Contudo destaca-se a importância de serem realizados novos testes com um número maior de repetições de modo a dar segurança para a análise estatística.

A alta percentagem de mortalidade observada para o controle positivo, constituído por um produto comercial específico para o controle de percevejos da cultura da soja, pode ser explicada pela superdosagem do mesmo. Fazendo uma correlação entre a recomendação de aplicação do produto por hectare (0,750 ml em 10.000 m²) com a área da placa de petri (6,6362.10⁻³ m²), tem-se um volume de 0,48 µl, no entanto, foram aplicados 1 µl do produto comercial (menor volume pipetável).

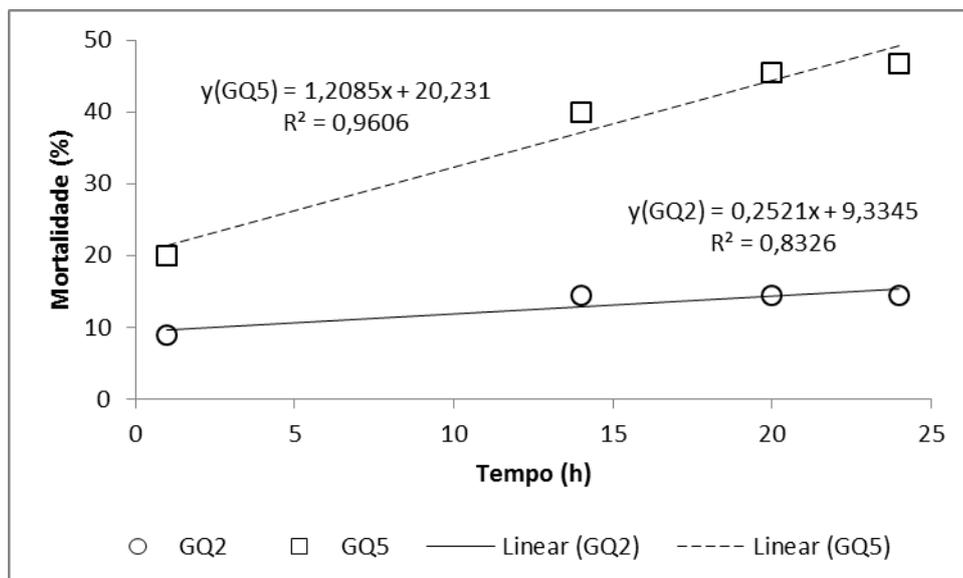


Figura 2 - Atividade inseticida dos OE do GQ5 e GQ2, obtido das folhas velhas de *Nectandra megapotamica* coletadas no Morro do Elefante, Santa Maria-RS.

6.2 Segunda área de coleta

6.2.1 Parte experimental

Ao completar um ano de coletas em indivíduos de *N. megapotamica* no Morro do Elefante, houve mudança na titularidade da propriedade na qual os indivíduos amostrados ocorreram. O novo proprietário do local não permitiu a entrada e a continuidade das coletas em sua propriedade, sendo necessário então encontrar um novo local de coleta. Este novo local localiza-se próximo ao km 318 da BR 158, no sentido Santa Maria à Itaara-RS. As condições ambientais são semelhantes às do primeiro: formação florestal e associações de classes de solo. Apenas houve mudança na face de exposição, sul para o Morro do Elefante e oeste para o novo local, que localiza-se a aproximadamente 5 km do local de coleta anterior, ambos em Santa Maria-RS, e também na altitude, que foi superior no novo local de coleta, estando entre 232 e 249 m.

Foram utilizados os mesmos procedimentos de coleta de folhas frescas descritos nos artigos 1 e 2 (AMARAL et al., 2014a, b). Mas para esta série de dados as folhas não foram separadas em jovens e velhas, por não apresentarem divergência acentuada na composição química que justificasse sua separação. Foram amostrados 12 indivíduos no total, sendo coletados três por estação do ano, sendo que as coletas foram realizadas na primavera, verão, outono e inverno, entre os anos de 2011 e 2012. Os OE foram obtidos por hidrodestilação (SARTOR, 2009), por três horas e em triplicata.

Foram determinados os redimentos, sendo analisados por ANOVA e correlacionados, por correlação de Pearson ($p < 0,05$) com as variáveis climáticas descritas para Santa Maria, RS, obtidas da estação meteorológica do INMET número 83936 (INMET, 2014). Foram utilizadas as variáveis precipitação (mm), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (%), insolação (h) e pressão atmosférica (hPa). Para a precipitação foram obtidos o valor acumulado para o período de 15 dias antes de cada coleta de material vegetal para obtenção do OE da espécie. Para as demais variáveis foram obtidos os valores máximos, mínimos e médios para o período de cinco dias antes de cada coleta, sendo que para cada dia haviam disponíveis três observações destas variáveis.

Os OE foram analisados por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se os mesmos parâmetros de análise já descritos nos artigos 1 e 2.

6.2.2 Resultados

Os rendimentos obtidos para os OE de folhas frescas de *N. megapotamica* diferiram em função das estações do ano (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento (%) base úmida do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica* coletadas próximo ao km 318 da BR158 em Santa Maria-RS.

Coleta Repetição	Primavera 2011			Verão 2012			Outono 2012			Inverno 2012		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0,0789	0,1600	0,1119	0,1655	0,1881	0,1792	0,1769	0,1422	0,2213	0,0626	0,2070	0,0868
2	0,0967	0,1388	0,1028	0,1817	0,1794	0,1630	0,1337	0,1195	0,2693	0,0538	0,1940	0,0910
3	0,0882	0,1705	0,2402	0,1891	0,1831	0,1925	0,1234	0,1008	0,2223	0,0395	0,1991	0,0776
	0,0879	0,1564	0,1516	0,1788	0,1835	0,1782	0,1447	0,1209	0,2376	0,0520	0,2000	0,0851
MÉDIA	0,1320(ab)			0,1802(a)			0,1677(ab)			0,1124(b)		
	0,1481											

Legenda: a; ab; b – diferença estatística 0,0660 (Teste de Tukey p0,05); F 3,31 Fcrit. 2,90 p0,0325; cv 34,93%

No verão foi obtido o maior rendimento de OE, porém este não diferiu estatisticamente do obtido no outono e primavera. Já no inverno foi obtido o menor rendimento, estatisticamente inferior ao do verão e sem diferença entre o da primavera e outono. Houve divergência da série obtida no Morro do Elefante, na qual primavera e outono apresentaram, respectivamente, maior e menor rendimento, possivelmente devido à ocorrência de estiagem no período de coleta (Figura 3.A). No entanto, o rendimento médio foi similar ao obtido no primeiro local de coleta, 0,17%. Os dados climáticos obtidos para caracterizar o período de coleta, inclusive o da primeira área, estão ilustrados na Figura 3.

Na primeira área de coleta foram observadas as maiores correlações de Pearson, entre o rendimento base úmida do óleo essencial (%) com as variáveis umidade relativa máxima (%), insolação máxima (h), pressão atmosférica média (hPa), insolação média (h) e pressão atmosférica máxima (hPa), que foram respectivamente de -0,5590; 0,4330; -0,4147; 0,3997 e -0,3979. Já na segunda área de coleta as maiores correlações foram entre o rendimento do óleo essencial com as variáveis precipitação média (mm), pressão atmosférica mínima (hPa), pressão atmosférica média (hPa), umidade relativa do ar média (%) e temperatura mínima (C°), respectivamente com valores de 0,4811; -0,4248; -0,4041; -0,2965 e 0,2862.

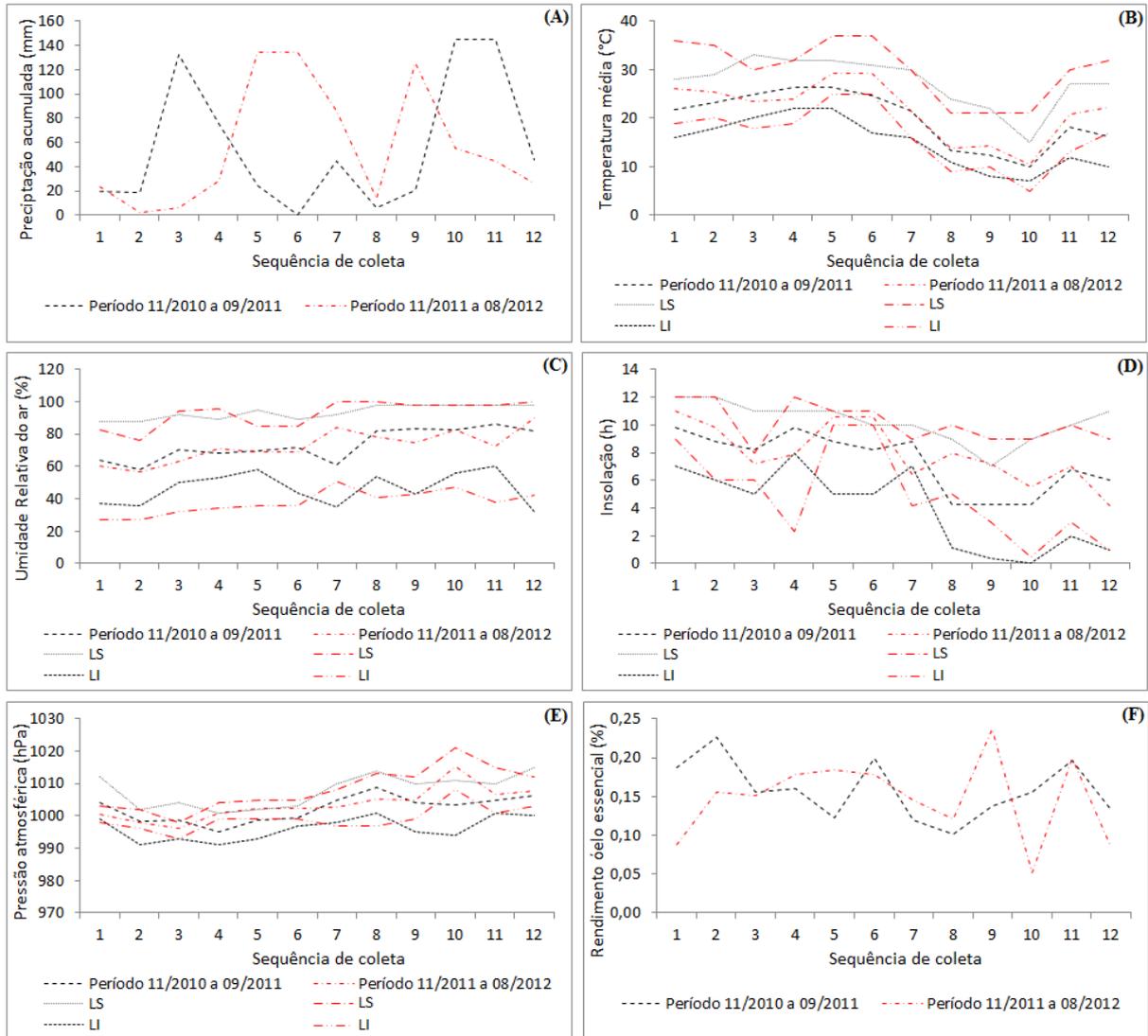


Figura 3 – Variabilidade da precipitação acumulada (A), temperatura (B), umidade relativa do ar (C), insolação (D), pressão atmosférica (E) e rendimento do óleo essencial de *Nectandra megapotamica* para os dois períodos de coleta (F) em Santa Maria-RS.

Legenda: LS – limite superior; LI – limite inferior.

De uma maneira geral ocorreram os mesmos constituintes nos OE obtidos na segunda área de coleta em relação a anterior. Porém, os sesquiterpenoides foram predominantes em relação as demais classes de constituintes (Figura 4), não sendo observada a alternância entre monoterpênoides e sesquiterpenoides, de forma evidente como nas amostras de OE obtidas no Morro do Elefante.

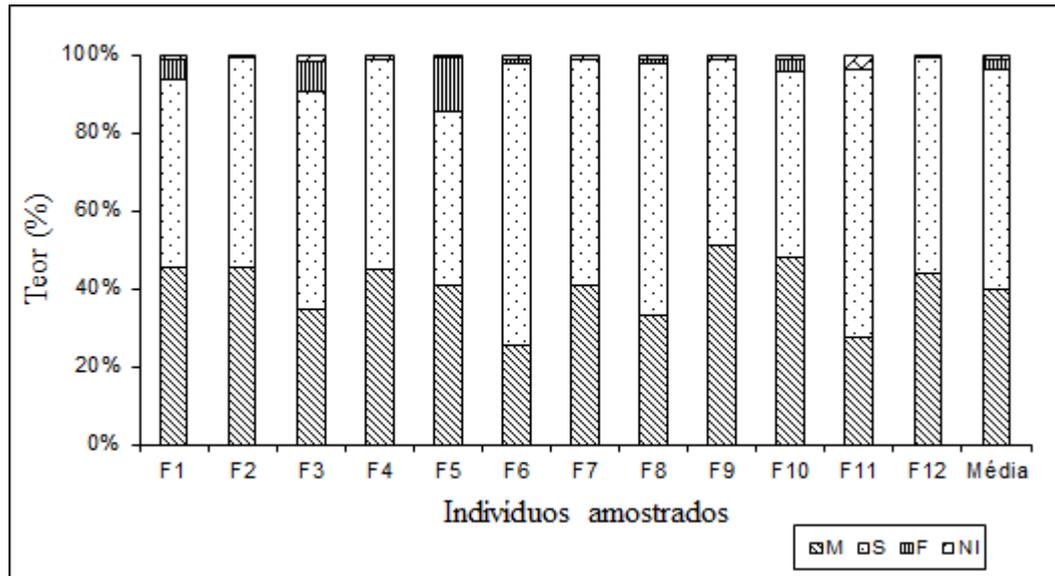


Figura 4 - Variação das classes químicas de constituintes no OE de *N. megapotamica* obtido de folhas coletadas nas proximidades do km 318 da BR 158 em Santa Maria-RS.

Legenda: M – monoterpenoides; S – sesquiterpenoides; F – fenilpropanoides; NI – não identificados

Em relação à composição química, a principal alteração observada foi o maior predomínio de biciclogermacreno em relação ao α -pineno e ausência dos fenilpropanoides *Z*- e *E*-Asarona (Tabela 3). No entanto, foi identificado o fenilpropanoide 4,6-dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodióxido, presente na série anterior, mas não identificados (NI 9@), e também foram detectados os demais representantes dessa classe, Metil Eugenol, Elemicina e a estrutura com perfil de fragmentação semelhante ao da *Z*-asarona (NI 6# na composição dos OE do artigo 2, correspondente ao NI 9# contido na Tabela 3).

Tabela 3 - Composição química dos OE de folhas de *N. megapotamica* coletadas nas proximidades do km 318 da BR 158 em Santa Maria-RS.

Nu.	Const.	Clas.	Índice de Kovatz			Fon.	Teor (%)												M
			Calculado*	Tab.			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
1	α -Pinoeno	HM	930,4	935,0	930	N	18,54	16,29	13,00	20,48	17,28	6,26	16,94	16,28	21,72	22,19	7,33	21,06	16,45
2	Canfeno	HM	942,9	946,4	943	N	0,68	0,98	0,81	0,31	0,59	0,30	0,63	0,27	0,69	0,43	0,13	0,25	0,51
3	β -Pinoeno	HM	972,9	976,2	974	N	15,51	14,07	11,84	15,07	13,66	5,68	14,27	9,16	17,30	12,72	6,57	15,37	12,60
4	β -Mirceeno	HM	989,6	992,5	991	N	1,10	0,86	0,66	1,13	0,91	0,49	1,03	2,02	1,13	3,64	0,60	1,01	1,21
5	α -Felandreno	HM	1000,4	---	1002	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,14	---	0,14
6	3-Careno	HM	1005,9	---	1004	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,11	---	0,11
7	α -Terpineno	HM	1013,2	1013,2	1013	N	---	0,11	0,11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,11
8	Limoneno	HM	1026,0	1028,9	1026	N	7,28	6,53	5,47	5,42	5,46	7,49	6,15	3,77	4,56	5,87	2,60	5,13	5,48
9	Eucaliptol	MO	1027,3	1029,8	1029	N	0,66	0,50	0,33	0,63	0,69	---	0,51	0,79	1,13	0,92	0,16	0,24	0,60
10	β -E-Ocimeno	HM	1037,6	1039,6	1040	N	---	0,56	---	---	0,20	0,57	---	---	0,47	0,17	0,85	---	0,47
11	β -Z-Ocimeno	HM	1046,9	1050,3	1047	N	0,42	3,76	0,46	0,49	1,13	3,76	0,37	0,45	2,96	1,02	6,55	0,37	1,81
12	τ -Terpineno	HM	1055,6	1058,1	1058	N	0,14	0,18	0,19	0,14	0,11	---	---	---	---	0,11	---	---	0,14
13	Terpinoleno	HM	1084,9	1087,0	1085	N	0,62	0,52	0,47	0,52	0,43	0,50	0,53	0,34	0,43	0,49	2,04	0,34	0,60
14	β -Linalol	MO	1098,6	1099,2	1098	N	---	0,33	0,11	---	---	---	---	---	---	0,13	0,17	---	0,18
15	Cânfora	MO	1140,8	---	1141	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,12	---	---	0,12
16	4-Terpineol	MO	1174,4	1176,4	1174	N	0,23	0,34	0,36	0,24	0,22	0,10	0,24	0,12	0,18	0,14	---	---	0,22
17	α -Terpineol	MO	1188,1	1190,1	1190	N	0,16	0,24	0,30	0,30	0,15	---	---	0,11	---	---	0,13	---	0,19
18	Acetato de bornila	MO	1284,7	1285,5	1284	N	---	---	0,25	---	---	---	---	---	0,12	---	---	---	0,18
19	NI 1	NI	1326,7	1328,5	---	---	---	---	---	---	0,10	---	---	0,12	---	---	---	---	0,11
20	δ -Elemeno	HS	1335,9	1338,7	1337	N	1,28	1,11	1,31	1,14	0,67	1,69	1,09	0,96	1,99	1,10	1,03	1,12	1,21
21	α -Cubebeno	HS	1348,1	1350,4	1348	N	---	---	---	0,10	0,11	---	0,11	0,22	0,16	0,18	0,20	---	0,16
22	Ciclosativeno	HS	1362,8	1365,8	1371	A	---	---	---	---	---	0,10	0,12	0,14	---	---	---	0,10	0,12
23	Copaeno	HS	1374,2	1376,9	1376	N	1,86	0,49	0,59	1,80	1,86	1,94	2,48	3,17	3,71	1,68	1,14	1,59	1,86

Tabela 3 continua na próxima página

Nu.	Const.	Clas.	Índice de Kovatz			Fon.	Teor (%)												M
			Calculado*	Tab.			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
23	Copaeno	HS	1374,2	1376,9	1376	N	1,86	0,49	0,59	1,80	1,86	1,94	2,48	3,17	3,71	1,68	1,14	1,59	1,86
24	β -Bourboneno	HS	1383,2	1385,9	1383	N	0,14	0,13	0,25	0,20	0,19	0,20	0,18	0,20	---	0,42	0,12	0,11	0,20
25	β -Cubebeno	HS	1388,8	1391,6	1391	N	---	---	---	0,48	0,41		0,80	0,87	1,29	0,93	0,67	0,48	0,74
26	β -Elemeno	HS	1390,7	1393,5	1392	N	0,92	0,87	0,92	0,64	0,43	1,51	0,50	0,55	0,66	0,47	0,46	0,63	0,71
27	Cipereno	HS	1398,0	---	1399	A	---	---	0,10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,10
28	Metil Eugenol	F	1404,2	---	1404	N	---	---	---	0,13	---	---	---	---	---	---	---	---	0,13
29	α -Gurjuneno	HS	1408,0	1410,9	1409	N	---	0,10	0,13	---	0,10	0,13	0,11	---	---	0,20	---	---	0,13
30	Cariofileno	SO	1417,7	1421,1	1420	N	3,40	3,27	2,43	1,88	1,84	2,65	3,96	2,83	3,02	1,31	1,99	1,81	2,53
31	β -Gurjuneno	HS	1427,7	1430,3	1427	N	---	---	0,24	0,26	0,21	---	0,24	0,27	0,14	0,14	---	---	0,21
32	β -Copaeno	HS	1427,8	1430,7	1432	A	0,19	0,22	---	---	---	0,25	---	---	---	---	---	0,15	0,20
33	τ -Elemeno	HS	1432,7	1433,7	1434	N	0,13	---	0,18	---	---	---	0,12	---	---	0,16	---	---	0,15
34	α -Bergamoteno	HS	1435,0	---	1436	N	---	0,50	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,50
35	NI 2	NI	1435,8	1440,4	---	---	---	---	0,75	0,41	0,35	0,13	0,42	0,60	0,34	0,37	0,24	0,22	0,38
36	Aromadendreno	HS	1437,7	1440,7	1439	N	0,37	0,36	---	---	---	0,59	---	---	---	---	---	---	0,44
37	Z- β -Farneseno	HS	1442,2	---	1443	A	---	0,28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,28
38	τ -Gurjuneno	HS	1442,5	1450,3	1444	N	---	---	0,21	---	---	---	---	0,11	0,12	---	---	---	0,15
39	α -Cariofileno	SO	1452,4	1455,6	1452	N	1,37	0,53	0,48	0,99	1,38	1,61	1,43	1,84	1,80	0,84	0,70	1,05	1,17
40	Allo-Aromadendreno	HS	1458,1	1462,4	1460	N	0,30	1,07	0,50	3,35	1,27	0,44	0,36	0,92	1,96	0,53	0,94	0,44	1,01
41	<i>E</i> -Muuroala-4(14),5-dieno	HS	1473,6	---	1467	A	---	---	---	---	---	---	---	---	0,12	---	---	---	0,12
42	τ -Muuroleno	HS	1476,9	---	1477	N	---	---	---	---	---	---	---	---	0,43	---	---	---	0,43
43	Germacreno D	HS	1481,3	1485,7	1483	N	9,19	12,20	14,63	11,46	10,24	12,99	12,39	13,10	6,57	9,15	6,70	11,75	10,86
44	NI 3	NI	1491,7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,18	---	---	---	0,18
45	Biclogermacreno	HS	1497,9	1503,8	1500	A	21,81	26,55	27,90	25,60	20,02	38,79	26,05	30,24	19,85	21,27	38,11	31,80	27,33
46	α -Bulneseno	HS	1503,6	1508,5	1504	N	0,47	0,50	0,54	0,39	0,37	0,85	0,62	0,64	0,20	0,30	---	0,33	0,47
47	β -Bisaboleno	HS	1506,8	---	1506	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,37	---	---	0,37
48	NI 4	NI	1506,8	1514,4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,44	0,22	0,33

Tabela 3 continua na próxima página

Nu.	Const.	Clas.	Índice de Kovatz			Fon.	Teor (%)												M
			Calculado*		Tab.		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
49	τ -Cadineno	HS	1512,8	1516,8	1514	N	0,25	0,21	0,36	0,22	0,22	0,41	0,29	0,42	0,25	0,37	0,32	---	0,30
50	Cadina-1(10),4-dieno	HS	1522,4	1526,6	1526	N	2,38	0,81	1,34	1,97	2,42	3,53	2,45	3,30	2,70	1,01	1,13	1,65	2,06
51	<i>E</i> -Cadina-1(2),4-dieno	HS	1530,9	1534,7	1535	A	0,10	---	---	---	---	0,16	0,16	0,15	0,17	0,16	---	---	0,15
52	NI 5	NI	1541,1	1556,9	---	---	---	---	---	0,22	---	0,10	0,11	---	---	0,15	0,40	0,11	0,18
53	Elemol	SO	1549,9	---	1547	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,44	---	0,44
54	Silfiperfol-5-en-3-ol A	SO	1555,9	---	1552	A	---	---	---	---	---	---	0,10	---	---	---	---	---	0,10
55	Germacreno B	HS	1556,3	---	1558	N	---	0,16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,16
56	Elemicina	F	1556,6	1559,9	1557	A	---	---	0,25	---	0,36	0,53	---	0,20	---	0,66	---	---	0,40
57	NI 6	NI	1556,4	1567,0	---	---	0,48	---	---	---	---	---	---	---	---	0,16	0,20	0,11	0,24
58	<i>E</i> -Nerolidol	SO	1562,7	1567,0	1563	A	1,70	0,76	0,12	0,41	0,15	0,71	0,69	0,37	0,32	2,34	5,68	---	1,20
59	NI 7	NI	1566,5	1570,0	---	---	0,16	0,31	0,34	0,26	0,18	0,29	0,22	0,22	0,12	---	---	---	0,23
60	Espatulanol	SO	1576,5	1581,4	1578	N	0,69	0,61	1,20	0,47	1,09	1,05	0,54	1,36	0,56	1,64	1,20	0,60	0,92
61	Globulol	SO	1583,2	1587,1	1583	N	0,74	0,98	1,20	0,77	0,69	1,03	0,83	0,96	0,55	0,86	1,14	0,57	0,86
62	Viridiflorol	SO	1591,6	1594,9	1593	A	0,48	0,86	1,05	0,78	0,51	0,84	0,77	0,76	0,46	0,64	0,77	0,42	0,69
63	Guaiol	SO	1598,8	---	1596	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,56	---	0,56
64	NI 8	NI	1601,9	1605,4	---	---	0,44	0,37	0,57	0,37	---	0,43	0,33	0,43	0,30	0,51	0,29	0,22	0,39
65	NI 9#	F	1603,2	---	---	---	---	---	---	---	0,63	---	---	---	---	---	---	---	0,63
66	NI 10	NI	1610,4	1626,0	---	---	---	0,15	---	---	---	0,13	0,10	0,10	---	---	0,23	---	0,14
67	Cubenol	SO	1628,3	1631,7	1630	N	0,14	---	---	---	0,12	0,32	0,21	0,19	0,17	0,26	0,32	---	0,22
68	β -Eudesmol	SO	1633,8	---	1636	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,61	---	0,61
69	NI 11	NI	1642,1	---	---	---	---	---	---	---	---	0,15	---	---	---	---	---	---	0,15
70	τ -Cadinol	SO	1641,4	1645,1	1645	N	0,34	0,42	0,51	0,43	0,34	0,39	0,39	0,51	0,27	0,53	1,19	0,25	0,47
71	δ -Cadinol	SO	1647,6	1648,6	1645	N	---	---	---	---	---	---	---	0,12	0,11	---	0,23	---	0,15
72	4,6-Dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido	F	1652,6	1657,8	---	A ²	5,07	---	7,39	---	13,00	0,27	---	0,51	---	2,11	---	---	4,72
73	NI 13	NI	1654,0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,74	---	0,74
74	α -Cadinol	SO	1654,9	1658,4	1656	N	---	0,55	---	0,58	---	0,56	0,45	0,45	0,29	0,53	3,06	0,36	0,76

Tabela 3 continua na próxima página

Nu.	Const.	Clas.	Índice de Kovatz				Fon.	Teor (%)												M
			Calculado*		Tab.			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
75	NI 14	NI	1658,9	1691,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,29	0,21	1,38	---	0,63	
76	Epi-β-Bisabolol	SO	1671,1	---	1672	A	---	0,16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,16	
77	Fitol	SO	2109,1	2110,5	2012	N	---	0,19	0,16	---	---	---	0,44	---	---	0,42	---	0,13	0,27	
78	NI 15	NI	2055,0	---	---	---	0,29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,29	
Total Identificado							93,55	99,18	90,95	98,74	85,84	98,41	98,82	98,24	98,65	96,49	96,09	99,12	96,17	
Número de Picos							38	43	42	37	39	42	44	42	44	48	45	33	41	
Hidrocarbonetos Monoterpênicos (HM)							44,28	43,87	33,01	43,55	39,76	25,05	40,04	32,30	49,36	46,63	26,92	43,52	39,02	
Monoterpenoides Oxigenados (MO)							1,04	1,41	1,35	1,16	1,06	0,10	0,94	1,02	1,42	1,41	0,46	0,24	0,97	
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos (HS)							39,38	45,57	49,20	47,60	38,53	63,57	48,03	55,25	40,31	38,43	50,82	50,16	47,24	
Sesquiterpenoides Oxigenados (SO)							8,85	8,33	7,14	6,30	6,13	9,15	9,81	9,38	7,55	9,36	17,89	5,19	8,76	
Fenilpropanoides (F)							5,07	0,00	7,64	0,13	14,00	0,80	0,00	0,71	0,00	2,77	0,00	0,00	2,59	
Não Identificados (NI)							1,38	0,82	1,66	1,26	0,53	1,33	1,18	1,34	1,35	1,40	3,91	0,89	1,42	
Total							100	100												

Legenda: Nu. – número; Const. – constituinte; * - amplitude de valores para IK calculado devido às diferentes análises; Clas. – classe de constituintes; Tab. – tabelado; Fon. – fonte; M – média; # - Fenilpropanoide com perfil de fragmentação do modelo de espectro de massas semelhante ao da Z-asarona; N – (NIST, 2002); A – (ADAMS, 2001); A² (ADAMS. 2010).

6.3 Isolamento de um fenilpropanoide do OE de *N. megapotamica*

6.3.1 Parte experimental

O OE foi fracionado por cromatografia em coluna (CC). Foram utilizados 1,0 g de OE do grupo químico 5, 100,0 g de gel de sílica 60 (70-230 mesh, Macherey-Nagel, Germany), e um sistema composto pelos solventes hexano e acetona, na proporção de 9:1 (v/v). Foi utilizada uma coluna com aproximadamente 7 cm de diâmetro externo e 60 cm de altura, sendo coletadas frações de 50 mL, obtidas com um fluxo de gotejamento de 30 gotas min^{-1} . As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) sobre cromatofolhas de gel de sílica F254 (Macherey-Nagel, Alemanha), observadas sob luz UV e posteriormente e reveladas com vanilina sulfúrica. Foram coletadas 21 frações, sendo que as frações 7 e 8 foram reunidas (aproximadamente 100 mL) num balão, e concentradas sob pressão reduzida a 40° C em Rotavapor R-210 BUCHI.

A identificação do constituinte isolado foi realizada por CG-EM, ^1H e ^{13}C - RMN (resonância magnética nuclear). O espectro RMN foi gerado em CDCl_3 num espectrômetro Bruker HPX 400 FT-NMR a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

6.3.2 Resultados

Após concentrados e analisados todos os grupos de frações por CCD e CG, observou-se que as frações 7 e 8, após reunidas e evaporadas, continham 90 mg de um fenilpropanoide incolor, com 98,30% de pureza, e Índice de Kovats (IK) de 1664. Quando comparado ao banco de dados contido em Adams (2010), o mesmo foi identificado como 4,6-dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido [IK 1654 (ADAMS, 2010)]. No entanto, o resultado da análise por RMN, método de análise mais acurado e que permite elucidar a estrutura molecular dos constituintes, mostrou tratar-se do fenilpropanoide isoelemicina, de fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$. Sua estrutura molecular é representada pela Figura 5. O constituinte foi identificado

através da comparação de seus dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear com a literatura (SIERGIEJCZYK et al., 2000).

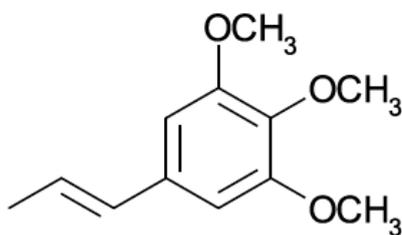


Figura 5 - Estrutura química da isoelemicina.

6.4 Teste de atividade anestésica do OE de *N. megapotamica* em peixes

6.4.1 Parte experimental

Para a realização deste teste foi selecionado o indivíduo de *N. megapotamica* F5 do segundo local de coleta, localizada próxima ao km 318 da BR-158, em Santa Maria-RS. A composição química do OE deste espécime assemelha-se à apresentada pelos OE do grupo químico 5 (GQ5), descrito por Amaral et al. (2014b). Folhas frescas do mesmo foram coletadas em março de 2014, e o OE foi obtido por hidrodestilação (SARTOR, 2009), processo no qual foram adotados os critérios descritos por Tondolo et al. (2013) e Amaral et al. (2014a, b). O OE foi analisado por cromatografia gasosa com espectrometria de massa acoplada (CG-EM) e por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (DIC). Maiores detalhes sobre estas análises podem ser encontrados no manuscrito 1. Foi utilizada também a Isolemicina (Fenilpropanoide) obtida pelo fracionamento do OE, descrito anteriormente para obtenção do constituinte isolado.

Os ensaios foram realizados com indivíduos juvenis de jundiás (*Rhamdia quelen*). Os peixes utilizados eram do mesmo lote (aproximadamente 200 indivíduos), fornecidos por um produtor local. Os mesmos foram transportados até o Laboratório de Fisiologia de Peixes para aclimação (período de uma semana). Os mesmos foram colocados em reservatório com capacidade de 250 L de água com aeração constante. A água do reservatório foi trocada diariamente e os animais foram alimentados uma vez ao dia, geralmente pela manhã. Os parâmetros da água no dia do teste foram oxigênio 7,7 mg L⁻¹, temperatura 28,4° C e pH 7,9.

Os estágios de indução à anestesia foram avaliados de acordo com Small (2003) e Silva et al. (2012). Os estágios foram, T1 – sedação leve; T2 – sedação profunda (ambas envolvem perda de resposta gradativa a estímulos externos); T3 - perda parcial de equilíbrio (a), perda total de equilíbrio e de locomoção (b); T4 – anestesia profunda (estado estático); T5 – colapso medular (morte dos peixes). Os peixes juvenis foram transferidos individualmente para aquários com capacidade de 1 L de água e o OE, primeiramente diluído em etanol (1:10), que foi adicionado ao banho nas concentrações de 100, 150, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹. Estudos anteriores demonstraram que o etanol utilizado para diluição não apresenta efeito anestésico (CUNHA et al., 2010). No ensaio também foi avaliado o eugenol como controle

positivo (50 mg L^{-1}). O mesmo procedimento foi adotado para a isoelemicina, que foi avaliada nas concentrações de 4,5 e $12,5 \text{ mg L}^{-1}$, valores correspondentes ao seu teor no OE utilizado, respectivamente nas concentrações de 100 e 500 mg L^{-1} .

Foram utilizados 10 indivíduos juvenis de jundiá para cada grupo experimental, e cada animal foi utilizado apenas uma vez. O tempo máximo de observação foi de 30 minutos para indução e também para recuperação. Os peixes tiveram o comprimento (cm) e peso (g) mensurados antes de serem levados para o banho de recuperação. Estes dados mostraram que os peixes eram de um lote relativamente padronizado (comprimento médio 9,64 cm, desvio padrão de 1,13, CV% de 11,71; peso médio 9,33 g, desvio padrão de 2,28, CV% 24,40). Depois de recuperados os peixes foram agrupados de acordo com o protocolo experimental e transferidos para aquários aerados de 40 L, onde foram observados por 48 h, a fim de serem avaliados quaisquer sinais de comportamento anormal, doenças ou mortalidade.

Foi utilizada a análise estatística não paramétrica com uso do teste de Kruskal-Wallis, similar a análise de variância de uma via (MOORE e McCABE, 2002), devido ao fato dos dados não atenderem aos pressupostos da análise de variância – ANOVA (homogeneidade de variância, normalidade e independência dos resíduos). Para a comparação múltipla dos postos médios foi utilizado o teste de Dunn.

6.4.2 Resultados

A composição química do OE obtido está descrita na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição química do OE de folhas frescas de *N. megapotamica*.

Constituintes	Tipo	IK Exp.	IK Tab.	Fonte	Valores (%)
α -Pineno	HM	927,90	930	N	14,09
Canfeno	HM	942,48	943	N	0,94
NI	NI	968,20	----	----	0,70
β -Pineno	HM	970,43	974	N	12,19
β -Mirceno	HM	986,81	991	N	0,72

Tabela 4 continua na próxima página

Constituintes	Tipo	IK Exp.	IK Tab.	Fonte	Valores (%)
Limoneno	HM	1023,40	1026	N	5,41
β - <i>E</i> -Ocimeno	HM	1044,34	1040	N	0,60
γ -Terpineno	HM	1054,33	1056	N	0,15
Terpinoleno	HM	1083,50	1085	N	0,43
β -Linalol	MO	1095,62	1099	N	0,12
Terpineol	MO	1173,22	1176	N	0,21
NI	NI	1182,31	----	----	0,11
α -Terpineol	MO	1186,62	1190	N	0,12
NI	NI	1282,12	----	----	0,18
NI	NI	1323,89	----	----	0,16
δ -Elemeno	HS	1333,72	1337	N	1,55
α -Cubebeno	HS	1346,21	1345	N	0,11
Copaeno	HS	1372,86	1376	N	0,46
β -Bourboneno	HS	1382,13	1383	N	0,30
β -Elemeno	HS	1388,56	1392	N	1,03
Cipereno	HS	1397,06	1399	A	0,11
NI	NI	1407,83	----	----	0,14
α -Gurjuneno	HS	1411,85	1409	N	0,12
Cariofileno	HS	1417,03	1420	N	2,48
β -Gurjuneno	HS	1426,39	1427	N	0,44
β -Copaeno	HS	1432,35	1432	A	0,38
τ -Elemeno	HS	1436,77	1434	N	1,13
NI	NI	1441,06	----	----	0,53
NI	NI	1448,20	----	----	0,21
α -Cariofileno	HS	1451,41	1452	N	0,68
NI	NI	1457,01	----	----	0,24
NI	NI	1458,94	----	----	0,19
NI	NI	1460,77	----	----	0,23
γ -Muuroleno	HS	1473,77	1474	N	0,67
Germacreno D	HS	1478,91	1483	N	11,72
α -Selineno	HS	1488,47	1488	N	0,32
Biciclogermacreno	HS	1494,50	1500	A	26,96
β -Bisaboleno	HS	1504,13	1506	A	0,68
Cadina-1(10),4-dieno	HS	1520,19	1526	N	1,34
NI	NI	1527,56	----	----	0,35
<i>E</i> -Cadina-1(2),4-dieno	HS	1535,03	1535	A	0,11
<i>E</i> - γ -Bisaboleno	HS	1537,14	----	----	0,21
NI	NI	1545,82	----	----	0,25
NI	NI	1551,38	----	----	0,27
NI	NI	1555,57	----	----	0,24
Elemicina	F	1558,68	1557	A	0,28

Tabela 4 continua na próxima página

Constituintes	Tipo	IK Exp.	IK Tab.	Fonte	Valores (%)
E-Nerolidol	SO	1565,66	----	----	0,56
NI	NI	1575,62	----	----	1,10
Espatulolol	SO	1582,23	1578	A	1,11
Globulol	SO	1589,94	1585	N	1,05
Viridiflorol	SO	1595,19	1595	N	0,21
NI	NI	1599,86	----	----	0,31
Z-Asarona	F	1620,71	1617	A	0,29
α -Muurolol	SO	1639,75	1646	A	0,50
4,6-Dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido	F	1646,16	1654	A	4,47
NI	NI	1651,91	----	----	0,56
Total Identificado					94,25
Hidrocarbonetos Monoterpênicos (HM)					34,54
Monoterpenoides Oxigenados (MO)					0,44
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos (HS)					50,81
Sesquiterpenoides Oxigenados (SO)					3,43
Fenilpropanoides (F)					5,03
Não Identificados (NI)					5,75
Total					100,00

Legenda: IK - Índice de Kovatz; Exp. - experimental; Tab. - tabelado; N (NIST, 2009); A (ADAMS, 2010).

As análises dos dados resultantes da atividade anestésica foram iniciadas a partir do estágio T2, em função da dificuldade de diferenciação entre este e o estágio T1. De uma maneira geral as concentrações mais elevadas levaram menos tempo para induzir os estágios mais avançados de sedação e anestesia (Figuras 6, 7 e 9). Todas as concentrações de OE utilizadas, bem como as duas concentrações de isoelemicina e o eugenol, induziram os estágios T2 (Figura 6 – Estágio T2) e T3(a) (Figura 6 – Estágio T3(a)). A indução do estágio T3(b) não foi observada para as concentrações 100 e 150 mg L⁻¹ do OE, e também para a isoelemicina nas concentrações utilizadas (Figura 7 – Estágio T3(b)). Porém as percentagens de peixes afetados pelo OE neste estágio foram de 50; 40 e 80%, respectivamente para as concentrações de 200, 300 e 400 mg L⁻¹. Já o OE na sua maior concentração e o eugenol induziram 100% dos peixes para o estágio T3(b). O estágio T4 foi observado apenas na concentração de 500 mg L⁻¹ do OE e para o eugenol (Figura 7 – Estágio T4). O primeiro, afetou 80% dos peixes, que apresentaram estado estático (Figura 8), e necessitou de maior tempo para apresentar efeito. Já o segundo, induziu este estágio em todos os peixes tratados em menor tempo, e foi estatisticamente superior ao OE. Não houve indução para o estágio T5.

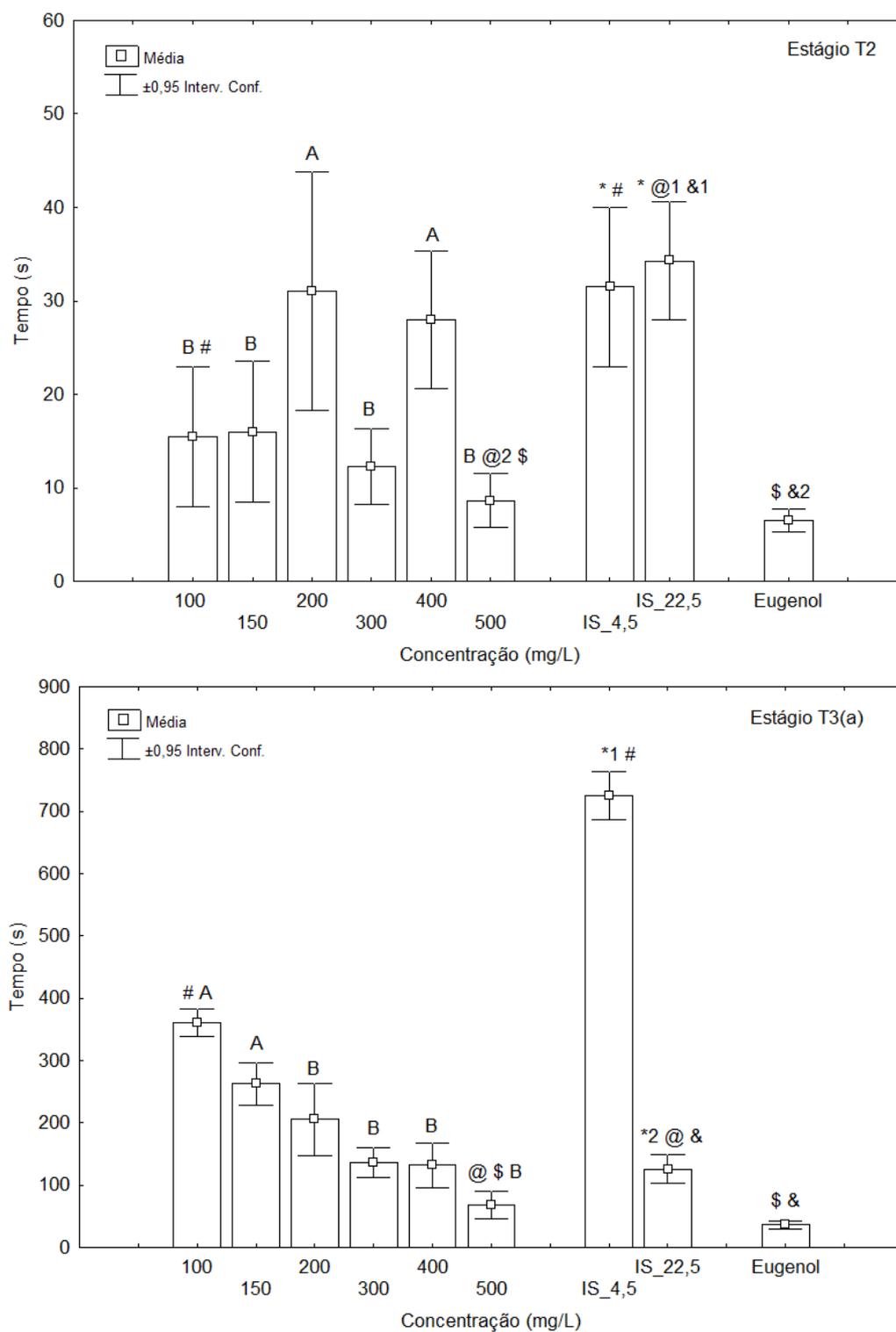


Figura 6 - Estágios T2 e T3(a) do teste de atividade anestésica para diferentes concentrações do OE de *N. megalotamica* e isoelemicina aplicados em *R. quelen*.

Legenda: Comparções Teste de Dunn ($p < 0,05$): * - IS_4,5 x IS_22,5; # - IS_4,5 x 100 OE; @ - IS_22,5 x 500 OE; \$ - 500 OE x Eugenol; & - 22,5_IS x Eugenol; A, B - 500 OE x demais concentrações; Letras diferentes e caracteres com números diferentes indicam diferença significativa; IS - isoelemicina; OE - óleo essencial.

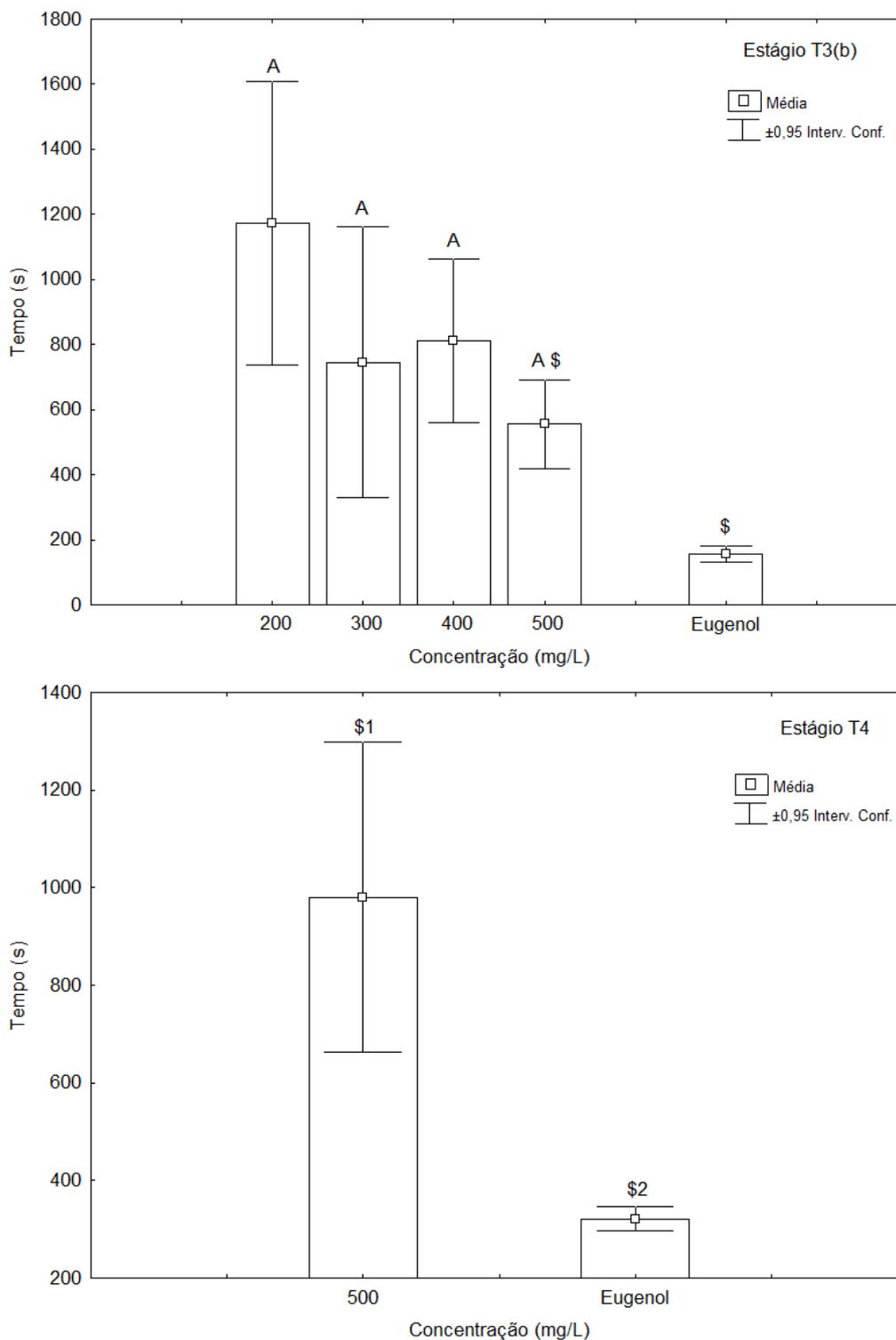


Figura 7 - Estágios T3(b) e T4 do teste de atividade anestésica para diferentes concentrações do OE de *N. megapotamica* e isoelemicina aplicados em *R. quelen*.

Legenda: Comparções Teste de Dunn ($p < 0,05$): \$ - 500 OE x Eugenol; A, B - 500 OE x demais concentrações; Letras diferentes e caracteres com números diferentes indicam diferença significativa; IS - isoelemicina; OE - óleo essencial.

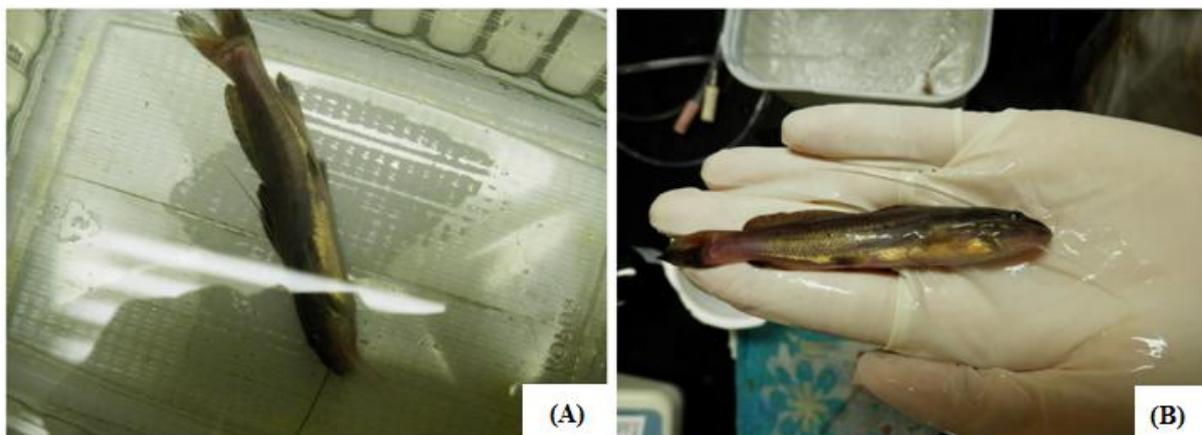


Figura 8 - *Rhandia quelen* em estágio T4 sob concentração de 500 mg L⁻¹ de OE de *N. megapotamica* similar aos do GQ5, dentro do aquário contendo o banho (A) e fora do aquário (B) para medida do comprimento e pesagem.

Fonte: Autor.

Os peixes induzidos aos estágios mais avançados de anestesia pelos tratamentos utilizados necessitaram de maior tempo para serem considerados recuperados (Figura 8 – Recuperação). Para a concentração de 400 mg L⁻¹ do OE, apenas 20% dos peixes se recuperaram dentro do limite de tempo estabelecido (30 minutos). Porém, não foi observada mortalidade de peixes 48 horas após a aplicação dos tratamentos.

Os testes apontaram que o OE apresentou toxicidade, devido ao fato dos peixes terem apresentado agitação intensa, também observada nos testes de ação inseticida com percevejos da soja (*Nezara viridula*), perda de muco, defecação e regurgitação. Esses sintomas foram mais intensos com o aumento da concentração do OE aplicado, e mais perceptíveis nas concentrações de 400 e 500 mg L⁻¹ do mesmo, bem como na maior concentração de isoelemicina (22,5 mg L⁻¹).

A isoelemicina apresentou resultado inferior ao do eugenol (controle positivo) e até mesmo em relação ao OE, principalmente em relação as maiores concentrações do mesmo. Sua atividade estimulou apenas os estágios T2 e T3(a), em que a perda de equilíbrio foi pouco pronunciada. Isso demonstra a sua baixa atividade anestésica sobre os indivíduos de jundiás avaliados. Porém, foi o tratamento onde os sintomas de toxicidade foram mais intensos (perda de muco, defecação e regurgitação). Apenas a agitação foi de menor intensidade em relação ao OE.

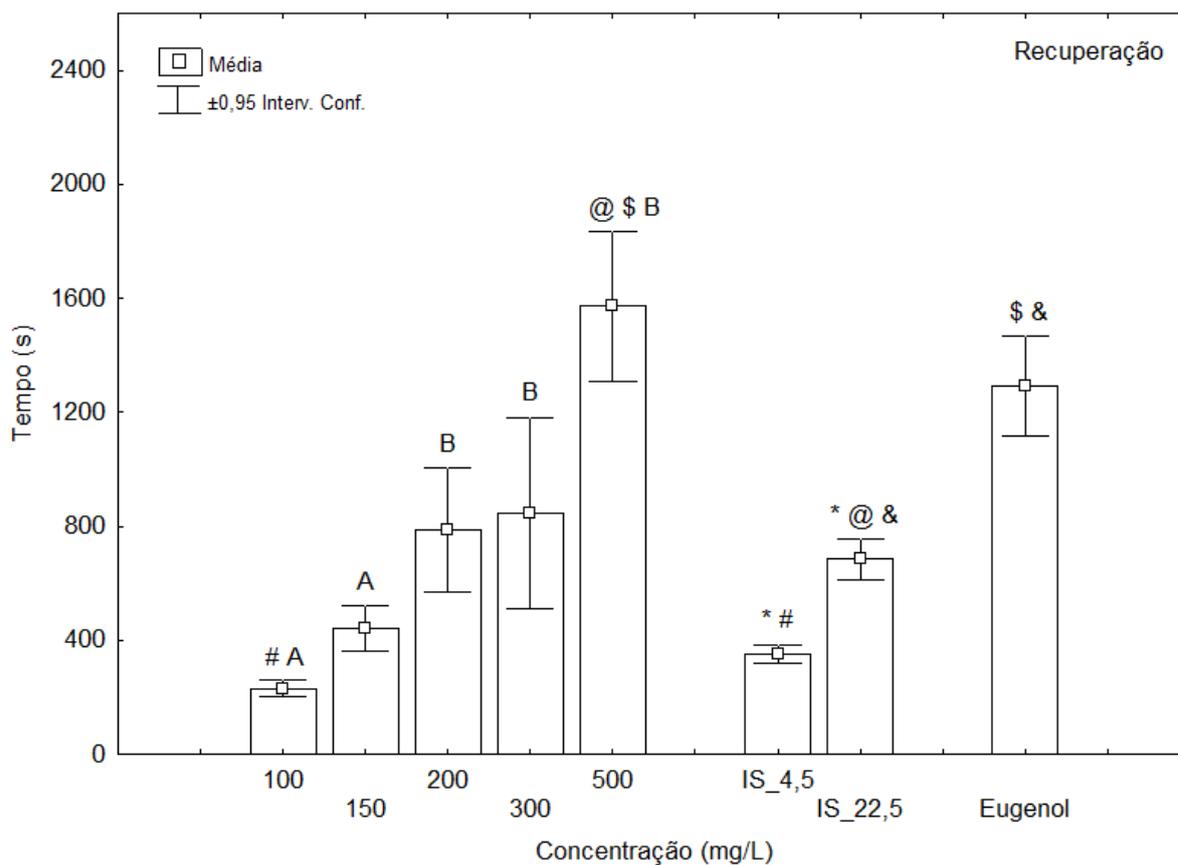


Figura 9 - Tempo de recuperação do teste de atividade anestésica para diferentes concentrações do OE de *N. megapotamica* e isoelemicina aplicados em *R. quelen*.

Legenda: Comparções Teste de Dunn (p0,05): * - IS_4,5 x IS_22,5; # - IS_4,5 x 100 OE; @ - IS_22,5 x 500 OE; \$ - 500 OE x Eugenol; & - 22,5_IS x Eugenol; A, B – 500 OE x demais concentrações; Letras diferentes e caracteres com números diferentes indicam diferença significativa; IS – isoelemicina; OE – óleo essencial.

7 DISCUSSÃO GERAL

A composição química do óleo essencial (OE) de folhas frescas dos indivíduos de *Nectandra megapotamica* amostrados é o ponto em comum que integra os resultados obtidos neste trabalho. A sua determinação, bem como o conhecimento dos fatores responsáveis por sua variabilidade são importantes, pois podem determinar o potencial quanto à atividade biológica que os diferentes perfis químicos podem apresentar.

Segundo Lima et al. (2003) um dos fatores mais relevantes no estudo de atividade biológica de OE é a sua composição química, pois esta pode variar muito em uma mesma planta devido a diversas causas, tais como as relatadas por Gobbo-Neto e Lopes (2007), relacionadas ao meio ambiente e às relações com as demais espécies presentes na área. Apesar do rendimento médio do OE de folhas desta espécie, considerando-se as duas áreas de coleta, ser de aproximadamente 0,15%, não caracterizando um valor adequado para sua obtenção em escala comercial, o mesmo constitui uma fonte interessante de moléculas bioativas, como demonstrado nos resultados obtidos neste trabalho, que podem também apresentar novos mecanismos de atividade biológica.

O primeiro artigo demonstrou a variabilidade sazonal e a influência fenológica da espécie sobre o rendimento e composição química majoritária do OE de folhas frescas, jovens e velhas. Os maiores rendimentos do OE, considerando-se as duas áreas de coleta, foram obtidos na primavera e no verão, ao passo que os menores rendimentos foram observados no outono e no inverno. Foi constatado, também, que as folhas jovens produziram mais OE do que as folhas velhas. Estas são informações importantes e podem dar embasamento ao planejamento do manejo da espécie, caso haja uso futuro para produção de OE, em cultivos para a produção de biomassa com foco na obtenção de folhas jovens, mediante o estímulo às brotações laterais das cepas (epicórnica), a exemplo do que já é realizado em cultivos de espécies do gênero *Eucalyptus* quando voltado para obtenção de OE (VITTI e BRITO, 2003). Já para os espécimes ocorrentes em fragmentos florestais nativos, a desrama ou poda seria a técnica mais indicada para a obtenção de material vegetal, por não envolver o abate da árvore, a exemplo do que já é feito com a erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill. (MARQUES, 2012).

O segundo artigo demonstra que os OE dos espécimes avaliados no Morro do Elefante em Santa Maria-RS podem ser considerados fenótipos químicos pela similaridade da

composição dos mesmos dentro dos respectivos grupos, e pela dissimilaridade entre os distintos grupos formados. Foram obtidos dois grandes grupos, o do α -pineno, que inclui o GQ2, e o do biciclogermacreno. Neste último, foi observada a presença dos isômeros *E*- e *Z*-Asarona, além de outras estruturas similares às mesmas, que formaram um grupo distinto dos demais (GQ5) em uma segunda comparação. Já o manuscrito 1 e os resultados adicionais, descrevem o rendimento e a composição química dos OE de uma segunda população (próxima ao km 318 da BR 158), os quais foram compatíveis com as características dos OE obtidos na primeira área de coleta, bem como os resultados para testes de atividade biológica para os OE dos grupos químicos 2 e 5, o isolamento e teste de atividade biológica para a isoelemicina, substância da classe dos fenilpropanoides.

No manuscrito 1, para a composição química de OE dos GQ2 e GQ5, além de se utilizar CG-EM, a quantificação dos componentes foi obtida por detecção com ionização em chama. Novamente, as diferenças químicas entre os grupos foi demonstrada. O OE do GQ5 apresentou derivados de estrutura fenilpropanoide, que ocorreram apenas na forma de traços no GQ2. Entre os fenilpropanoides presentes no GQ5 observaram-se os isômeros *E* e *Z*-asarona, 4,6-dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodióxido, isoelemicina e uma substância não identificada, mas de estrutura semelhante àquela presentes nestas substâncias.

A síntese de fenilpropanoides é resultante da expressão dos genes que codificam a enzima fenilalanina amônia liase (PAL), cujo o aumento é relacionado a diversas formas de estresse sofridos pelas plantas (PAIVA E DIXON, 1995; DÍAZ e MERINO, 1997; MARCHIOSI et al., 2009; HUSSAIN et al., 2010). Langaro et al. (2010) observaram em folhas de nabo (*Raphanus* spp.), oito horas após a aplicação do herbicida isoxaflutole, o aumento na expressão do gene que codifica a enzima PAL, mediante o estresse causado pelo herbicida. Isso poderia explicar, por exemplo, porque os isômeros da Asarona não estavam presentes no OE do indivíduo F5 pertencente ao segundo local de coleta, na análise realizada em março de 2011, sendo posteriormente detectados em março de 2014. Uma vez que a síntese de fenilpropanoides parece depender do nível de estresse, relacionado às condições locais, em que os mesmos se encontravam no momento de coleta, esse fato pode ser indicativo de que o indivíduo estava sofrendo um estresse maior quando da coleta em 2014.

Ainda no manuscrito 1, foram observadas atividade alelopática (inibição da germinação e do desenvolvimento de plântulas) superior para o OE do grupo químico 5 em relação ao grupo 2, em testes realizados com arroz (cultura agrícola). No entanto, OE dos dois grupos químicos apresentaram atividade alelopática nos testes realizados com todas as

espécies utilizadas, picão-preto e azevém (plantas daninhas), alface e aveia-preta (espécies bioindicadoras), soja e arroz (culturas agrícolas).

Já os resultados adicionais demonstram a atividade inseticida do OE de folhas frescas de *N. megapotamica* em percevejos da soja. O OE do GQ5 foi mais ativo do que aquele do GQ2, provavelmente, devido à composição química diferenciada, em função da presença de fenilpropanoides. Porém, este teste deve ser novamente realizado, com um maior número de repetições, para maior segurança estatística. A dependência de insetos coletados no ambiente, mais especificamente sua escassez, não permitiu a sua repetição até o presente momento.

Diferentes atividades biológicas foram descritas para os isômeros da asarona. Lahlou (2004) relatou o efeito antialimentar dos dois isômeros desta molécula para a lagarta *Peridroma saucia* Hubner (Lepidoptera), mas o isômero *E*-asarona mostrou-se mais ativo. Para o mesmo, foi observado adicionalmente, inibição do crescimento em larvas de primeiro, terceiro e quarto ínstares da lagarta sob dieta artificial. Santos et al. (2011) descreveram o efeito inibitório do OE das folhas do OE de *Piper marginatum* L. contendo *Z*- e *E*-asarona (30,4 e 6,4 %, respectivamente) sobre o crescimento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* Schlecht.

Coitinho et al. (2010) relataram alta atividade inseticida do OE das folhas e frutos de *Piper marginatum* contendo *Z*-asarona, considerado mais eficaz em relação a outros OEs avaliados, por agir em até 120 dias no controle do gorgulho (*Sitophilus zeamais* Mots. - Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. Park et al. (2003) descreveram a atividade inseticida de *Z*- e *E*-asarona obtidas de rizomas de *Acorus gramineus* em três pragas de produtos armazenados, *Sitophilus oryzae* (L.), *Callosobruchus chinensis* (L.) e *Lasioderma serricorne* (F.), todos da família Coleoptera. Os autores obtiveram maior eficácia no controle com *Z*-asarona. Já Ciccia et al. (2000) utilizaram *Z*-asarona como controle positivo para comparar extratos de plantas medicinais sulamericanas no controle de larvas de *Aedes aegypti*. Pickett (1996) descreve uma metodologia para captura de insetos utilizando *E*-asarona como substância atrativa em armadilhas.

O teor de *Z*-asarona é controlado em alimentos e bebidas, entre outros produtos, na Europa (DEMYTTENAERE, 2012), sendo permitido de 0,1 a 1 mg kg⁻¹ dependendo da natureza do produto, devido aos seus efeitos biológicos adversos sobre o organismo humano (SCF, 2002). Existem processos para conversão de *Z*- em *E*-asarona a partir do OE de *Acorus calamus* (SINHA et al., 2003. WO03082786, US6590127), havendo patente para um processo

de isomerização de alquênil alcoxibenzenos, entre eles *Z*-asarona, visando a transformação no isômero *E*- (KHUN et al., 2007. US20070073089).

A atividade inseticida descrita nos resultados adicionais é complementada pelo trabalho desenvolvido por Silva et al. (2014), para o qual duas amostras de OE de *N. megapotamica* obtidas no presente trabalho foram disponibilizadas, sendo uma amostra de OE de folhas frescas pertencente ao GQ2 (rico em mono- e sesquiterpenoides), e uma amostra de OE de cascas frescas, que poderiam ser classificadas no GQ5 (rico em sesquiterpenoides, com presença de fenilpropanoides). Os autores testaram amostras de OE, obtidos de algumas espécies, em larvas da ordem Odonata classificadas na família Coenagrionidae. Ao final do experimento (19 h), o OE de cascas foi mais ativo (60% bc) do que o de folhas (20% de), resultado estatisticamente superior (Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$). Porém, em relação aos demais OE avaliados, o mesmo apresentou percentagem de mortalidade intermediária, além de levar mais tempo para apresentar atividade em meio aquoso (6 h).

Quanto ao teste de atividade inseticida realizado com percevejos da soja, considera-se que o mesmo apresentou efeito mais pronunciado para o OE do GQ5 em relação ao do GQ2. Foi observada mortalidade de 46,67% para o primeiro grupo e 14,44% para o segundo, 24 horas após a aplicação dos tratamentos.

Já para o teste de atividade anestésica em *Rhamdia quelen*, foi observado que na composição química do OE obtido, houve predomínio de sesquiterpenoides (54,24%), do quais faz parte o biciclogermacreno, componente majoritário (26,96%). Devido à presença de fenilpropanoides (5,03%), incluindo *Z*- e *E*-asarona que não estavam presentes na composição determinada em 2012, este OE induziu o estágio T4, na concentração de 500 mg L⁻¹, juntamente com efeitos de toxicidade. O referido OE assemelha-se àqueles do GQ5 e difere daqueles utilizados por Tondolo et al. (2013) no teste de anestesia em robalo-peva (*Centropomus parallelus*), pesquisa que, também, utilizou OE obtidos no presente trabalho, mas que diferem do grupo químico 5, por não apresentar fenilpropanoides na sua composição química. Os referidos autores utilizaram OE de folhas jovens e velhas de *N. megapotamica* e observaram a indução do estágio T4 em robalos-peva, na concentração de 450 µL L⁻¹ do OE de folhas jovens. Estes OE não apresentaram fenilpropanoides na sua composição química, e possuíam altos teores, respectivamente para folhas jovens e velhas de biciclogermacreno (46,5/34,6), α -pineno (26,8/26,2) e β -pineno (7,9/12,3) e germacreno D (9,6/9,1). Os autores também observaram indução parcial dos estágios mais avançados de sedação e anestesia em concentrações baixas e/ou intermediárias deste OE.

O composto isolado do OE do GQ5 foi identificado por RMN como isoelemicina, um fenilpropanoide. Garcez et al. (2009) já a tinham, anteriormente, isolado, juntamente com outros três fenilpropanoídes, a partir de extratos etanólicos de cascas de *N. megapotamica*, em espécime ocorrente em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os autores também observaram atividade antifúngica *in vitro* dos mesmos para cepas padrão de leveduras (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*). Já nos testes de atividade antioxidante com o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e β -caroteno/ácido linoléico, a isoelemicina não apresentou atividade no primeiro teste, por não conter hidroxilas fenólicas, e no segundo, foi a substância que apresentou a menor capacidade de prevenir ou impedir a oxidação do β -caroteno.

Alguns fenilpropanoídes, como os isômeros da asarona, tem por característica apresentarem toxicidade (DEMYTTENAERE, 2012). A *E*-isoelemicina presente no OE de folhas frescas ou secas de *Backhousia myrtifolia* Hook, espécie arbórea que ocorre no leste da Austrália, é considerada genotóxica e carcinogênica. A espécie possui uso etnobotânico pelos aborígenes (infusão de folhas), que devem evitar o uso de espécimes que sintetizam este fenilpropanoíde (HEGARTY et al., 2001). Outros fenilpropanoídes bioativos, a exemplo do fipronil e do piriprol, e até mesmo a *Z*-asarona, são utilizados como inseticidas (CICCIA et al., 2000; BUCKINGHAM et al., 2005; SILVA et al., 2010). Por outro lado, o Eugenol, que também é um fenilpropanoide, além de ser utilizado em odontologia para assepsia do canal dentário, vem sendo empregado como controle positivo em testes de atividade anestésica, sem apresentar toxicidade (KILDEA et al., 2004; INOUE et al., 2011; ANUSAVICE et al., 2013).

Tondolo et al. (2013) consideram que, provavelmente, a atividade sedativa e anestésica do OE de *N. megapotamica* em seu experientio, tenha sido causada pelos monoterpenos α - e β -pineno, para os quais existem descrições na literatura de efeitos sedativos e anestésicos (KASANEN et al., 1998; ERAZO et al., 2006; MERCIER et al., 2009).

Da mesma forma que o eugenol, vários componentes dos OE agem como sedativos e/ou anestésicos através da interação com receptores GABA, ácido gama-aminobutírico (neurotransmissores excitatórios que possuem canais de glutamato regulados por cloro, os quais podem ser modulados por várias substâncias). Estes receptores são reconhecidos como importantes alvos para modulação por sedativos, ansiolíticos e agentes anestésicos em geral (FRANKS e LIEB, 1994), bem como por inseticidas (BUCKINGHAM et al., 2005). O α -pineno é classificado com modulador positivo de receptores GABA (AOSHIMA e

HAMAMOTO, 1999), e os fenilpropanoides, a exemplo do fipronil, apiol, miristicina, eugenol, safrol, dilapiol, dentre outros, também atuam nestes receptores (BUCKINGHAM et al., 2005), bloqueando a passagens de íons cloro.

Apesar dos resultados obtidos com *Rhandia quelen* não poderem ser comparados com aqueles descritos para *Centropomus parallelus*, a interpretação dos dados disponíveis até o momento é de que o OE de *N. megapotamica* utilizado, bem como a isoelemicina isolada de OE do GQ5, apresentaram atividade sedativa, associada à toxicidade. O fato dos resultados observados para o tempo de sedação e anestesia, e recuperação após a aplicação dos mesmos, terem sido inferiores aos considerados ideais para um anestésico de peixes, que segundo Marking e Meyer (1985) são de até três minutos para anestesia e de até cinco minutos para recuperação, reforçam esta constatação. Novos testes serão ainda realizados para dar andamento a esta parte do trabalho, independentemente da conclusão desta tese, para complementar o teste de anestesia.

Aparentemente, as atividades biológicas que fazem uso da característica de toxicidade apresentada pelos OE avaliados, como os testes de atividade inseticida e alelopática, apresentaram resultados mais expressivos em relação à atividade anestésica, em que a componente tóxica constitui um aspecto negativo. Analogia similar também pode ser observada no trabalho de Garcez et al. (2009), em que a isoelemicina apresentou atividade antifúngica, mas não se comportou como um antioxidante. Desta forma, deve-se procurar utilizar a componente de toxicidade observada nos OE para fins benéficos e produtivos, pois com base nos resultados obtidos, ela possui uma intensa bioatividade. Outro aspecto, que também deve ser considerado nos possíveis usos dos constituintes do OE de *N. megapotamica*, é a otimização das moléculas através de modificação de sua estrutura química, como a proposta apresentada por Demarque e Baroni (2009), que descreveram a necessidade de suprimir grupos doadores de elétrons do anel aromático e de alongar a cadeia carbônica lateral de alguns fenilpropanoides, para propiciar fitotoxicidade aos mesmos. Desta forma, recomenda-se a continuidade das pesquisas com o OE de *N. megapotamica* afim de explorar novas possibilidades.

8 CONCLUSÃO

❖ Foram descritas a variabilidade sazonal e influência fenológica no rendimento e composição química majoritária do OE de indivíduos de uma mesma população de *Nectandra megapotamica* em Santa Maria-RS. Também foram avaliadas a produção de OE por folhas jovens (FJ) e velhas (FV), sendo as primeiras mais produtivas. No primeiro local de coleta (Morro do Elefante), a primavera foi a estação em que foi obtido o maior rendimento de OE (FJ 0,24% e FV 0,14%) enquanto no outono, observou-se o menor rendimento (FJ 0,13% e FV 0,11%). Na primavera ocorreram os eventos fenológicos floração, frutificação e foliação. Já no outono ocorreram o repouso vegetativo e reprodutivo, e a rustificação dos órgãos vegetais para o inverno. Os constituintes majoritários foram α -pineno (FJ 25,14% e FV 28,02%) e biciclogermacreno (FJ 24,58% e FV 22,27%). O primeiro apresentou os maiores teores na primavera e no verão (FJ 30,81% e FV 35,86%) e o segundo no outono e no inverno (FJ 24,19% e FV 21,73%). Não foi observada diferença entre a composição química do OE de FJ e FV. No segundo local de coleta (próximo km 318 BR 158), o maior rendimento do OE de folhas frescas foi observado apenas no verão (0,18%) e o menor, no inverno (0,11%). O biciclogermacreno foi o constituinte predominante (27,33%) em relação ao α -pineno (16,45%);

❖ Foi observada a presença de cinco grupos químicos de OE tanto para as FJ quanto para as FV coletadas no Morro de Elefante, detectados por análise de componentes principais e análise de agrupamento hierárquico (técnicas de análise multivariada). Os constituintes majoritários α -pineno e biciclogermacreno influenciaram a formação dos grandes grupos. A presença de fenilpropanoides no grande grupo do biciclogermacreno conferiu a dois indivíduos a maior discrepância em relação aos demais, para os OE de FJ e FV. Foram obtidos 10 componentes principais com valores acima de um, dos quais cinco contém aproximadamente 76,00% da variância total acumulada nos dados. Esta foi a primeira descrição da presença dos isômeros *Z*- e *E*-asarona (fenilpropanoides) no OE de folhas de *N. megapotamica*;

❖ Os OE obtidos para esta espécie classificados em dois grupos químicos (GQ2 e GQ5) apresentaram atividade alelopática (inibição de germinação e de desenvolvimento de plântulas) nas sementes de espécies dicotiledôneas e monocotiledôneas, bioindicadoras de alelopátia alface (*Lactuca sativa*) cultivar Regina e aveia preta (*Avena strigosa*), de plantas daninhas picão-preto (*Bidens subalternans*) e azevém (*Lolium multiflorum*), e, em menor intensidade, nas culturas agrícolas soja (*Glicine max*) e arroz (*Oryza sativa*). Para o arroz houve

diferença entre os GQ2 e GQ5, sendo o último de maior atividade alelopática. Provavelmente, *N. megapotamica* utilize a alelopatia como mecanismo para ocupar os espaços e para competir por recursos na floresta;

❖ Foi observada atividade inseticida, em testes com percevejos da soja (*Nezara viridula*), resultado coincidente com outro trabalho que utilizou OE desta espécie em larvas da ordem Odonata, família Coenagrionidae (libélulas). O OE do GQ5 (46,67%) foi mais ativo em relação ao GQ2 (14,44%) por apresentar maior percentagem de mortalidade de percevejos;

❖ Do OE do GQ5 foi isolado o fenilpropanoide isoelemicina, identificado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN);

❖ Foi observada atividade sedativa em jundiás (*Rhamdia quelen*), associada a uma componente de toxicidade, para o OE similar aos do GQ5 e também para a isoelemicina isolada, resultado inferior ao observado para robalos-peva (*Centropomus parallelus*), em que foi descrita anestesia profunda, em outro trabalho que também utilizou OE desta espécie de composição química divergente a do GQ5;

❖ O OE classificado no GQ5 destacou-se pela maior atividade alelopática (arroz), maior percentagem de mortalidade de percevejos, e toxicidade em jundiás devido à presença de substâncias da classe dos fenilpropanoides, das quais algumas já apresentam relatos de atividade inseticida e de efeito tóxico. Por outro lado, a atividade biológica também detectada para o OE do GQ2 podem ser atribuídas às classes dos monoterpenoides, representada, principalmente, pelo α e β -pineno dentre outros, e dos sesquiterpenoides, representada pelo biciclogermacreno e germacreno D, dentre outros, para os quais a literatura descreve as atividade alelopática, inseticida e anestésica, dentre outras.

Os resultados obtidos permitem aceitar a hipótese básica considerada neste trabalho. Os OE de indivíduos de uma mesma população de *N. megapotamica* apresentaram variabilidade sazonal e comportamento influenciado pela fenologia da espécie, devido à síntese de constituintes distintos. Possivelmente isso ocorra para adaptação a microclimas e às condições ambientais locais que podem gerar diferentes níveis de estresse, o que influencia a ocorrência de fenótipos químicos. Os OE apresentaram atividade biológica que, dependendo da sua composição química e das características inerentes às espécies-alvo, apresentaram ação diferenciada, com superioridade dos fenótipos químicos que continham fenilpropanoides (GQ5) para atividade inseticida, e alelopática em arroz.

Conclui-se que a espécie em questão possui potencial para produção de óleos essenciais, como fonte de novas moléculas e novos mecanismos de ação. O seu possível uso deve explorar

a componente de toxicidade, característica diferencial dos OE avaliados neste trabalho. No entanto, a extração em larga escala ainda não é recomendada, pois não se conhece toda a variabilidade da espécie e a gama de potencial das moléculas contidas no seu OE, que devem ser descritas por novas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil componentes by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy.** 4 ed., Allured Business Media: Carol Stream, 2009, 804 p.

ALIBERTI, L. F.; MORELLATO, L. P. C. Variation on fruit production of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) trees on the edge and interior of a semideciduous forest – a case study. **Naturalia**, Rio Claro, v. 33, p. 57-68, 2010.

ALVES, E. O. et al. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 651-658, 2008.

AMARAL, L. P.; SCHINDLER, B.; BIANCHINI, N. H.; LONGHI, S. J.; ALMEIDA, C. A. A.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Variabilidade da composição química del aceite essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Aceito para publicação em abril de 2014(a).

AMARAL, L. P.; TONDOLO, J. S. M.; SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; PINHEIRO, C. G.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Sazonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, aceito para publicação em junho de 2014(b).

ANUSAVICE, K. J.; SHEN, C.; RAWLS, H. R. **Phillips materiais dentários**. 12 ed., Elsevier Editora: Rio de Janeiro, 2013, 592p.

AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABA(A) receptores expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 743-748, 1999.

APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacologyonline**, Salerno, v. 3, p. 376-383, 2006.

BAITELLO, J. B. et al. Lauraceae. In: WANDERLEI, M. G. L. et al. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Editora Rima, v.3, p.149-223, 2003.

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

BALACHANDRAN, B.; SIVASWAMY, S. N.; SIVARAMAKRISHNAN, V. M. Genotoxic effects of some foods and food components in Swiss mice. **Indian Journal of Medical Research - Section B Biomedical Research Other Than Infectious Diseases**, v. 94, p. 378-383, 1991.

BARROS, C. F. et al. **Madeiras da Mata Atlântica – Anatomia do lenho das espécies remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, 1997, 86 p.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.1, 2002.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2010. 975 p.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas**. Do cultivo à produção de óleo essencial. 1. ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora, 2009, 160 p.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BHUVANESWARI, R.; BALASUNDARAM, C. Anti-bacterial activity of *Acorus calamus* and some of its derivatives against *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 3, n. 7, p. 538-547, 2009.

BRENA, D.; LONGHI, S. J. Inventário florestal. In: ITAQUI, J. (Org.). **Quarta Colônia: Inventários técnicos**. Condesus Quarta Colônia: Santa Maria, 2002, 256 p.

BRITO, A. F. R. **Análise da variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez**. 2009. 121f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BRITO, H. R. **Caracterização química de óleos essenciais de *Spondias mombin* L., *Spondias purpurea* L. e *Spondias sp.* (canjarana do sertão)**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2010.

BRUNETON, J. **Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinais**. Zaragoza: Acribia S. A., 2001.

BUCKINGHAM, S. D. et al. Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. **Molecular Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 942-951, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras. Brasília: EMBRAPA INFORMAÇÕES TECNOLÓGICAS; Colombo: EMBRAPA FLORESTAS, 2006, v. 2. 627 p.

CAVIGLIONE, J. H. et al. **Cartas Climáticas do Paraná**. Londrina: IAPRA, 2000, 1 CD-ROM.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 185-189, 2000.

CICCIÓ, J. F.; CHAVERRI, C.; DÍAZ, C. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 417-420, 2009.

COITINHO, R. L. B. C. et al. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1492-1496, 2010.

CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403 - 406, 2010.

DÍAZ, J.; MERINO, F. Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. Purification and properties. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 147–152, 1997.

DEMARQUE, D. P.; BARONI, A. C. M. Desenho de novos modelos de herbicidas naturais: transformações químicas em derivados de fenilpropanóides e avaliação fitotóxica. In: 10 ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMS, 2009. **Anais ...**, Campo Grande, 2009.

DEMYTTENAERE, J. C. R. The new European Union Flavouring Regulation and its impact on essential oil: production of natural flavouring ingredients and maximum levels of restricted substances. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 3-12, 2012.

ERAZO, S. et al. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 395-400, 2006.

FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general-anesthesia. **Nature**, v. 367, p. 607-614, 2009.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

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

GUENTHER, E. Individual essential oils of the plant Family Myrtaceae. In: **The essential Oils**, Van Nostrand, 4. ed., New York, v. 4, 1977.

HEGARTY, M. P. et al. **Food Safety of Australian Plant Bushfoods**. 2001. 75p. Disponível em <http://www.sgapqld.org.au/bush_food_safety.pdf>. Acesso em 16 jul. de 2014.

HUSSAIN, P. R.; WANI, A. M.; MEENA, R. S.; DAR, M. A. Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanineammonia-lyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus persica* Bausch, Cv. Elberta). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, n. 9, p. 982-989, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, INMET. **Estação convencional de Santa Maria 83936**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_conv_graf>. Acesso em 08 nov. 2014.

INOUE, L. A. K. A. et al. Avaliação de respostas metabólicas do tabaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 327-332, 2011.

KASANEN, J. P. et al. Stereospecificity of the sensory irritation receptor for nonreactive chemicals illustrated by pinene enantiomers. **Archives of Toxicology**, v. 72, p. 514-523, 1998.

KILDEA, J.; ALLAN, G.; KEARNEY, R. Accumulation clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-STM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bityanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.

KRÜGEL, M. M.; BURGER, M. I.; ALVES, M. A. Frugivoria por aves em *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) em um área de Floresta Estacional Decidual no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 96, n. 1, p. 17-24, 2006.

KUHN, W.; FUNK, H.-U.; SENFT, G.; DITTERT, C.; STEPHAN, T. US20070073089. **Process for the Isomerisation of Alkenyl Alkoxybenzenes**. 2007.

LAHLOU, M. Essential oil and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. **Flavour and Fragrance Journal**, Geneva, v. 19, p. 159-165, 2004.

LAMIEN-MEDA, A., SCHIMIDERER, C.; LOHWASSER, U.; BÖRNER, A.; FRANZA, C.; NOVAKA, J. Variability of the essential oil composition in the sage collection of the Genebank Gatersleben: a new viridiflorol chemotype. **Flavour and Fragrance Journal**, Geneva, v. 25, p.75-82, 2010.

LANGARO, A. C. et al. Expressão de genes em nabo após a aplicação do herbicida isoxaflutole. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais eletrônicos....** Ribeirão Preto: SBCPD, p. 421-425, 2010. Disponível em: < http://www.sbcpd.org/portal/anais/XXVII_CBCPD/PDFs/091.pdf>. Acesso em 23 out. 2014.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influence of abiotic factors on terpenoids production and variability in the plant. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 368 p.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 85-89.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacourtiáceas**. Santa Maria: UFSM, 1997. 271 p.

MARCHIOSI, R. et al. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, p. 28–33, 2009.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2-5, 1985.

MARQUES, A. C. et al. Florestas Nacionais e desenvolvimento de pesquisas: o manejo da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. -Hil) na Flona de Três Barra/SC. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 4-17, 2012.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2-5, 1985.

- MARCO, C. A. et al. Influência do estágio fenológico de *Vanillosmopsis arborea* Baker sobre o rendimento e qualidade do seu óleo essencial. **Caderno de Agroecologia**, Camaragibe, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2011.
- MARQUES, C. A. Importância econômica da Família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, Soropédica, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.
- MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220 p.
- MELLO, N. T. K.; DIAS, I. E. C.; YOSHIDA, M. Chemical constituents of *Nectandra saligna* Nees (Lauraceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, n. especial, p. 319, 2005.
- MERCIER, B.; PROST, J.; PROST, M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (alpha- and beta- pinenes): a review. **International Journal of Occupational Medicine Environmental Health**, v. 22, p. 331-342, 2009.
- METCALFE, C. R. **Anatomy of the dicotyledons Magnoliales, Illiciales, and Laurales**. 2. ed., Oxford: Clarendon Press, 224 p., 1987.
- MOORE, D. S.; McCABE, G. P. **Introdução à prática da estatística**. 3 ed., LTC: Rio de Janeiro, 2002, 536 p.
- MURALEEDHARAN, N.; RAFIKALI, M. US 20040028760. **Method of treating inflammation and inflammation-related pain**. 2004.
- PAIVA, R. A.; DIXON, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.
- PARK, C.; KIM, S. -I.; AHN, Y.-J. Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 333-342, 2003.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. ESALQ/USP, Piracicaba, p. 1-10, 2004.
- PICKETT, J. A. WO96029875. **Insect monitoring systems and traps**. 1996.
- PROPERZI, A. et al. Some biological activities of essential oils. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 2, n. 5, p. 1-4, 2013.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Herbário Barbosa Rodrigues, SUDESUL, DRNR, 1988. 525 p.
- ROHWER, J. G. *Lauraceae: Nectandra*. **Flora Neotropica**, New York Botanical Garden, New York, v. 60, 1993.
- SANTOS, M. R. A. et al. Antifungal activity of *Piper marginatum* L. (Piperaceae) essential oil on *in vitro* *Fusarium oxysporum* (SCHLECHT). **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 4, n. 1, p. 9-14, 2011.

SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SCF. Scientific Committee on Food. **Opinion of the Scientific Committee on Food on the presence of β -asarone in flavourings and other food ingredients with flavouring properties**. Bruxelas: Scientific Committee on Food, European Commission, 2002. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out111_en.pdf>. Acesso em: 30 de mai. de 2012.

SIERGIEJCZYK, L. et al. ^1H and ^{13}C NMR spectral analysis of (*E*)-asarone and its isomers. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 1037-1038, 2000.

SILVA, D. T. et al. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. **Journal of Economic Entomology**, aceito em 2014.

SILVA FILHO, A. A. et al. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 42-45, 2004.

SILVA, J. M. et al. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em sedimentos por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com micro detector de captura de elétrons. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 591-597, 2010.

SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91-97, 2012.

SILVA, M.; MEDEIROS, J. D. Anatomia da madeira de canela-preta: *Ocotea catharinense* Mez. (Lauraceae). **INSULA**, Florianópolis, v. 29, p. 67-87, 2000.

SIMÕES, L. N.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004, p. 467-495.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed., Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

SINHA, A. K.; ACHARYA, R.; JOSHI, B. P. WO03082786. **Process for the preparation of pharmacologically active alpha-asarone from toxic beta-asarone rich *Acorus calamus* oil**. 2003.

SINHA, A. K.; JOSHI, B. P.; ACHARYA, R. US6590127. **Process for the preparation of pharmacologically active α -asarone from toxic β -asarone rich *Acorus calamus* oil**. 2003.

SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p. 177-185, 2003.

SOSSA-GÓMEZ, D. R. et al. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. EMBRAPA Soja: Londrina, 2010, 90 p.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 14, n. 1, p. 15-25, 2000.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2008. 222 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Artimed, 2004. 719 p.

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

TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, p. 1-5, 2005.

TONDOLO, J. S. M. et al. Anesthesia and transport of fast snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 667-6674, 2013.

TONINI, H.; FINGER, C. A. G.; SCHNEIDER, P. R. O crescimento da *Nectandra megapotamica* Mez., em floresta nativa na depressão central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 85-90, 2003.

TORRES, A. M. et al. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2014.

VAREJÃO-SILVA, M. A. **Meteorologia e climatologia**. 2 ed., Recife, 2006, 449 p.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. IPEF: Piracicaba, Documentos Florestais, n. 17, 2003, 26 p.

WICHTL, M. Cancerogenic substances in higher plants [CONCEROGENE SUBSTANZEN IN HOHEREN PFLANZEN]. **Pharmazeutische Zeitung**, v. 134, n. 27, p. 9-16, 1989.

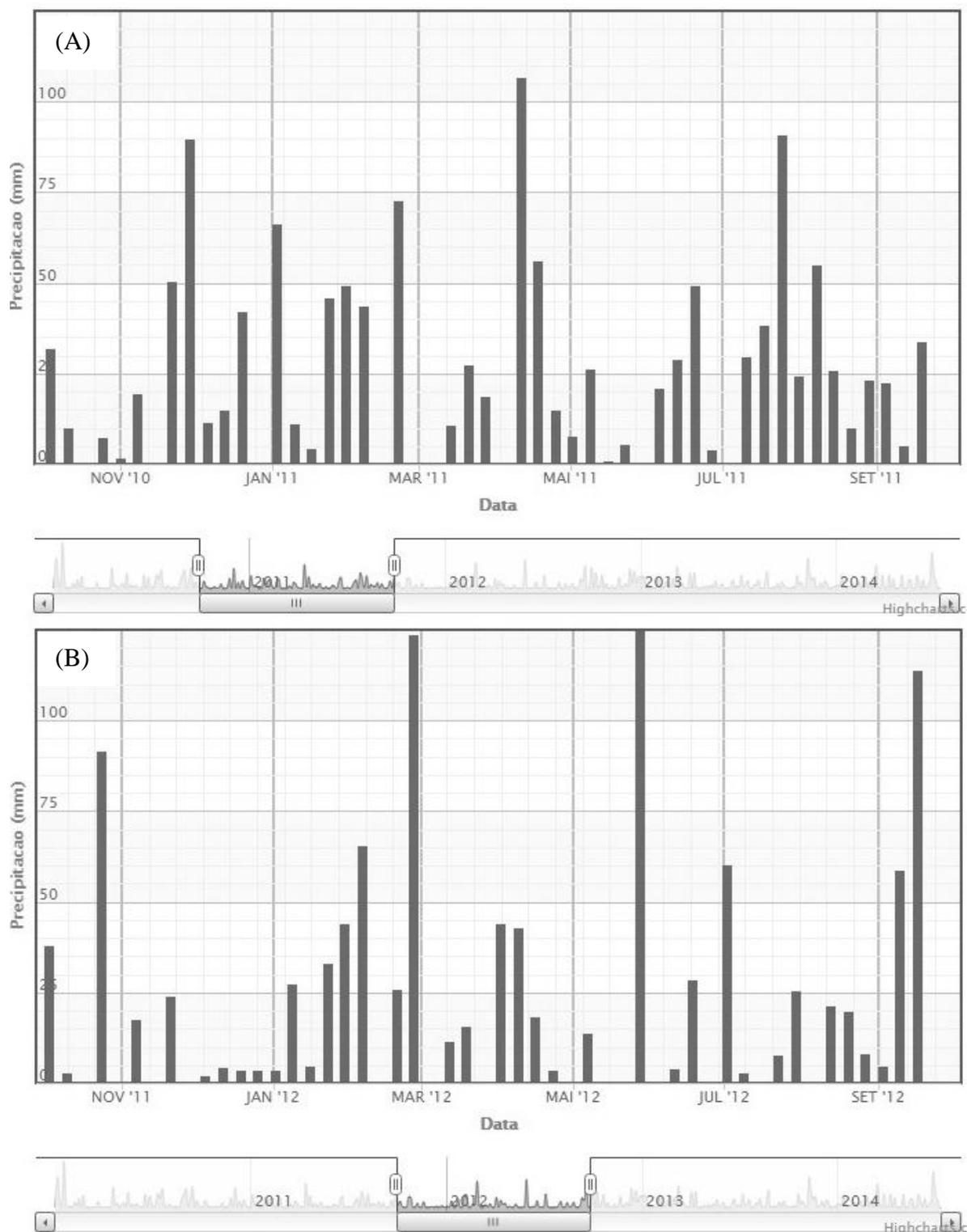
WERKA, J.; BOEHME, A.; SETZER, W. N. Biological activities of essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Products Communications**, v. 2, n. 12, p. 1215-1219, 2007.

WREGGE, M. S. et al. **Atlas climático da Região Sul do Brasil**: Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Pelotas/Colombo: EMBRAPA Clima Temperado/Florestas, 2011. 333 p.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Óleos essenciais. **Informativo CRQ-V**, v. 11, n. 105, p. 6-7, 2007.

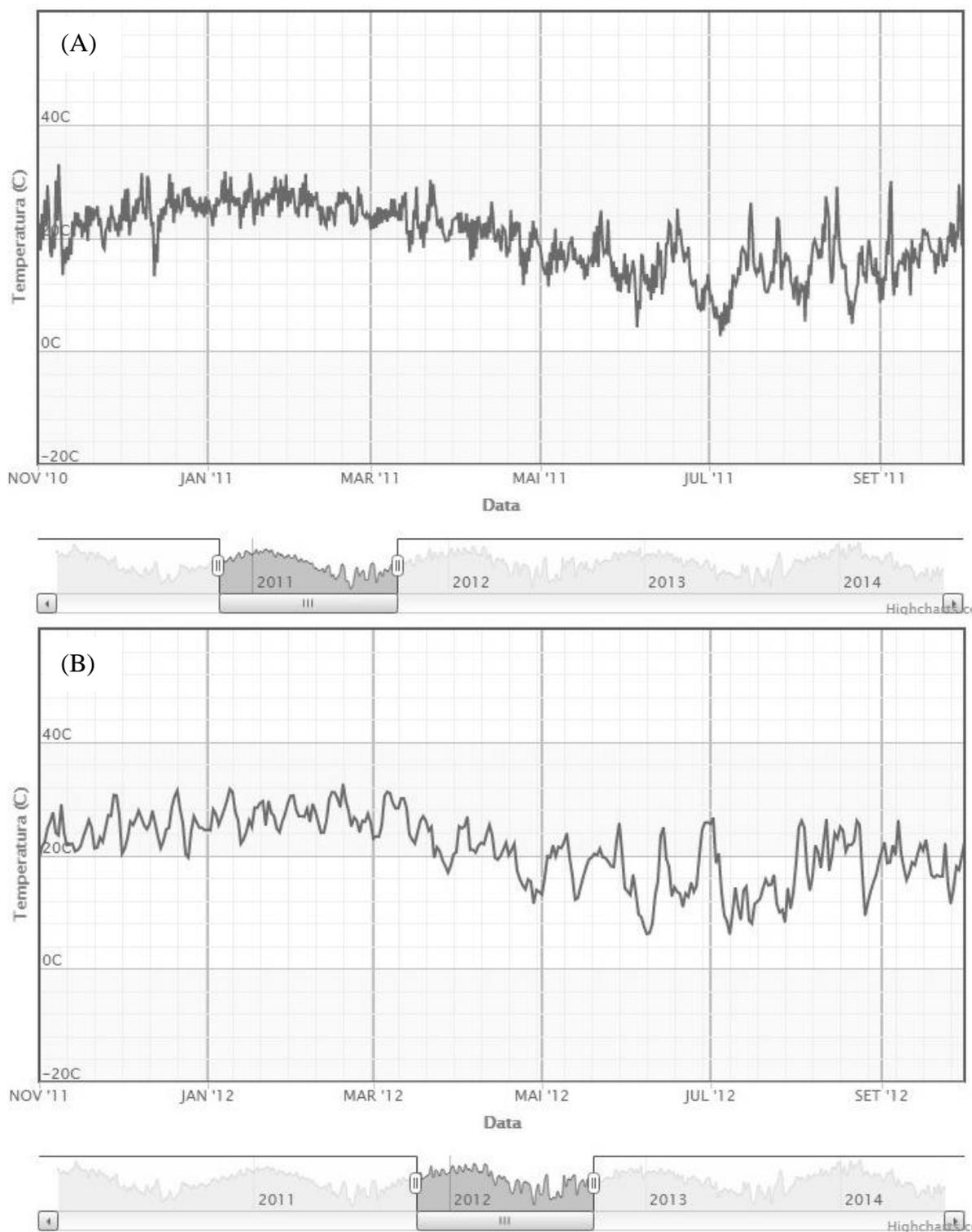
ANEXOS

Anexo 1 - Precipitação (mm) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 - B)



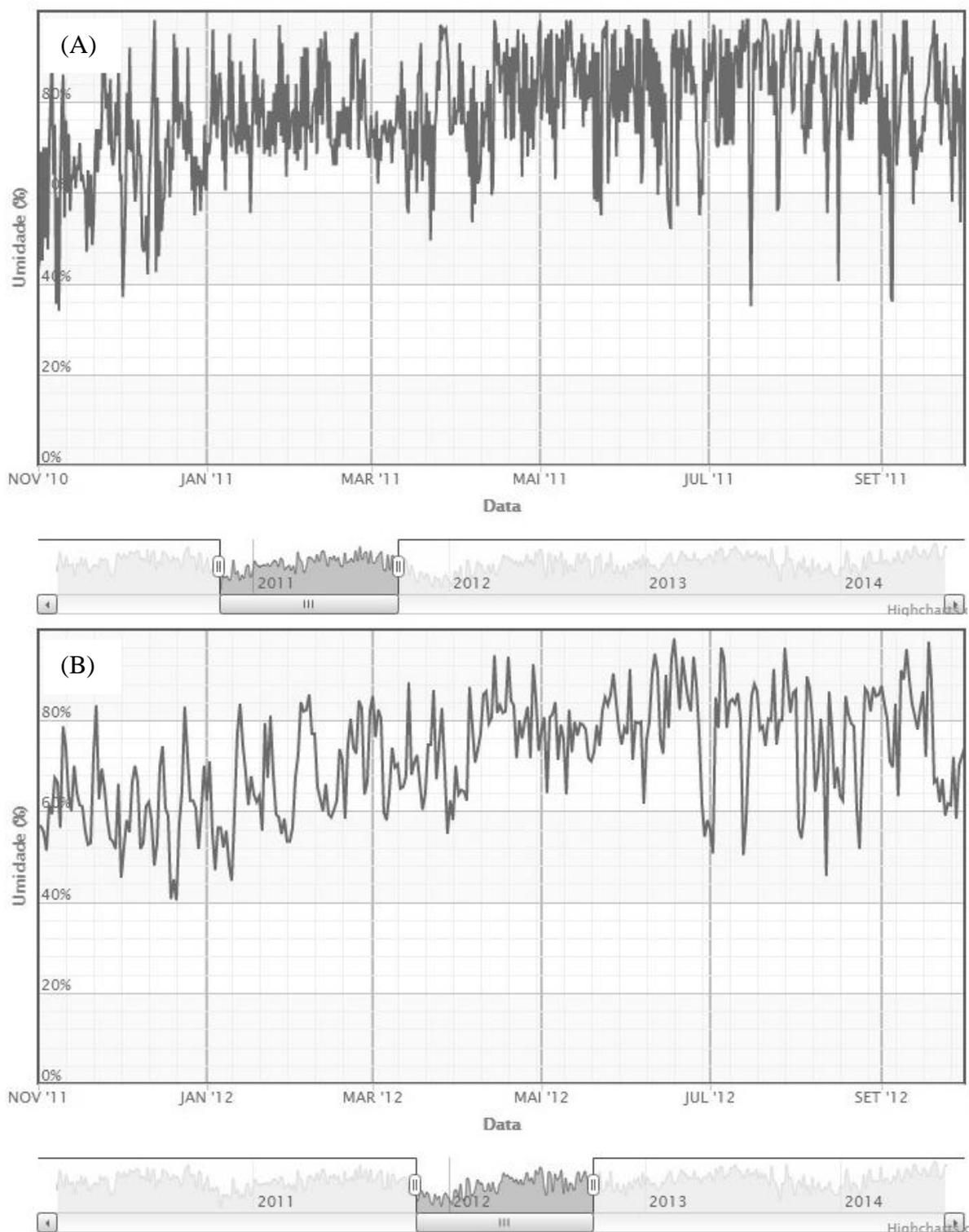
Fonte: Adaptado de INMET, 2014.

Anexo 2 – Temperatura (°C) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B)



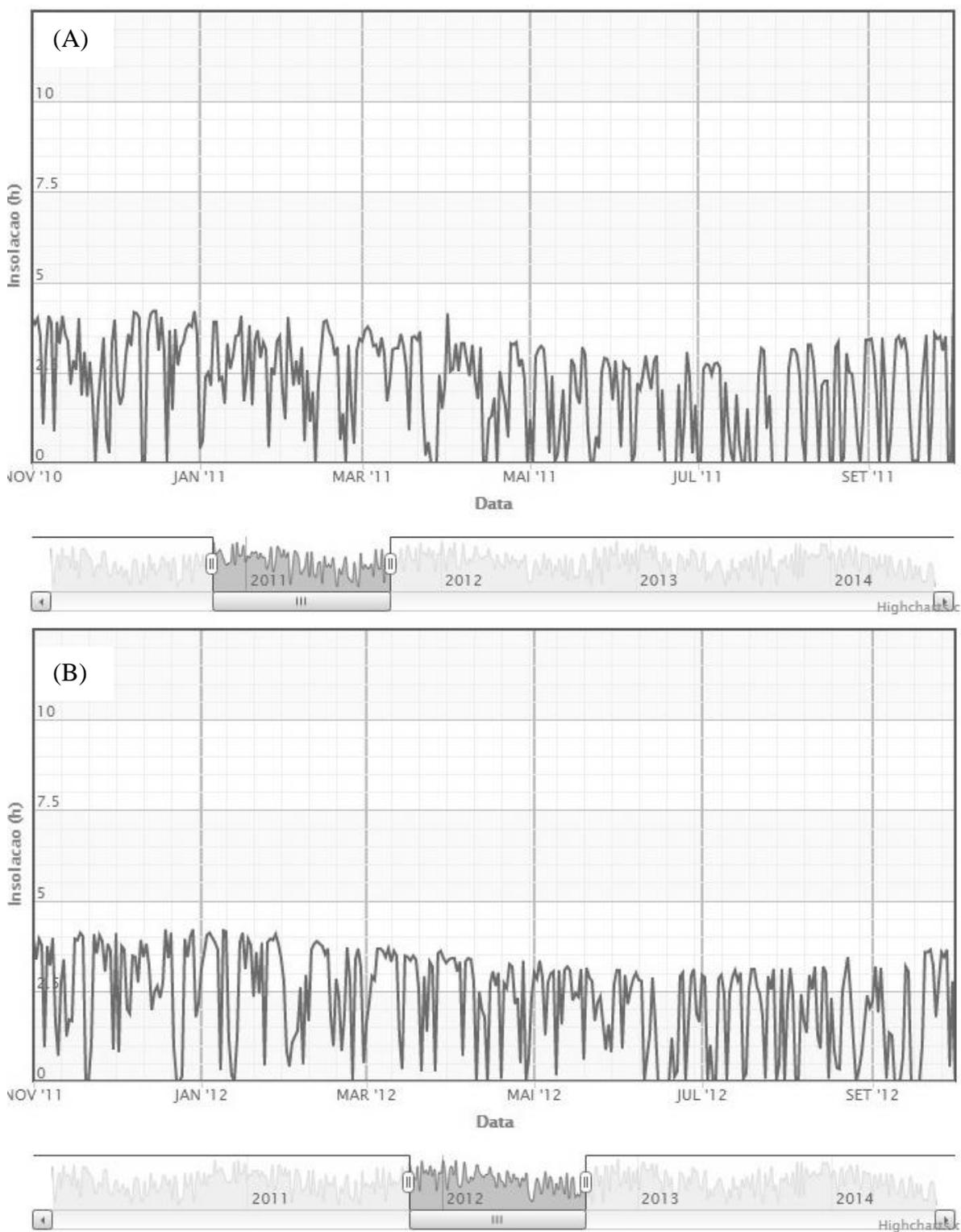
Fonte: Adaptado de INMET, 2014.

Anexo 3 – Umidade relativa do ar (%) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B)



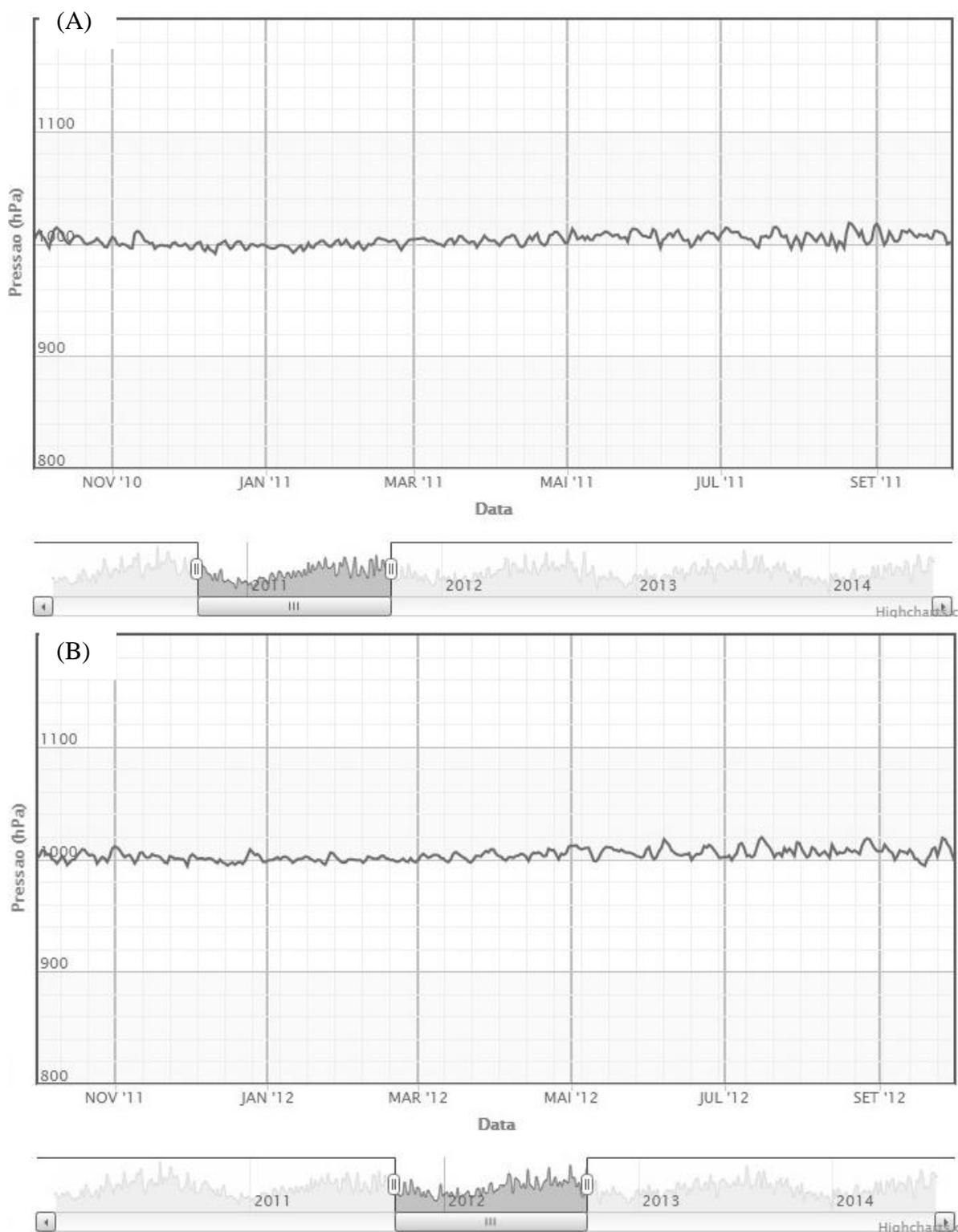
Fonte: Adaptado de INMET, 2014.

Anexo 4 – Insolação (h) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B)



Fonte: Adaptado de INMET, 2014.

Anexo 5 – Pressão atmosférica (hPa) para os períodos de coleta de material vegetal de *N. megapotamica* em Santa Maria (Primeiro período 2010/2011 - A; Segundo período 2011/2012 – B)



Fonte: Adaptado de INMET, 2014.