

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**VOLÁTEIS E A UNIDADE DE SINALIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE  
SEMENTES EM *Protium icicariba* (DC) MARCHAND**

**ANA PAULA FERREIRA DA COSTA**

**VILA VELHA**  
**JULHO/2016**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**VOLÁTEIS E A UNIDADE DE SINALIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE  
SEMENTES EM *Protium icicariba* (DC) MARCHAND**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecosistemas, para a obtenção grau de Mestre em Ecologia de Ecosistemas.

**ANA PAULA FERREIRA DA COSTA**

**VILA VELHA**  
**JULHO/2016**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C837v Costa, Ana Paula Ferreira.  
Voláteis e a unidade de sinalização da dispersão de sementes em *Protium icicariba* (DC) Marchand / Ana Paula Ferreira Costa. – 2016.  
44f.: il.

Orientador: Ary Gomes da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2016.  
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Sementes  
I. Silva, Ary Gomes da, II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

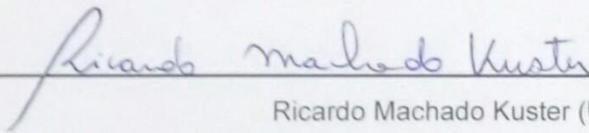
ANA PAULA FERREIRA DA COSTA

VOLÁTEIS E A UNIDADE DE SINALIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE  
SEMENTES EM *Protium icicariba* (DC) MARCHAND

Dissertação apresentada a  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ecologia de  
Ecosistemas, para a obtenção grau  
de Mestre em Ecologia de  
Ecosistemas.

Aprovada em 28 de julho de 2016,

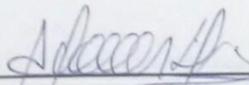
Banca Examinadora:



Ricardo Machado Kuster (UFES)



Ana Carolina Srbek de Araujo (UVV)



Ary Gomes da Silva (UVV – Orientador)

**Dedico ao meu avô Antônio (*in memoriam*), um grande homem.**

“A angústia de ter perdido não supera a alegria de ter um dia possuído”  
(Santo Agostinho).

## AGRADECIMENTOS

Há muito o que agradecer por essa conquista. Seguir um sonho requer dedicação, sacrifícios e abrir mão de muitas coisas.

Nenhuma conquista é individual. Pessoas, envolvidas ou não na pesquisa, nos dão suporte.

Primeiro agradecer a Deus, que sabe de todas as coisas e nos guia. Crer que tudo está escrito conforme sua vontade, ter a certeza que Ele sabe o que é melhor e a hora que deve acontecer.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para dar apoio à minha educação. Incentivam cada curso, cada passo e principalmente sempre acreditando que nada é em vão. Aos melhores pais do mundo, meu muito obrigada! Ainda tem muito pela frente e sei que estarão na torcida e no suporte.

À família, por ser a base, pelo apoio e por incentivar a longa caminhada.

Ao meu querido avô Antônio (*in memoriam*), por nunca deixar de acreditar que todas as “experiências” que deixavam as mães de cabelos em pé e seus netos felizes, seriam de grande importância para suas carreiras. Ta aí o resultado: uma bióloga e um físico. Obrigada, muito obrigada! Lamento a sua partida todos os dias.

Muito alegre agradecer às amigas de todas as horas, que nos momentos de lamento sobre as coisas da vida, que até poderiam ter me tirado dos eixos e interrompido essa caminhada, me apoiaram com muito carinho e amor. A vocês que me ouviram por horas, meu muito obrigada Kel (Raquel) e Cléo (Clarissa).

Durante essa jornada tive duas pessoas que me receberam de braços abertos, meus orientadores. Professora Dra. Muriel da Silva Folli Pereira, que orientou no primeiro ano e contribuiu com sua experiência e o Professor Dr. Ary Gomes da Silva apareceu quando tudo parecia perdido, deu um rumo, me acalmou. Com sua competência e experiência me fez vencer essa etapa da minha jovem carreira. Agradecerei sempre! Muito, muito obrigada. Te admiro muito.

Aos professores da Universidade Vila Velha e à coordenação do curso que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

Aos colegas de jornada que apoiaram os momentos de desespero diante de tanta matéria, seminários, artigos... Em especial ao amigo Hatter por todas as coisas passadas juntos e o apoio mútuo dentro e fora da Universidade.

À FAPES pela concessão da bolsa de auxílio a pesquisa.

Muito obrigada!

## RESUMO

COSTA, Ana Paula Ferreira, M. Sc. Universidade Vila Velha – ES, julho de 2016. **Voláteis e a unidade de sinalização da dispersão de sementes em *Protium icicariba* (DC) Marchand.** Orientador: Ary Gomes da Silva.

A família Burseraceae é fonte bem conhecida de exsudatos e oleorresinas ricas em substâncias voláteis. Os óleos essenciais estão presentes em várias partes da planta, entre elas na resina seca, folíolo, flor, fruto e semente. Objetivou-se caracterizar a natureza do exsudato caulinar e dos ápices dos ramos de *Protium icicariba* e investigar a unidade de dispersão, de modo a identificar os voláteis que compõem o aroma do fruto maduro, comparando-os aos do fruto imaturo, dos folíolos, ramos e resina do caule, de modo a investigar seu papel na dispersão das sementes desta espécie vegetal. A produção de exsudato foi estimulada através de incisão no caule, retirada de folhas no ponto de inserção das raquis e ramos, remoção de flores e frutos pelo pedicelo. Para análise anatômica, foram retirados fragmentos de caule, ramo, pecíolos da raque e de folíolos, de modo a investigar a natureza das estruturas. O exsudato do caule, ramos e folhas de *P. icicariba* é representado por um líquido oleoso que se resseca após exposição ao ar, produzindo um resíduo amorfo de coloração esbranquiçada, podendo desenvolver tons levemente amarelados ou rosados. As estruturas secretoras desta oleorresina correspondem a cavidades alongadas, delimitadas por um epitélio secretor, associadas ao floema no caule e nos ramos das plantas, chegando até as folhas através das nervuras do sistema vascular. Isto indica que a oleorresina circula na planta inteira em meio aos tecidos vasculares, desde o caule até toda ramificação do sistema axial do caule, ramos e pecíolos. O rendimento extrativo do óleo essencial foi obtido por meio de hidrodestilação das diferentes partes estudadas da planta e não apresentou diferenças significativas entre o fruto maduro aberto e resina seca, ao contrário do fruto maduro fechado, fruto imaturo e folíolos. A composição química do óleo do fruto maduro aberto revelou que os compostos majoritários representam um total de 74,83% de todo óleo, do fruto maduro fechado 74,76%, do fruto imaturo 77,83%, do folíolo 72,37% e da resina seca 74,38%. Os frutos maduros e imaturos formaram um bloco distinto das outras partes vegetativas, considerando o perfil fitoquímico dos óleos essenciais, e os frutos imaturos também foram distintos dos frutos maduros. Portanto, o perfil fitoquímico dos frutos e sementes não representou um evento conservativo em *P. icicariba* e, como são produzidos em estruturas secretoras internas e fechadas, essas substâncias voláteis podem estar envolvidas em alguma via secundária à dispersão ou influenciando a palatabilidade dos diásporos.

**Palavras-chave:** almécega, estruturas secretoras, exsudato, oleorresina.

## ABSTRACT

COSTA, Ana Paula Ferreira, M. Sc. Universidade Vila Velha - ES, July 2016. **Volatile and signaling unit of seed dispersal on *Protium icicariba* (DC) Marchand.** Orientador: Ary Gomes da Silva.

The Burseraceae family is well-known source of exudates and oleoresins rich in volatile substances. Essential oils are present in various parts of the plant, including the dry resin leaflet, flower, fruit and seed. This study aimed to characterize the nature of stem exudate and apexes of icicariba *Protium* branches and investigate the dispersion unit, in order to identify volatiles that make up the aroma of ripe fruit, comparing them to the immature fruit of the leaflets, branches and stem of the resin, in order to investigate their role in the dispersion of the seeds of plant species. The exudate production was stimulated through an incision in the stem, removal of leaves at the insertion point of the rachis and branches, removal of flowers and fruits by pedicel. For anatomical analysis, stem fragments were removed branch petioles rachis and leaflets, in order to investigate the nature of the structures. The exudate stem, branches and leaves of *P. icicariba* is represented by an oily liquid that dries upon exposure to air, producing a whitish amorphous residue and may develop slightly yellow or pink tones. Secretory structures of oleoresin match elongate cavities bounded by a secretory epithelium associated to the phloem in stems and branches of the plant, reaching the leaves by the ribs of the vascular system. This indicates that circulates in the whole plant oleoresin among the vascular tissue from the stem to the whole branch of the axial stem system branches and petioles. The extraction yield of the essential oil was obtained by hydrodistillation of the different parts of the plant studied and no significant differences between the ripe fruit open and dry resin, unlike the mature fruit closed, immature fruit and leaflets. The chemical composition of the open ripe fruit oil revealed that the major compounds represent a total of 74.83% of all oil, ripe fruit closed 74.76%, 77.83% of the immature fruit, foliole 72.37% and 74.38% of dry resin. Mature and immature fruits formed a distinct block of other vegetative parts, considering the phytochemical profile of essential oils, and immature fruits were also distinct from mature fruits. Therefore, the phytochemical profile of the fruits and seeds did not represent a conservative event in *P. icicariba* and, as produced in internal secretory structures and closed, these volatile substances may be involved in some way secondary to dispersion or influencing palatability of diásporas.

Key words: almecega, exudate, oleoresin, secretor structures

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>12</b>
2.1 A oleorresina seca em Burseraceae.....	12
2.2 Dispersão de sementes .....	14
2.3 A sinalização química na dispersão.....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Área de estudo.....	16
3.2 Coleta de material.....	17
3.3 Estruturas secretoras nos ramos, folíolos e frutos.....	17
3.4 O exsudato.....	18
3.5 Extração de óleo essencial.....	19
3.6 Análise cromatográfica do óleo essência.....	19
3.7 Análise dos dados.....	20
<b>4. RESULTADO.....</b>	<b>21</b>
4.1 Descrição morfológica e estrutural dos ramos, folíolos, frutos imaturos e maduros.....	21
4.2 Estruturas secretoras.....	22
4.3 Exsudato.....	26
4.4 Perfil fitoquímico do óleo essencial.....	27
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>7.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Família Burseraceae é uma fonte conhecida de exsudados e oleorresinas ricas em substâncias voláteis que são usadas para muitas finalidades, por exemplo, produtos de perfumaria. Na região Neotropical, esta família é largamente representada pelo gênero *Protium*. Este é o principal gênero da família, que compreende cerca de 135 espécies e é um dos gêneros mais difundidos na América do Sul (Khalid, 1983). Estima-se que mais de 80% das espécies de Burseraceae na região amazônica, por exemplo pertencem ao gênero *Protium* (Siqueira, 1991).

Nessa família os óleos essenciais, de metabolismo secundário, estão presentes em várias partes da planta, entre elas na resina seca, folíolo, flor, fruto e semente. Devido a este fator é possível a extração do óleo sem suprimir as populações naturais da planta (Oliveira *et al.*, 2006). Os óleos possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides (Gonçalves *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

*Protium icicariba* (DC) Marchand conhecido popularmente como almécega ou almesca, possui distribuição que vai do norte da Amazônia até a Argentina. É uma espécie arbustiva atingindo alturas médias de 2,5m, podendo variar de 8 a 14m, com folhas compostas de 5-7 folíolos, de peciólulos muito curtos e oblongo-lanceolados. O fruto, de forte aroma possui mais de 10% em açúcar, sendo cápsula de pericarpo avermelhado. Quando maduro, abre expondo uma semente com sarcotesta branca comestível. Esta semente produz 25% de óleo que pode ser consumido substituindo o azeite. A espécie apresenta ainda ductos ou canais secretores de oleorresina no caule, ramos e frutos (Siani *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2010).

O processo de dispersão de sementes é um dos fatores mais importantes para a manutenção de populações de espécies vegetais, sendo crucial para a reprodução da planta já que a semente pode viajar por grandes distancias evitando a competição com a planta-mãe (Howe, 1993; Janzen, 1970). Desta forma é muito importante a interação entre animal-planta, já que algumas plantas necessitam dos animais polinizadores e/ou dispersores para sua reprodução e, em contrapartida, oferecem a eles recursos alimentares como pólen, néctar, óleos, frutos e sementes (Stefanello *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012). A dispersão de sementes representa a última fase do ciclo reprodutivo das plantas, e por isso é considerada como um evento crítico para a regeneração vegetal (Francisco e Galetti, 2002).

O presente trabalho foi norteado pela hipótese de que a presença de um perfil de substâncias voláteis no aroma das unidades de dispersão representa um caráter conservativo decorrente da produção em todas as partes da planta de uma oleorresina que contém óleos essenciais em sua composição. Caso não seja assim, outras possibilidades de dispersão para as sementes de *P. icicariba*, além da ornitocoria, seria a existência de processos secundários de dispersão realizada por dispersores olfativamente orientados. Assim, o presente estudo tem como objetivo geral investigar a unidade de dispersão em *P. icicariba*, de modo a identificar os voláteis que compõem o aroma do fruto maduro, comparando-os aos do fruto imaturo, dos folíolos, ramos e resina do caule, para a investigar seu papel na dispersão das sementes desta espécie vegetal e como objetivos específicos, propõe-se o perfil químico qualitativo e quantitativo do o óleo essencial de frutos maduros, frutos imaturos e eixo vegetativo de *P. icicariba* e entender por que um fruto com padrões de síndrome ornitocórica apresenta voláteis, sendo que as aves apresentam pouca ou nenhuma resposta aos odores.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 A oleorresina na Família Burseraceae**

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos químicos com características voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Martins *et al.*, 2002). Podem estar presentes em um só órgão ou em toda planta, o que pode variar de acordo com a família. Podem ser produzidos em células secretoras, cavidades, ductos, células epidérmicas e tricomas. Assim como visto em cortes anatômicos de *Protium icicariba* nos folíolos e ramos a presença de ductos e nos frutos cavidades. Geralmente, os óleos possuem densidade menor que da água e são solúveis em compostos orgânicos (Bakkali *et al.*, 2008).

Na Família Burseraceae os óleos essenciais, de metabolismo secundário, estão presentes em várias partes da planta, entre elas na resina seca, folíolo, flor, fruto e semente. Devido a este fator é possível a extração do óleo sem suprimir as populações naturais da planta (Oliveira *et al.*, 2006). Esses óleos possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides (Gonçalves *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

As espécies da Família Burseraceae caracterizam-se por exsudação de resinas, que ocorrem nas raízes, caules, folhas, flores e frutos e quase sempre tem traços de látex branco resinosos, que podem ser encontrados nos galhos ou nas

gotículas dispersas em barras feitas da casca. E está presença de um exsudato resinoso aromático é largamente responsável pela proeminência de espécies de Burseraceae na etnobotânica das regiões onde elas ocorrem (Cuatrecasas, 1957; Khalid, 1983; Gentry, 1993). Na natureza, a exsudação da oleorresina também é provocada pela ação de insetos (Susunaga, 1996). Ao ferir alguma parte da planta, como caule e ramos, há exsudação de uma oleorresina que seca rapidamente formando blocos esbranquiçados. Essa secreção é originada em ductos ou cavidades secretoras esquizógenos ou esquizolisígenas (Siani *et al.*, 2004).

Os ramos são frequentemente escandentes com o córtex de coloração acinzentada, marcados por lenticelas, apresentando o lenho circundado por ductos secretores de óleo-resina. O fruto é uma cápsula de pericarpo avermelhado quando maduro, que expõe as sementes com sarcotesta branca. Desde imaturos, o pericarpo do fruto apresenta estruturas secretoras de oleorresina (Engler, 1874; Siani *et al.*, 2004). Em condições naturais, esta oleorresina pode exsudar espontaneamente ou provocada por incisões no tronco das plantas que, neste gênero, podem ser arbustos ou árvores.

*Protium icicariba* (DC) Marchand conhecido popularmente como almécega ou almesca é uma espécie nativa das restingas do sudeste do Brasil. A espécie apresenta ductos ou canais secretores de oleorresina no caule, ramos e frutos (Siani *et al.*, 2004).

Algumas partes da planta, raiz, caule, folha e frutos são fundamentais como sinalizadores para agentes dispersores e/ou polinizadores, além de compostos exsudados das mesmas, como oleorresina seca e o óleo essencial. A oleorresina seca é constituída, por cerca de 11% de óleo essencial, monoterpene triidroxilado 1, triterpene  $\alpha$ -aminira,  $\beta$ -amirina e breina (Bandeira *et al.*, 2002). Os óleos essenciais são responsáveis pelo aroma, servindo como sinalizador para agentes dispersores e/ou polinizadores, além de apresentarem grande importância ecológica, como inibidores da germinação, proteção contra predadores, proteção contra perda de água e aumento da temperatura (Santos *et al.*, 2004).

## **2.2 Dispersão de sementes**

A interação mutualística entre plantas e animais no meio ambiente é frequente. Às vezes há um grau de reciprocidade como nos casos da polinização e da dispersão. Em outras situações, essas interações podem acarretar riscos para a própria planta, como o caso da herbívora, onde o animal se alimenta de partes ou de todo o vegetal o que resulta em efeitos negativos no crescimento e sobrevivência de uma população

e em um efeito positivo ou benéfico na outra, (Krohling *et al.*, 2010; Stefanello *et al.*, 2010; Odum, 1988; Silva *et al.* 2012). Quando a interação é benéfica para os dois lados, a atração implica na existência de sinais, muitas vezes em forma de recursos alimentares, oferecidos pela planta, que intermediam a comunicação com polinizadores e dispersores (Dusenbery, 1992). Dentre eles pode-se destacar a presença de pólen, néctar nas flores, e óleos essenciais em flores, frutos e sementes (Harborne, 1993). Deste modo a planta oferece seus recursos alimentares e em contrapartida os animais auxiliam em sua polinização e dispersão (Krohling *et al.*, 2010; Stefanello *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

Entre as síndromes de dispersão há aquela que envolve a participação direta dos animais, a dispersão biótica ou zoocórica, e a que não há participação efetiva dos mesmos, conhecida como dispersão abiótica. Na dispersão biótica ou zoocoria, os animais atuam como agentes dispersores, sendo o tamanho do fruto ou o porte da planta o que vai determinar o tipo de animal responsável pela dispersão (Saravy *et al.*, 2003). Uma forma de classificação é de acordo com o tipo que animal que realiza a dispersão podendo ser: ornitocoria, mirmecocoria, saurocoria, ictiocoria, quiropterocoria e melitocoria (Pijl, 1982).

A ornitocoria é quando a dispersão de diásporos envolve a participação de aves, considerados ótimos agentes dispersores, devido sua capacidade de voar, tamanho da abertura do bico, tempo gasto do forrageamento, forma de lidar com o fruto e grande mobilidade (Francisco *et al.*, 2007).

Mirmecocoria é a dispersão de diásporos por formigas, esse fenômeno não é considerado especializado já que há um envolvimento de uma grande diversidade de espécies de formigas associadas às sementes. Onde as formigas fazem a seleção, as sementes maiores e mais difíceis são transportadas por indivíduos de fortes mandíbulas (Peternelli *et al.*, 2004).

A saurocoria ocorre quando há dispersão de diásporos pela ação de répteis, enquanto a ictiocoria ocorre por peixes. A quiropterocoria é a dispersão feita por morcegos que, de certa maneira, acaba auxiliando no mecanismo de sucessão floral e restauração. Portanto, o conhecimento da alimentação do morcego é de extrema importância já que serve como subsídio ao manejo e à conservação de ambientes (Verçosa *et al.*, 2012). Outro tipo de dispersão de invertebrados é a melitocoria, dispersão feita por abelhas.

Na Família Burseraceae a dispersão de diásporos em *Protium sp*, é feita pelas aves por orientação visual do fruto e não do óleo essencial. Entretanto acredita-se que as formigas possam desempenhar um papel secundário de dispersão sendo orientadas pelo óleo Saravy *et al.* (2003)

### **2.3 A sinalização química na dispersão**

Há três fatores bioquímicos que envolvem a atração de animais para as plantas, sendo o perfume, a cor da flor e o valor nutricional do néctar e do pólen (Harbone 1993).

Graças ao perfume exalado pela planta, por meio dos óleos essenciais, os animais detectam à distância os terpenos ou outras substâncias voláteis e deste modo o óleo essencial acaba servindo como atrativo para um agente polinizador/dispersor. Portanto, cada tipo de diásporo possui sua forma de atração de polinizadores/dispersores, como por exemplo os animais que se alimentam à noite são orientados pelo aroma exalado da planta, uma vez que o contato visual é quase ausente (Harbone, 1993).

As pequenas concentrações dos aromas das flores servem como sinalizadores para os insetos, já que são sensíveis a pequenas concentrações dos produtos químicos voláteis. Logo, algumas espécies de plantas que não apresentam odor nenhum na percepção do ser humano, para um inseto há produção suficiente para atraí-lo. E a produção máxima do perfume é coordenada com o momento em que o pólen está maduro e a flor pronta para polinização (Harbone, 1993).

Sementes maduras exalam uma quantidade maior de odor e há um aumento na produção de açúcares, resultando em mecanismos para atração de dispersores. É ainda neste momento que a semente apresenta uma testa mais enrijecida que a torna capaz de resistir à passagem pelo tubo digestivo dos animais (Marinho-Filho e Vasconcellos-Neto, 1994).

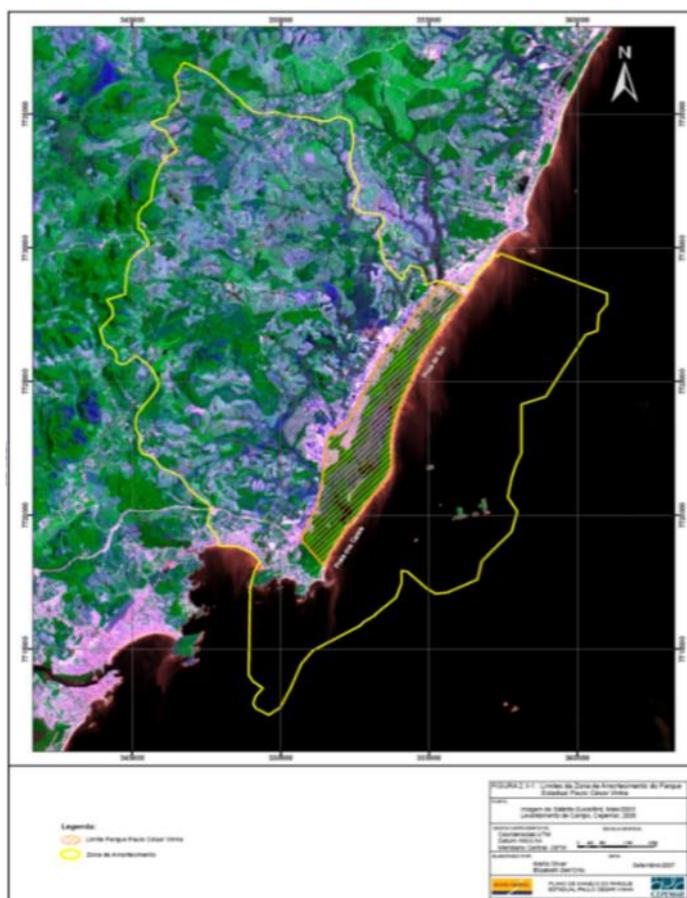
## **3.MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Área de estudos**

A Área de Proteção Ambiental (APA) de Setiba foi instituída em 1994 através do decreto estadual nº 3.747-N. Inicialmente denominada de “APA de Três Ilhas”, foi recriada em 1998 pela Lei Estadual 5.651 com o nome de “APA Paulo Cesar Vinha” ou apenas “APA de Setiba”. Foi criada para ser zona de amortecimento para o Parque

Estadual Paulo César Vinha (PEPCV), conferindo-lhe uma proteção paisagística, estética e ambiental, por meio da adequação das atividades efetivas ou potencialmente poluidoras às condições ecológicas regionais (CEPEMAR, 2007). Localizada sobre uma planície arenosa quaternária, a APA de Setiba possui cerca de 12.960 ha de extensão que vai do extremo sul do município de Vila Velha à região nordeste de Guarapari. Sua criação é um marco histórico na conservação da biodiversidade costeira e marinha do Espírito Santo por ser a primeira Unidade de Conservação (UC) do estado com inclusão do ambiente marinho, abrangendo uma área de 5.460 ha da área total (Figura 1) (Thomazi e Silva, 2014).

A área apresenta fisionomia herbácea-arbustiva aberta, com algumas áreas, apresenta áreas onde o lençol freático se apresenta mais próximo do solo, sujeitas a inundação em determinada época do ano. A paisagem local se caracteriza por formações vegetacionais constituídas por conglomerados de plantas de porte arbustivo e subarbustivo, podendo ocorrer algumas espécies arbóreas (Ferreira *et al.*, 2010).



### **3.2 Coleta de Material**

As coletas de resina seca, folíolos, ramos e frutos de *Protium icicariba* foram realizadas entre os meses de fevereiro a maio de 2015, somando um total de sete coletas.

A resina seca, folíolos e frutos coletados manualmente foram acondicionados em potes de vidro e armazenados no freezer. Para as análises das estruturas secretoras, frutos verdes, ramos e alguns folíolos foram mergulhados em campo no FAA 50 (formol; ácido acético e álcool), visando à preservação, assim como também a morte do protoplasma sem distorções e permaneceu no FAA por 24 horas.

### **3.3 Estruturas secretoras nos ramos, folíolos e frutos**

Para análise das estruturas secretoras nos frutos e nos ramos foram realizados cortes transversais e longitudinais à mão livre. Já nos folíolos, cortes transversais e paradérmicos. Com o auxílio de um pincel, levou-se o corte para uma placa de Petri contendo água deionizada. Em seguida, as seções mais finas transparentes foram diafanizadas em solução de hipoclorito de sódio (1:1), lavadas com água deionizada e neutralizadas em solução de ácido acético 5%, por cinco minutos. Após a neutralização, as seções, foram lavadas em água deionizada até o total desaparecimento do odor de ácido acético. A coloração foi feita em solução de azul de astra (1:4), por 10 segundos e logo após as seções foram lavadas em água deionizada para retirada do excesso de corantes. Sendo que para cada uma das partes utilizadas (ramos, folíolos e frutos) o processo foi desenvolvido separadamente. As seções coradas foram montadas entre lâmina e lamínula em meio à glicerina bidestilada, e depois lutadas com esmalte. Estas preparações semi-permanentes foram analisadas em microscópio óptico e Olympus BH2-BHS Olympus BH2 utilizando o software analisador de imagem Pró-Plus, versão 3.0 para Windows acoplado ao mesmo microscópio.

### **3.4 O exsudato**

A produção de exsudato foi estimulada através de incisão no caule, retirada de folhas no ponto de inserção das raquis nos ramos, remoção de flores e frutos pelo pedicelo. O exsudato foi testado quanto ao grau e solubilidade em água e em solventes orgânicos. Gotas do exsudato produzido foram colocadas em lâminas de vidro desengorduradas e incubadas por 8 horas em estufa de ar forçado à temperatura

de 40°, para determinação do resíduo de evaporação. Também foi realizado um teste de higroscopicidade em meio à tinta da China (Costa, 1972), para evidenciar a presença de mucilagem. Em caso negativo, o ensaio a quente com o reagente de Fehling foi realizado para revelar glicanas hidrolisáveis (Sass, 1951) que são caracterizados como gomas, se demonstrarem caráter ácido *in natura*, ao corar-se pelo vermelho de rutênio, enquanto o verde de metila evidenciou o caráter mais neutro das mucilagens (Jensen, 1962). O exsudato líquido foi dividido em três alíquotas: uma foi tratada com éter etílico, outra com solução aquosa de ácido clorídrico diluído e a terceira com solução aquosa de ácido acético glacial. A solubilidade em éter, acompanhada de insolubilidade em solução aquosa de ácido clorídrico diluído e solução aquosa de ácido acético glacial, permitiu caracterizar os óleos fixos, enquanto a solubilidade em éter e em solução aquosa de ácido acético glacial, mas que precipitaram em meio à solução aquosa de ácido clorídrico caracteriza resinas (Konarev, 1972, Harborne, 1984). O exsudato também foi gotejado em papel de filtro Whatmann nº 1, e as manchas produzidas, se persistentes à temperatura ambiente, indicam a caracterização como óleos fixos, enquanto os que formaram manchas efêmeras são caracterizados como voláteis (Costa, 1972).

### **3.5 Extração do óleo essencial**

O processo de extração do óleo essencial foi desenvolvido pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger. Para extração do óleo essencial foi utilizada resina seca e folíolos, como referência do perfil de aromas do eixo vegetativo, e frutos imaturos e maduros, para identificação do perfil de aromas característico dos frutos. Cada uma das amostras foi triturada e pesada, em seguida transferida para um balão de 2000 ml com água deionizada e acomodado sobre uma manta elétrica aquecedora. O extrator de Clevenger foi adaptado ao balão e o pingador à saída superior do extrator. Para cada uma das partes de *Protium icicariba* utilizadas o processo de hidrodestilação foi feito separadamente. O processo teve duração de até 4 horas. Após a extração, o óleo essencial foi armazenado e reduzindo a temperatura a ponto de congelamento da água de forma a separar óleo da água.

### **3.6 Análise cromatográfica do óleo essencial**

A injeção do óleo essencial foi realizada em sistema de cromatografia em fase gasosa de alta resolução. O volume de injeção foi de 2µL, composto por 1,6 µL de

uma solução de óleo essencial (30mg/ml) e 0,4 µL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno, tendo o *n*-hexano como solvente.

Na cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), o sistema utilizado foi consistido de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25 mm x 0,25 mm). O gás de arraste foi o hélio e o programa de temperatura da coluna consistiu em aumentos de 3° C por minuto, entre 60° -240° C. Os espectros de massa foram obtidos em 70eV a velocidade de varredura de 0,84 scan/s, na faixa de m/z 40-500 (Adams, 2009).

O tempo de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de *n*-alcanos de C7-C30, co-injetados no sistema GC-MS no âmbito do mesmo programa de temperatura, foram utilizados para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats – IK e do Índice Aritmético de Van der Dool e Kratz (IA). A identificação dos componentes do óleo essencial utilizou os cromatogramas e os espectros de massas obtidos por varredura dos diferentes picos dos componentes identificados, utilizando o software Xcalibur, (versão 2.0). Os tempos de retenção, os Índices de retenção e os espectros de massas obtidos, foram comparados com a biblioteca espectral de CG-EM nos IK e IA calculados em comparação com a literatura disponível (Adams, 2009).

As substâncias voláteis ou semivoláteis (termo estáveis) foram preferencialmente analisadas por cromatografia gasosa, devido ao grande poder de separação desta técnica, sendo capaz de separar compostos orgânicos com isomeria plana similar, isomeria óptica e homólogos com grande pureza (Vilegas, 1997).

### **3.7 Análise dos dados**

O perfil fitoquímico qualitativo e quantitativo dos óleos essenciais foi determinando com base na composição do produto de extração de frutos maduros abertos, frutos maduros fechados, frutos imaturos, resina seca e folíolos, este último introduzido na análise como padrão externo para monitoramento do processo.

A diversidade química para cada unidade morfológica trabalhada foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver –  $H'$ . A equitabilidade foi determinada pelo índice de Pielou (Brower *et al.*, 1997). Os índices obtidos foram testados em relação a eventuais diferenças pela análise de variância – (ANOVA), com um critério de classificação, utilizando as fontes de óleo essencial como blocos de tratamento no modelo linear. As diferenças entre as médias foram discriminadas a posteriori pelo

Teste de Scheffè. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de igualdade entre os índices médios foi  $p \leq 0,05$  (Zar, 2010).

Na avaliação das afinidades, foi utilizada uma matriz com os sinais detectados em eletronsvolts (eV) para os componentes dos óleos essenciais, corrigida em escala pela transformação *ranging* que acomodou todos os dados numa amplitude entre zero e um, excluídos os componentes de ocorrência restrita em uma única amostra e os que estivessem presentes em todas elas. Para a avaliação qualitativa, os sinais detectados em eV foram convertidos numa matriz binária que expressasse a presença ou ausência do componente no óleo essencial, excluídos também os compostos de ocorrência restrita a uma amostra e os que estivessem presentes em todas. Na matriz quantitativa, a dissimilaridade foi estimada pelo coeficiente de distância de Manhattan Total. O dendrograma foi construído pelo método de ligação de média de grupo. O coeficiente de Manhattan total, o dendrograma e seu respectivo coeficiente de correlação cofenética foram calculados utilizando o programa Fitopac versão 2.0 (Shepherd, 1995).

No estudo do gradiente químico foi aplicado o algoritmo da análise de espécies indicadoras (TWINSpan) (Hill, 1979) utilizando os componentes químicos dos óleos essenciais de cada unidade morfológica trabalhada, como classificadores que foram categorizados como compostos indicadores, preferenciais e não preferências para os blocos formados pela maximização das discrepâncias encontradas nas mesmas matrizes qualitativa e quantitativa empregadas (ter Braak, 1987).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Descrição morfológica e estrutural dos ramos, folíolos, frutos imaturos e maduros**

Na área estudada, *Protium icicariba* é um arbusto com até 3m de altura, dióico, com inflorescências axilares que portam flores de perianto vinoso externamente e internamente de cor creme (Figura 2). As folhas são compostas, apresentando em média de 5-7 folíolos oblongo-lanceolados discolors, sendo na face adaxial verde mais escuro e na abaxial verde mais claro, de nervação peninérvea (Figura 2). A produção de flores ocorre a partir de setembro, num período de maior pluviosidade, mas algumas inflorescências podem ser encontradas ainda no mês de janeiro. O amadurecimento do fruto ocorre predominantemente nos meses de janeiro e fevereiro e mais esparsadamente até abril.

Os frutos de *P. icicariba* são drupoides que contêm de 1-5 pireneos cujo endocarpo é carnoso acastanhado; o mesocarpo é de sabor adocicado com uma coloração esbranquiçada e aroma adocicado; e o epicarpo com variação de coloração do verde com rajados avermelhados até ser integralmente vinoso, quando maduro (Figura 3). O mesocarpo esbranquiçado acaba produzindo um contraste com o avermelhado do epicarpo. Quando o epicarpo sofre deiscência expõe as unidades de pireneo revestidas pelo mesocarpo carnoso branco.



Figura 2 *Protium icicariba* (DC) Marchand. 1- Flor masculina; 2- Face adaxial da folha; 3- Flor feminina; 4- Face abaxial da folha.

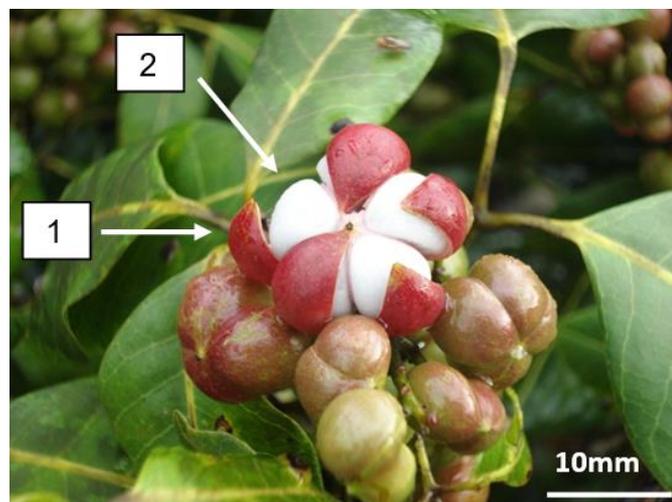


Figura 3 *Protium icicariba* (DC) Marchan Frutos: imaturos esverdeados, maduros fechados avermelhados e maduros deiscentes expondo o mesocarpo e o epicarpo. 1- Epicarpo; 2- Mesocarpo.

## 4.2 Estruturas secretoras

Os cortes longitudinais e transversais do fruto evidenciaram cavidades secretoras às vezes isodiamétricas, às vezes rômbricas (Figura 4 a e b) e as cavidades na maioria das vezes são delimitadas por epitélio secretor (Figura 5 a). Os feixes vasculares neste caso são mais isolados e concêntrico anficrival (Figura 5 b).

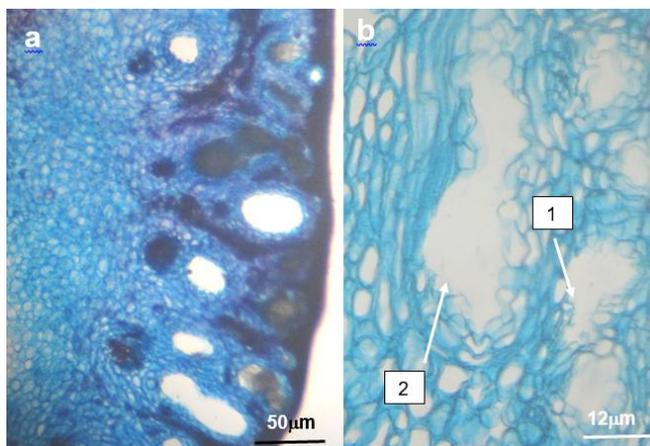


Figura 4 *Protium icariba* (DC) Marchand. a: Estruturas secretoras em seção transversal na região do epicarpo do fruto; b: estruturas secretoras em seção longitudinal do epicarpo e mesocarpo do fruto; b, em detalhe as cavidades 1: isodiamétricas e 2- rômbricas.

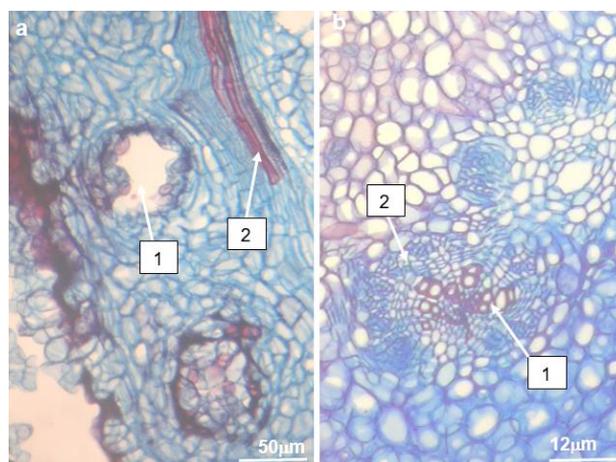


Figura 5 *Protium icariba* (DC) Marchand. Fruto a) Seção longitudinal com destaque para cavidades secretoras: 1- Cavidade secretora; 2- Feixe vascular em plano longitudinal. / b) Seção transversal detalhe para feixe vascular concêntrico anficrival: 1- xilema; 2- floema.

Os ductos secretores, presentes em folíolos e pecíolos, acompanham nervuras principais e secundárias, contudo as nervuras secundárias de menor calibre não foram observadas associadas a ductos em secções transversais da lâmia foliar (Figura 6). Secções transversais da nervura primária mostram uma bainha de fibras esclerenquimáticas que delimita a região vascular, onde as estruturas secretoras, em média de 8-13, estão dispostas em um arranjo circular sinuoso, além de oito feixes vasculares (Figura 7). Em secções paradérmicas observa-se ductos retorcidos dentro das aréolas (Figura 8) e o feixe vascular no pecíolo mostra-se concêntrico anficrival (Figura 9).

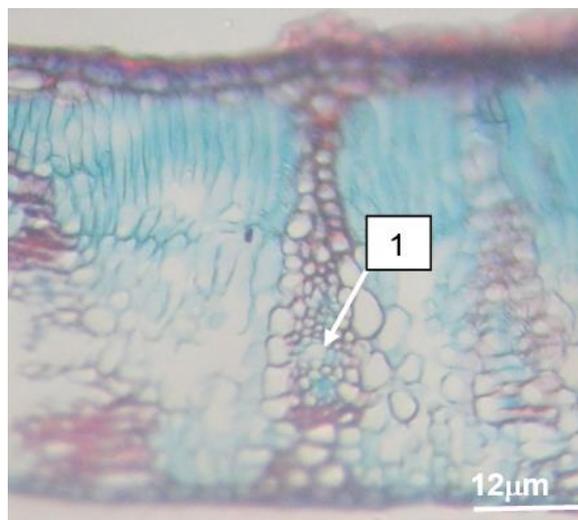


Figura 6 *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal do mesofilo de folíolos. 1-Estrutura secretora.

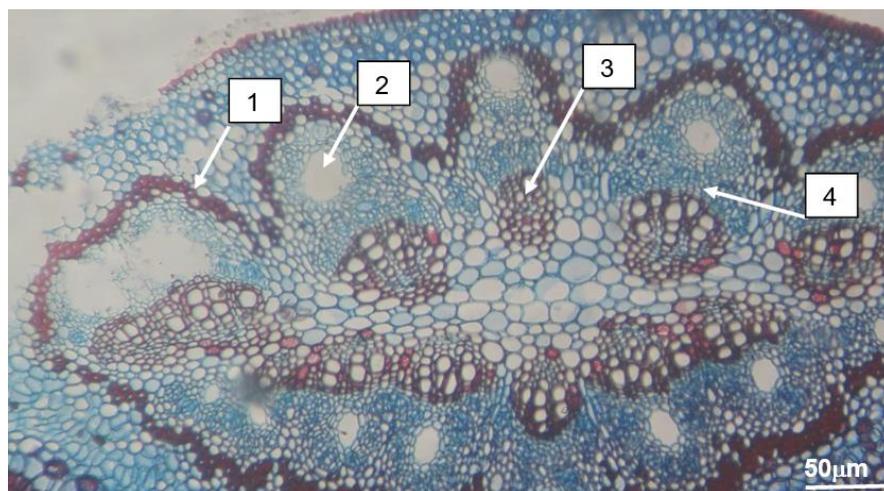


Figura 7 *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal da nervura principal. 1- Bainha de fibras esclerenquimáticas; 2- Estrutura secretora; 3- Xilema; 4- Floema.

Nos ramos, as estruturas secretoras ocorrem entre as células do floema num cilindro vascular delimitado por uma bainha esclerenquimática, onde os feixes vasculares são colaterais (Figura 10).

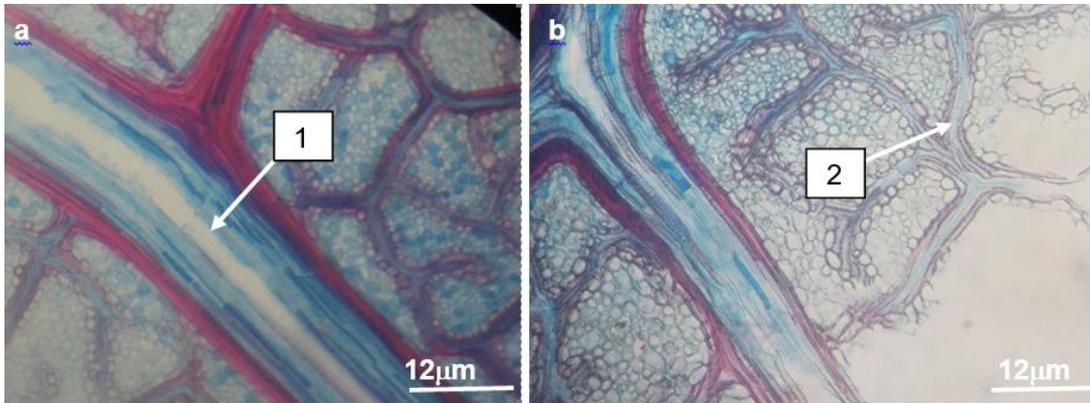


Figura 8 *Protium icariba* (DC) Marchand. Nervura principal seccionada longitudinalmente a) Nervura secundária evidenciando o ducto: 1- Ducto. / b) Aréolas contendo ductos retorcidos: 2- Ducto retorcido.

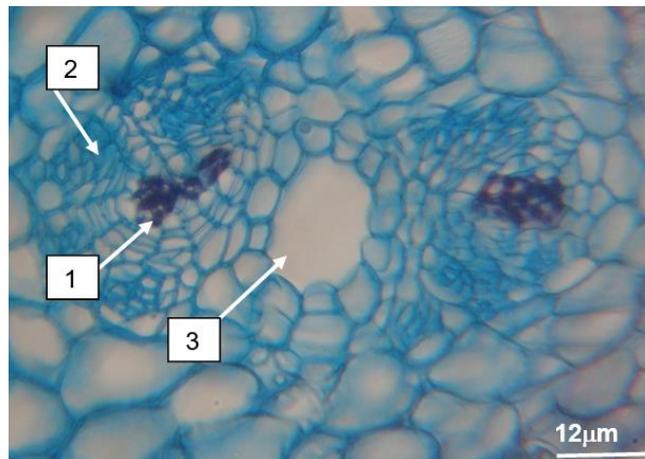


Figura 9 *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal do pecíolo evidenciando o ducto bicollateral entre dois feixes vasculares concêntricos anficrivais. 1- Xilema; 2- Floema; 3- Ducto.

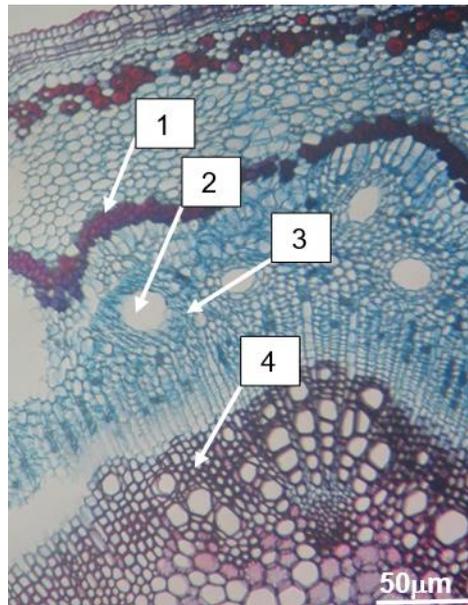


Figura 10 *Protium icicariba* Secção transversal do ramo. 1- Bainha esclerenquimática; 2- Estrutura secretora; 3- Floema; 4- Xilema.

### 4.3 Exsudato

O exsudato do caule, ramos e folhas de *Protium icicariba* é representado por um líquido oleoso que se resseca após exposição ao ar, produzindo um resíduo amorfo de coloração esbranquiçada, podendo desenvolver tons levemente amarelados ou rosados. Quando líquida, ela foi insolúvel em água, apresentando-se solúvel em éter etílico e em ácido acético glacial, mas foi insolúvel em ácido clorídrico indicando a presença de um componente resinoso. Após a incubação a 40°C, houve a produção de uma substância amorfa, de coloração esbranquiçada, com as mesmas características da encontrada na natureza. Não foram detectados polissacarídeos ácidos nem neutros. Estes resultados permitiram caracterizar o exsudato de caule, ramos, folhas e frutos de *P. icicariba* como uma oleoresina. O resíduo obtido após evaporação a 40°C também foi insolúvel em água e na solução aquosa de ácido clorídrico, mas foi solúvel em éter etílico e em solução aquosa de ácido acético, revelando sua natureza resinosa, compatível com a descrição do elemi da 1ª edição da Farmacopeia Brasileira (Silva, 1926). As gotas de exsudato não produziram manchas persistentes no papel de filtro Whatmann nº1, indicando que o aspecto oleoso do exsudato no momento de sua eliminação é devido à presença de substâncias voláteis, caracterizando o exsudato como uma oleoresina, um fato comum ao gênero *Protium* (Cuatrecasas, 1957; Khalid, 1983; Gentry, 1993). Esta

oleorresina corresponde à fonte de óleos essenciais desta espécie e, mesmo o resíduo resinoso conhecido como elemi pode chegar a ter 30% de seu peso em óleos essenciais (Silva, 1926).

#### **4.4 Perfil fitoquímico do óleo essencial**

O óleo essencial extraído do fruto maduro aberto, fruto maduro fechado, fruto imaturo e folíolos constituíram em um óleo de alta mobilidade, transparente e incolor. Já o óleo essencial da resina seca apresentou uma coloração diferente, com variações de transparente a amarelado. Não houve diferenças significativas no rendimento extrativo do fruto maduro aberto e da resina seca, que apresentaram rendimento maior que os do fruto maduro fechado, fruto imaturo e folíolo que não diferiram entre si (Tabela 1).

Em relação às densidades dos óleos essenciais, a dos folíolos, frutos imaturos foram maiores que as do fruto maduro aberto. Não diferindo significativamente entre si e nem no fruto maduro fechado e da resina seca. A menor densidade foi do fruto maduro aberto que não diferiu significativamente do fruto maduro fechado e da resina seca (Tabela 1).

A diversidade química do fruto maduro fechado e dos folíolos não diferiram significativamente entre si e foram maiores que todos os demais. O fruto maduro aberto e a resina seca não diferiram significativamente entre si em relação à diversidade química que também foram maiores que a do fruto imaturo. Os frutos imaturos apresentam a menor diversidade química em relação aos demais (Tabela 1).

Em relação à equitabilidade, apesar de uma composição química nitidamente assimétrica, essa, foi menor em decorrência dos maiores índices de equitabilidade nos folíolos e na resina seca e no fruto maduro não importando se é aberto ou fechado. A maior simetria indicada pelo índice equitabilidade mais baixo ocorreu no fruto imaturo.

Os valores médios das equitabilidades químicas estão na faixa de 0,5-0,6 para todas as partes da planta analisadas, indicando uma assimetria de representatividade dos componentes dos óleos essenciais. Dentre eles cinco a oito substâncias representam mais de 70% da composição total do óleo, ficando os 30% restantes distribuídos entre um número bem variável, entre 20 e 70 substâncias químicas diferentes dependendo da natureza do material. Os resultados da ANOVA ( $F = 15,08$ ;  $gl = 4:13$ ,  $p < 0,01$ ,  $r = 0,91$ ;  $r^2 = 0,82$ ) revelaram que, de uma maneira geral os óleos essenciais da resina seca e dos folíolos apresentaram os maiores índices de

equitabilidade, sendo que não houve diferença significativa entre a equitabilidade da resina seca, folíolos e fruto maduro fechado. A equitabilidade do óleo essencial da resina seca foi maior que a do óleo do fruto maduro aberto e do fruto imaturo, mas foi igual a do fruto maduro fechado. E o folíolo apresentou maior equitabilidade do óleo em relação fruto imaturo (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento, densidade absoluta e diversidade química do óleo essencial de fruto maduro aberto, fruto maduro fechado, fruto imaturo, folíolos e resina seca de *Protium icicariba* (Média ± Intervalo de Confiança a 95%).

	Rendimento (g/%)	Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	Diversidade química (H')	Equitabilidade (J)
Fruto maduro aberto	1,244(1,014–1,474) <sup>a</sup>	0,815(0,775- 1,215) <sup>a</sup>	2,074(2,207–2.207) <sup>a</sup>	0,503 (0,471-0,535) <sup>a</sup>
Fruto maduro fechado	0,702(0,519– 0,885) <sup>b</sup>	0,864(0,771- 0,957) <sup>ab</sup>	2,287(2.391–2,391) <sup>b</sup>	0,562(0,520-0,604) <sup>a,c</sup>
Fruto imaturo	0,306(0,207–0,405) <sup>b</sup>	0,891(0,870- 0,912) <sup>b</sup>	1,732(1,674- 1,790) <sup>c</sup>	0,446 (0,423-0,469) <sup>b</sup>
Folíolos	0,524(0,49–0,555) <sup>b</sup>	0,933(0,911- 0,955) <sup>b</sup>	2,448(1,943- 2.953) <sup>b</sup>	0,615 (0,568-0,662) <sup>c</sup>
Resina seca	1,383(0,722 - 2,044) <sup>a</sup>	0,867(0,801- 0,933) <sup>ab</sup>	2,021(1,473- 2,569) <sup>a</sup>	0,575(0,486-0,664) <sup>a,c</sup>

Legenda: **H'**: índice de diversidade de Shannon-Weaver; **J**: índice de equitabilidade de Pielou. Letras iguais: não há diferenças significativas.

O número de substâncias químicas detectadas nos óleos essenciais analisados variou numa faixa grande. Enquanto no óleo essencial da resina foram encontrados 25-28 compostos, nos folíolos foram encontrados entre 66-78, nos frutos imaturos foram identificadas entre 46-58 substâncias, nos frutos maduros fechados apresentaram 53-65 componentes e, no fruto maduro aberto foram identificadas 61-62 substâncias.

A composição química do óleo essencial de fruto maduro aberto (Tabela 2) apresentou como compostos majoritários (E)- $\beta$ -ocimene,  $\alpha$ -fenchene e limonene, onde estes representam um total de 74,83% de compostos de todo o óleo. No fruto maduro fechado (Tabela 3), a composição química de compostos majoritários em 74,76% de todo óleo, revelou E- $\beta$ -ocimene,  $\alpha$ -fenchene, limonene e  $\alpha$ -phellandrene. O fruto imaturo (Tabela 4) teve como seus compostos majoritários o E- $\beta$ -ocimene, limonene e salicylaldehyde, equivalendo a 77,83% de todo óleo. Os folíolos (Tabela 5) tiveram como compostos majoritários em seu óleo essencial  $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -pinene, 3-p-menthene,  $\alpha$ -terpinene, Z- $\beta$ -ocimene e  $\alpha$ -amorphene, correspondendo a 72,37% do óleo. Por fim a resina seca (Tabela 6) revelou  $\alpha$ -pinene, sylvestrene e epi- $\alpha$ -cadinol como compostos majoritários do óleo representando um total de 74,38%.

Tabela 2. Compostos majoritários nos frutos maduros abertos de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção				Substâncias	%
Van der Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1042	1044	1048	1050	E- $\beta$ -ocimene	31.07
945	945	949	952	$\alpha$ -fenchene	27.67
1023	1024	1028	1029	limonene	16.10
1001	1002	1002	1002	$\alpha$ -phellandrene	8.86
1007	1008	1008	1011	$\delta$ -3-carene	5.49
1436	1434	1437	1436	$\gamma$ -elemene	2.03
940	942	944	950	$\beta$ -citronellene	1.12
1067	1067	1072	1072	cis-linalool oxide	0.87
1504	1505	1504	1506	premnaspirodienne	0.72
1039	1039	1045	1044	salicylaldehyde	0.52
1645	1644	1646	1646	$\alpha$ -muurolol	0.43
1293	1293	1293	1294	methy myrtenate	0.38
<b>Total</b>					<b>95.26</b>

Tabela 3 Compostos majoritários nos frutos maduros fechados de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção					
Van der Dool e Kratz		Kovats		Substâncias	%
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1042	1044	1048	1050	(E)- $\beta$ -ocimene	28.14
1023	1024	1028	1029	limonene	21.29
945	945	949	952	$\alpha$ -fenchene	12.83
1001	1002	1002	1002	$\alpha$ -phellandrene	12.50
1007	1008	1008	1011	$\delta$ -3-carene	6.30
1067	1067	1072	1072	cis-linalool oxide	3.78
1176	1174	1178	1177	terpinen-4-ol	3.52
1436	1434	1437	1436	$\gamma$ -elemene	2.59
940	942	944	950	$\beta$ -citronellene	2.12
1039	1039	1045	1044	salicylaldehyde	0.91
1645	1644	1646	1646	$\alpha$ -muurolol	0.57
1504	1505	1504	1506	premnaspirodieni	0.57
<b>Total</b>					<b>95.12</b>

Tabela 4 Compostos majoritários nos frutos imaturos de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção					
Van der Dool e Kratz		Kovats		Substâncias	%
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1039	1039	1045	1044	salicylaldehyde	35.63
1042	1044	1048	1050	(E)- $\beta$ -ocimene	28.87
1023	1024	1028	1029	limonene	13.33
1001	1002	1002	1002	$\alpha$ -phellandrene	8.68
945	945	949	952	$\alpha$ -fenchene	1.62
1436	1434	1437	1436	$\gamma$ -elemene	1.48
1504	1505	1504	1506	premnaspirodieni	1.48
1007	1008	1008	1011	$\delta$ -3-carene	1.37
940	942	944	950	$\beta$ -citronellene	1.27
1645	1644	1646	1646	$\alpha$ -muurolol	0.48
1532	1532	1534	1533	$\gamma$ -cuprenene	0.47
1517	1516	1518	1517	menthyl isovalerate	0.40
<b>Total</b>					<b>95.08</b>

Tabela 5 Compostos majoritários nos folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção				Substâncias	%
Van der Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1031	1032	1036	1037	Z- $\beta$ -ocimene	25.04
1016	1014	1020	1017	$\alpha$ -terpinene	18.69
1485	1483	1485	1484	$\alpha$ -amorphene	15.47
985	984	987	987	3-p-menthene	4.91
935	932	939	939	$\alpha$ -pinene	4.49
1001	1002	1002	1002	$\alpha$ -phellandrene	3.77
1450	1449	1452	1451	$\alpha$ -himalachene	3.60
1525	1527	1527	1528	E- $\gamma$ -macrocarpene	3.57
1364	1365	1367	1367	cis-carvyl acetate	2.82
1575	1577	1577	1578	spathulenol	2.53
1055	1054	1060	1059	$\alpha$ -terpinene	2.10
1536	1537	1538	1538	$\alpha$ -cadinene	1.92
<b>Total</b>					<b>88.91</b>

Tabela 6 Compostos majoritários de resina seca de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção				Substâncias	%
Van der Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1027	1025	1031	1030	sylvestrene	50.50
935	932	939	939	$\alpha$ -pinene	18.24
1635	1638	1637	1640	epi- $\alpha$ -cadinol	5.64
986	988	989	990	myrcene	4.70
1501	1501	1501	1501	epi-zonarene	2.74
1412	1411	1413	1412	2-epi- $\beta$ -funebrene	2.65
1007	1008	1008	1011	$\delta$ -3-carene	2.36
976	974	980	979	$\beta$ -pinene	1.31
1138	1137	1141	1142	trans-sabinol	1.28
1194	1194	1195	1195	myrtenol	1.24
1478	1478	1479	1479	$\gamma$ -muurolene	1.14
1160	1160	1164	1164	cis-chrysanthenol	1.02
<b>Total</b>					<b>92.82</b>

A composição qualitativa e centesimal dos óleos essenciais extraídos evidenciaram um agrupamento bem distinto entre os óleos essenciais das amostras de resina seca, de folíolos e de frutos. Entretanto, as distinções de agrupamento entre os diferentes estados de maturação de fruto que foram extraídos revelaram em níveis de fusão mais basais, num dendrograma bem representativo da matrix de Coeficientes de Distância de Manhattan Total que foi analisada (Figura 11).

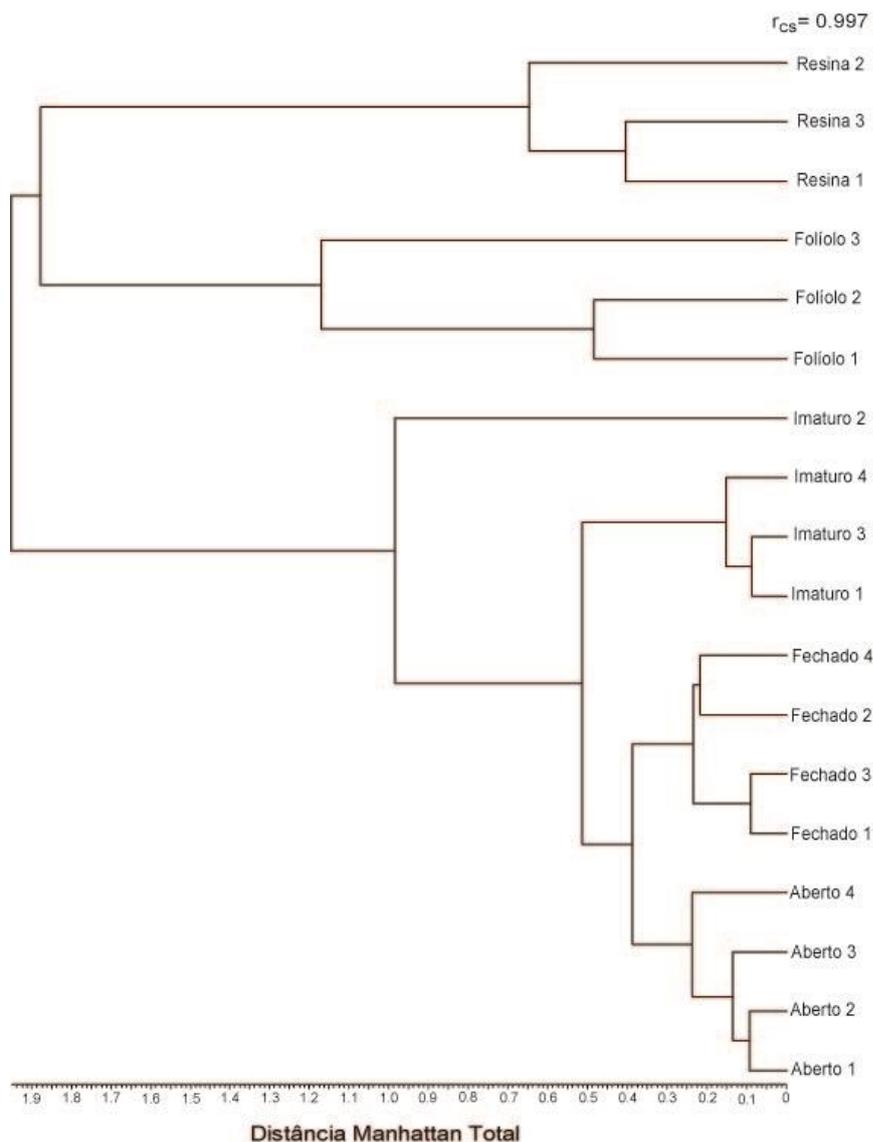


Figura 11. Dendrograma de agrupamento das amostras de *Protium icariba* (DC) Marchand, construído a partir da média de grupos formados pelos coeficientes de Distância de Manhattan Total. Aberto: fruto maduro deiscente; Fechado: fruto maduro ainda não deiscente; Imaturo: Fruto jovem com tamanho de fruto maduro mas ainda com epicarpo de cor verde.

A análise de substâncias indicadoras (Figura 12) revelou que os compostos majoritários nem sempre podem determinar a identificação típica do material vegetal ou dos estágios de maturação dos frutos.

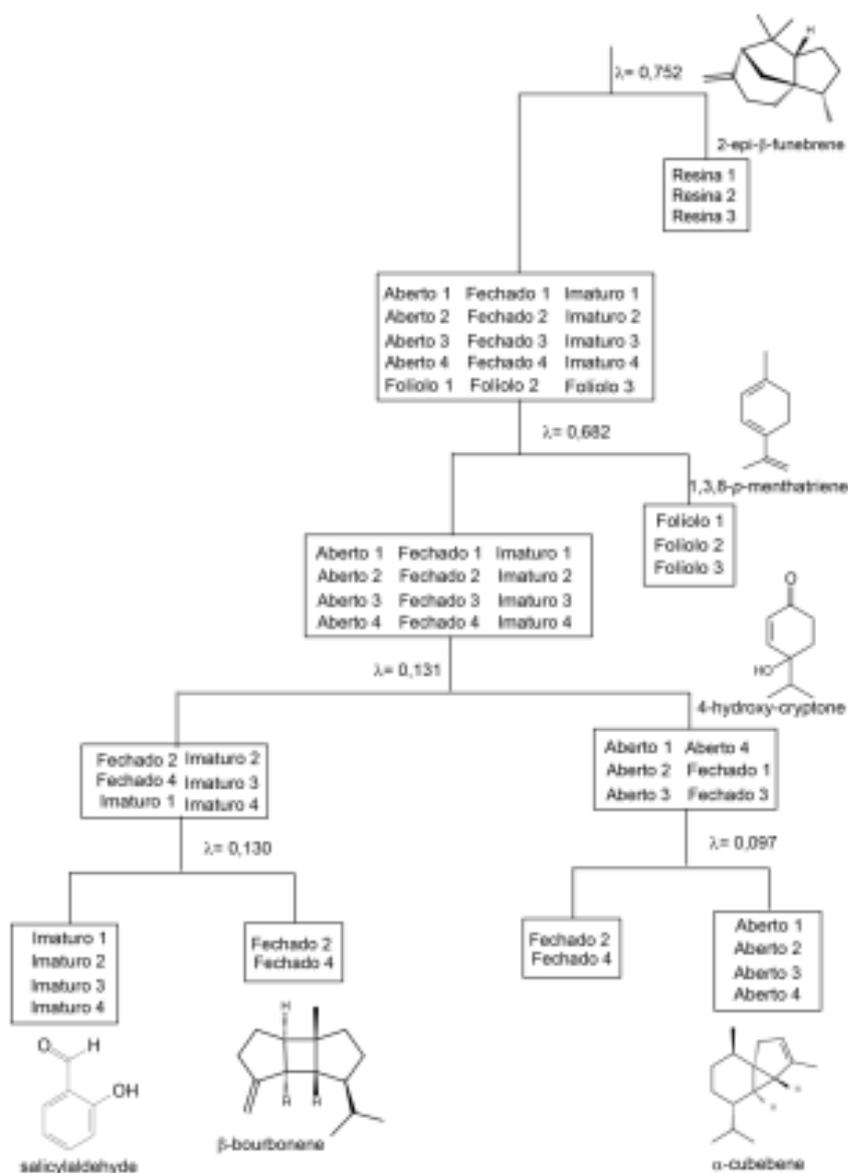


Figura 12. Diagrama de ordenação por análise de substâncias indicadoras (TWINSpan) entre os óleos essenciais de frutos maduros abertos (Aberto) e fechados (Fechado), frutos imaturos (Imaturos), folíolos e resina seca (Resina) de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Os óleos essenciais obtidos da resina foram principalmente marcados pela presença do 2-epi- $\beta$ -burnesene, enquanto o óleo essencial obtido a partir dos folíolos

foi caracterizado pela 1,3,8-*p*-menthatriene. O  $\alpha$ -cubebene permitiu a diferenciação dos frutos maduros abertos. Partes das amostras dos frutos maduros fechados podem ser caracterizadas pelo  $\beta$ -bourbonene. O perfil químico dos frutos imaturos não revelou nenhum marcador que os identificasse, sendo agrupados por exclusão dos demais.

## 5. DISCUSSÃO

O fruto de *P. icicariba* ocorrentes na área de estudo apresentou o padrão típico dos filotrimídios, frutos carnosos cuja deiscência acomete apenas o epicarpo (Barroso *et al.*, 2004). O fruto é drupóide e se caracteriza como filotrimídio, originados de ovário ínfero, cujo exocarpo é mais ou menos coriáceo de pouca espessura e cor parda a avermelhada, frequentemente quebradiço de deiscência valvar, que evidencia o contraste do epicarpo vermelho vinoso com o mesocarpo esbranquiçado. O epicarpo desde imaturo apresenta ductos secretores de oleorresina seca. O mesocarpo se apresenta membrano-carnoso, de cor geralmente branca e cobre a superfície de cada pirênio, onde este possui a forma ovóide de textura firme, de coriácea a sublenhosa e mostra no lado externo (no ponto de inserção da semente) uma porção de cor diferente das demais porções restantes. A semente possui uma testa membranácea (Ferri *et al.*, 1981, Siani *et al.*, 2004; Barroso *et al.*, 2004). É esta desicência que coloca em evidência o contraste entre a coloração vermelha vinoso do epicarpo e o branco do mesocarpo carnoso que reveste os pirênios.

O contraste do epicarpo vermelho vinoso com o mesocarpo esbranquiçado do fruto de *Protium icicariba* segue um padrão visual que compreende alguns dos atributos mais expressivos da síndrome de dispersão por zoocoria (van der Pijl 1978), já que apresenta um forte contraste de coloração facilitando ser visto por aves, entretanto em caráter secundário a presença deste óleo poderia sinalizar para um sistema secundário de dispersão. A dispersão de sementes desse fruto foi descrita como ornitorcoria uma área de restinga no Rio de Janeiro (Gomes *et al.*, 2008) e dispersão secundária por mimercocorica em uma reserva de Floresta Atlântica em Permanbuco (Silva *et al.*, 2007).

O aroma adocicado perceptível no fruto pode ter a mesma origem que os aromas exalados quando as partes vegetativas dos indivíduos desta espécie são feridas, uma vez que foram identificadas nos frutos, tanto uma oleorresina que é capaz de produzir exsudações de pequena intensidade, como as estruturas anatômicas responsáveis pela sua secreção.

A literatura tem consagrado a existência de ductos secretores de oleorresina em espécies do gênero *Protium* (Engler, 1874), ao mesmo tempo em que são também comuns os relatos de ductos e cavidades secretoras tanto para este gênero como para a família Burseraceae (Siani *et al.*, 2004).

A análise anatômica dos frutos, folíolos e ramos jovens, permitiu evidenciar os dois padrões de estruturas secretoras. As cavidades, desde isodiamétricas até romboides, foram visualizadas em regiões parenquimáticas, sem associações mais imediata com floema. Os ductos, mais calibrosos, foram facilmente visualizados nos ramos e nervuras secundárias dos folíolos, assim como em meio ao tecido do fruto que constituiria o mesocarpo carnoso. A mesma distribuição de ductos secretores associados ao floema em traços vasculares de pequeno calibre foi identificada em flores de *Protium morii* D.C. Daly e *P. obtusifolium* Marchand (Bachelier e Edress, 2009).

A oleorresina de *Protium icicariba* pode ser encontrada em todas as partes da planta. Contudo, o perfil fitoquímico qualitativo e quantitativo evidenciou óleos essenciais com características bem distintas.

A equitabilidade encontrada evidencia a maneira pela qual o número de substâncias químicas está distribuído em suas proporções nas espécies em estudo, indicando o grau de simetria na distribuição proporcional de massas entre os componentes dos óleos essenciais. Os valores menores que um vão expressando uma concentração cada vez mais irregular entre os componentes na medida em que se aproximam de zero, o que é muito comum nos óleos essenciais nos quais se identificam facilmente mais de 40 substâncias, porém apenas um pequeno número é responsável pela maior proporção de massas (Bakkali *et al.*, 2008).

A composição química dos óleos essenciais sofre importante influência do ambiente e tipo de cultivo que o vegetal é submetido, especialmente nas espécies cuja estocagem ocorre em regiões mais superficiais (Maciel *et al.*, 2002). Os óleos podem conter, mais comumente, cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Geralmente 2 ou 3 componentes apresentam-se em maior concentração (20 – 70%) que vão caracterizar o óleo e determinar sua propriedade biológica (Bakkali *et al.*, 2008).

Os mono e sesquiterpenos dominaram o perfil cromatográfico dos óleos essenciais estudados. Este fato tem sido comumente descrito na literatura onde as oleorresinas se apresentam como uma dispersão natural de ácidos diterpênicos em

uma mistura de mono- e sesquiterpenos, que são os principais componentes do óleo essencial (Rigamonte-Azevedo *et al.*, 2006; Cole, 2008).

A fração volátil dos frutos maduros de *P. icicariba* é composta de mono- e sesquiterpenos, em particular o E- $\beta$ -ocimene, o limonene e o Z- $\beta$ -fenchene. Por outro lado, o óleo essencial dos folíolos consistiu principalmente de Z- $\beta$ -ocimene,  $\alpha$ -terpinene e  $\alpha$ -amorphene. Entretanto estes resultados divergem dos encontrados no óleo essencial dos folíolos constituído principalmente sesquiterpeno germacreno, seguido em abundância pelo  $\alpha$ -copaeno, pelo  $\gamma$ -elemeno e pelo  $\sigma$ -cadineno (Siani *et al.*, 2004).

Este perfil fitoquímico apresenta algumas divergências em relação à literatura. Quimicamente, os óleos essenciais da família Burseraceae são, em sua maioria, constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta normalmente monoterpenos e sesquiterpenos, mas, dependendo do método e extração e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo essencial (Simões *et al.*, 2004).

Variações qualitativas e quantitativas desta ordem na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal podem estar relacionadas com várias causas diferentes. Estes tipos de diferenças podem ocorrer como consequência da variação intra-clonal no melhoramento genético de cultivares exclusivamente de propagação vegetativa de rosa com cheiro de gerânio, *Pelargonium* sp., sugerindo que mesmo variações genéticas somáticas podem afetar a biossíntese e a produção de óleo essencial (Kulkarni *et al.*, 1997). Em outras situações, essas diferenças podem ser devido a razões ambientais que podem envolver a origem geográfica, como consequência de estresse produzido por fatores abióticos como vento, umidade do ar e salinidade (Kokkini *et al.*, 1994). A forma de cultivo pode também ocasionar variações na composição do óleo essencial (Paul *et al.*, 2010), e mesmo o processo de extração não deve ser descartado (Sefidkon *et al.*, 2007). Neste caso, o processo experimental de extração pode ser refutado como uma causa para esta variação, uma vez que os três compostos principais eram os mesmos encontrados anteriormente, após a extração e análise cromatográfica exatamente nas mesmas condições como descritas aqui (Silva *et al.*, 2010).

O rendimento extrativo do óleo essencial encontrado para a resina foi menor que o previsto na literatura, registrado entre 2,9 - 9,7%, sendo composto exclusivamente de monoterpenos, em particular o terpinoleno. A extração do óleo essencial dos frutos tem um rendimento de 0,8-1,0%, e também apresenta predomínio de monoterpenos, mas há evidências da presença de sesquiterpenos, embora pouco representativa. Por outro lado, o óleo essencial das folhas consistiu principalmente sesquiterpeno germacreno, seguido em abundância pelo  $\alpha$ -copaeno, pelo  $\gamma$ -elemeno e pelo  $\sigma$ -cadineno (Siani *et al.*, 2004).

Análises fitoquímicas realizadas *Protium icicariba* mostraram que a resina, cujo maior rendimento em óleo essencial variou de 2,9-9,7%, apresenta exclusivamente monoterpenos. Nos frutos, o rendimento foi de 0,8-1,0%. Por outro lado, o óleo essencial das folhas consistia principalmente de sesquiterpenos, entre 75-93% de sua composição. O perfil químico da resina é caracterizado predominantemente pelo *p*-cimeno, acrescido do *p*-cimen-8-ol, contrabalanceado pela soma do conjunto de todas as substâncias alicíclicas, como o  $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\alpha$ - terpinoleno (Siani *et al.*, 2004).

A predominância de sesquiterpenos nas folhas já foi descrita para outras espécies amazônicas de *Protium*. A folha de *P. icicariba* acumula majoritariamente um tipo de sesquiterpeno, o germacreno, seguida em abundância pela  $\alpha$ -copaeno,  $\gamma$ -elemeno e  $\delta$ -cadineno. Entre os constituintes monoterpênicos minoritários nas folhas, estão os terpinenos. O mesmo vale para o óleo do fruto, onde os monoterpenos do tipo terpineno representam regularmente cerca de 50% da composição. Não existem dados suficientes sobre os componentes voláteis dos frutos das espécies de Burseraceae (Siani *et al.*, 2004).

Do fruto maduro aberto não foi obtido um rendimento extrativo de óleos essenciais melhor do que o obtido a partir das resinas secas, que endurecem após exposição prolongada às condições ambientais que, neste caso, correspondem às disponíveis na restinga. A diversidade química dos frutos abertos foi menor que a dos folíolos. Do ponto de vista ecológico, este fato aponta para algumas reflexões.

Os frutos imaturos foram agrupados principalmente pela presença majoritária do salicilaldeído que foi apontado como um precursor do ácido salicílico em plantas (Phidham,1965). De fato, esse grupo de compostos fenólicos derivados da via ácido chiquímico tem desempenhado papel ecológico tanto na proteção contra agentes infecciosos (Harbone,2001) como no processo de maturação dos frutos, na forma de ácido salicílico ( Storage, 2012; Kant et al, 2016; Harbone, 2001; Srivastava e

Upendra, 2000; Ding e Wang,2003). No processo de maturação dos frutos, onde o ácido salicílico participa como modulador desacelerando o processo de maturação induzindo também o amaciamento dos frutos carnosos.

Em *Protium icicariba* os teores de salicilaldeído se tornam residuais antes e depois da deiscência do fruto e não figuram entre os óleos essenciais provenientes do eixo vegetativo.

Os óleos essenciais são um produto do metabolismo secundário e estão contidos em vários órgãos da planta. Possuem várias funções importantes para os vegetais dentro do seu ecossistema, pois atuam defendendo-o contra microorganismos e predadores (Henriques *et al.*, 2000) e como sinalizadores químicos em vários processos ecológicos, como a polinização (Silva e Lutz 2004), a dispersão de frutos e sementes (Harborne, 1993), ou mesmo a localização de hospedeiros por seus insetos galhadores (Moura *et al.*, 2009).

## **6. CONCLUSÕES**

O possível envolvimento primário de vertebrados na dispersão pode ser considerado, mas que os óleos essenciais não representam um papel relevante para atração dos dispersores porque eles estão contidos em estruturas internas fechadas do epicarpo ao fruto que se destaca do ariloide do pireneo no processo de deiscência quando maduros. No ariloide a presença de ductos oleoreseníferos é bem mais esparsa e limitado aos feixes vasculares que percorre o tecido do mesocarpo do qual deriva o ariloide branco que envolve o pireneo.

Desta forma, o eventual teor de óleos essenciais na unidade de dispersão contendo o pireneo e ariloide branco tem mais chances de afetar a palatabilidade do diásporo ou uma sinalização secundária, do que atuar primeiramente na sinalização a dispersores.

Esses resultados reforçam a ideia de que o contraste de cores vermelho e branco, respectivamente, do epicarpo e do ariloide prevalecem como sinalizadores visuais de dispersão.

## 7. REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. (2009): Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fourth. ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Araújo, D.S.D.;Pereira M.C.A.; Pimentel M.C.P. (2004): Flora e estrutura de comunidades na restinga de Jurubatiba – síntese dos conhecimentos com enfoque especial para a formação Aberta de Clusia. In: Rocha CFD, Esteves FA, Scarano FR (org) Pesquisa de longa duração na restinga de Jurubatiba – ecologia, história natural e conservação. São Carlos, Ed. Rima, pp. 59-76
- Bachelier, J.B.; Endress, P.K. (2009): Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae andBurseraceae (Sapindales), with a special focus on gynoeceum structure and evolution. Botanical Journal of the Linnean Society, 159: 499-571.
- Bakkali, F.; Idaomar, M.; Averbeck, D.; Averbeck, S. (2008): Biological effects of essential oils: a review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446–475.
- Bandeira, P.N.; Pessoa, O.D.; Trevisan, M.T.; Lemos, T.L. (2002): Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. Química Nova, 25(6b): 1078-1080.
- Barroso, G.M.; Morim, M.P.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L. (2004): Frutos e sementes – Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledônea. UFV, Viçosa.
- Brower, J.E.; Zar J.H.; Ende, C..N.V. (1997): Field and Laboratory Methods for General Ecology. 4 ed. Boston, WCB McGraw-Hill
- Cepermar (2007): Plano de Manejo do Parque Estadual Paulo César Vinha. Relatório Técnico COM RT. 1001 f.
- Cole, E.R. (2008): Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue. MSc dissertation, Federal University of the Espírito Santo - Brazil, Department of Chemistry, Center of Exact Sciences.
- CONAMA (1996): Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 07, de 23 de julho de 1996. Aprova os parâmetros básicos para análise da vegetação de restinga no Estado de São Paulo. Diário Oficial da União 165: 16386-16390

- Costa, A.F. (1972): Farmacognosia: farmacognosia experimental. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. v. 3.
- Cuatrecasas, J. (1957): Flora colombiana Prima XII. Revista da Academia Colombiana de Ciencias Exactas, v. 2, p. 435-441.
- Ding, C.K.; Wang, C. Y. (2003): The dual effects of methyl salicylate on ripening and expression of ethylene biosynthetic genes in tomato fruit. Plant Science 589-596.
- Dusenbery, D. (1992): Sensory ecology: how organisms acquire and respond to information. New York: W.H. Freeman.
- Engler, H.G. (1874): *Protium icicariba* (DC) Marchand. In von Martius CFP, Eichler AW, Urban, I. Flora brasiliensis, 12(2):267-268.
- Ferreira, L.C.; Thomaz, R.D.; Oliveira, D.A.; Silva, A.G. (2010): Estrutura populacional e padrão espacial de *Protium icicariba* (DC.) Marchand na Área de Proteção Ambiental de Setiba, Espírito Santo, sudeste do Brasil. Natureza on line, 8(1): 39-45.
- Ferri, M.G.; Menezes, N.L; Monteiro, W.R. (1981): Glossário Ilustrado de botânica. Nobel, São Paulo.
- Francisco, M.R.; Galetti, M. (2002): Aves como potenciais dispersores de sementes de *Ocotea pulchella* Mart. (Lauraceae) numa área de vegetação de cerrado do sudeste brasileiro. Revista Brasileira de Botânica 25: 11-17.
- Francisco, M.R.; Lunardi, V.O.; Galetti, M. (2007): Bird attributes, plant characteristics, and seed dispersal of *Pera glabrata* (Schott, 1858), (Euphorbiaceae) in a disturbed cerrado area. Brazilian Journal of Biology, 67(4): 627-634.
- Gentry, A.H. (1984): Field guide to woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru). Washington, DC: Conservation International. 1993.
- Gomes, V.S.M.; Loiselle, B.A.; Alves, M.A. (2008): Birds foraging for fruits and insects in shrubby resting vegetation, southeastern Brazil. Biota Neotropica, 8(4): 021-031.
- Gonçalves, L.A.; Barbosa L.C.A.; Azevedo A.A.; Casali V.W.D.; Nascimento E.A. (2003): Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 6:8-14.

Guedes, D.; Barbosa, L.M.; Martins, S.E. (2006): Composição florística e estrutura fitossociológica de dois fragmentos de floresta de restinga no Município de Bertioga, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20: 299-311.

Harborne J.B. (1984): *Phytochemical Methods; A guide to modern techniques of plant Analysis*. Edition, London New York.

Harborne, J. (2001): *Twenty-five years of chemical ecology*. Plant Science Laboratories, University of Reading, London.

Harborne, J.B. (1993): *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London.

Henriques, M. G. M.; Siani, A. C.; Rosas, E. C.; Guimarães, Anderson Cavalcanti; Zoghbi, M. G. B.; Soares, R. O. A. (2000): Óleos essenciais – Potencial antiinflamatório. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 3 (16): 38-43.

Hill, M.O. (1979): *Twinspan. A Fortran program for arranging multivariate data in an ordered two-way table by classification of the individuals and attributes*. Ithaca: Cornell University.

Howe, H. F. (1993): Aspects of variation in a neotropical seed dispersal system. *Vegetatio*, Ames, v. 107, n. 108, p. 149-162.

Janzen, D. H. (1970): Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *American Naturalist*, v. 104, p. 501-528.

Jensen, W.A. (1962): *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco, W. H. Freeman.

Kaiser, R. (1993): Verbal description of scents. In: *The scent of orchids: olfactory and chemical investigations*. pp. 40-45. Amsterdam: Elsevier,

Kant, K.; Arora, A.; Singh, V. P. (2016): Salicylic acid influences biochemical characteristics of harvested tomato (*Solanum lycopersicon* L.) during ripening.

Khalid, S.A. (1983): Chemistry of the Burseraceae. In: Waterman, P.G.; Grundon, M.F. (Eds). *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, New York. p. 281-299.

Knudsen, J.T.; Tollsten, L. (1993): Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society* 113: 263-284.

Knudsen, J.T.; Tollsten, L. (1995): Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* 119: 45-57, 1995.

Kokkini, S.; Karousou, R.; Vokou, D. (1994): Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Biochem. System. and Ecol.* 22(5):517-528.

Konarev, V.G. (1972): *Cytochemistry and histochemistry of plants*. Jerusalem, Wiener Bindery.

Krohling, C.A.; Eutrópico, F.J.; Silva, A.G. (2010): Interações inseto-planta em *Solanum hexandrum* Vell. (Solanaceae): polinização e herbivoria na Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica, Espírito Santo. *Natureza on line*, 8(2): 78-85.

Kulkarni, R.N.; Baskaran, K.; Ramesh, S.; Kumar, S. (1997): Intra-clonal variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cuttings of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). *Industrial Crops and Products*, 6 (2): 107-112.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Júnior, V. F. (2002): Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 429-438.

Marinho-Filho, J.; Vasconcellos-Neto, J. (1994): Dispersão de sementes de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. (Guttiferae) por morcegos na região de Manaus, Amazonas. *Acta Botânica Brasilica*, 8(1): 87-96.

Martins, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E. (2002): *Plantas Medicinais*. Viçosa: Editora UFV.

Moura, M.Z.D.; Alves, T.M.A.; Soares, G.L.G.; Isaia, R.M.S. (2009): Intra-specific phenotypic variations in *Lantana camara* leaves affect host selection by the gall maker *Aceria lantanae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37:541–548

Odum, E. P. (1998): *Ecologia*. Rio de Janeiro: Guanabara.

Oliveira, R.A.; Lima, E.O.; Vieira, W.L.; Freire, K.R.; Trajano, V.N.; Lima, I.O.; Souza, E.L.; Toledo, M.S.; Silva Filho, R.N. (2006): Estudo da interferência de óleos essenciais sobre atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1): 77-82.

Paul, A.; Thapa, G.; Basub, A.; Mazumdarb, P.; Kalita, M.C.; Sahoo L. (2010): Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. - an industrially important aromatic plant. *Industrial Crops Production*, 32:366-374.

Pellmyr, O; Thien, L.B. (1986): Insect reproduction and floral fragrances: keys to the evolution of the angiosperms? *Taxon*, 35: 76-85.

Peternelli, E.F.; Lucia, T.M.; Martins, S.V. (2004): Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). *Revista Árvore*, 28(5): 733-738.

Pridham, J. B. (1965): Low molecular weight phenols in higher plants. Royal Holloway College (University of London), Englefield Green, Surrey, England.

Rigamonte-Azevedo, O.C.; Wadt, P.G.S.; Wadt, L.H.O. (2006): Potencial de produção de óleos resina de copaíba (*Copaifera* spp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. *Revista Árvore*, 30 (4): 583-591.

Santos, B.R.; Paiva, R.; Castro, E.M.; Cardoso, M.G.; Rezende, R.K.; Paiva, P.D. (2004): Aspectos da anatomia e do óleo essencial em folhas de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Spreng.). *Ciência e Agrotecnologia*, 28(2): 345-349.

Saravy, F.P.; Freitas, P.J.; Lage, M.A.; Leite, S.J.; Braga, L.F.; Sousa, M.P. (2003): Síndrome de dispersão em estratos arbóreos em um fragmento de floresta ombrófila aberta e densa em Alta Floresta - MT. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, 2(1):1-12.

Sass, J.E. (1951): *Botanical microtechnique*. 2 ed. Iowa, Iowa State College Press.

Sefidkon, F.; Abbasi. K.; Jamzad, Z.; Ahmadi S. (2007): The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chemistry*, 100, 1054-1058.

- Shepherd, G.J. (1995): Fitopac 1. Campinas: Departamento de Botânica, Unicamp.
- Siani, A.C.; Garrido, I.S.; Monteiro, S.S.; Carvalho, E.S.; Ramos, M.F.S. (2004): *Protium icicariba* as a source of volatile essences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 477-489.
- Siani, A.C.; Sampaio, A.L.; Sousa, M.C.; Henriques, M.G.; Ramos, M.F. (2000): Óleos Essenciais. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 16(3): 38-43.
- Silva A.F.; Barbosa L.C.A.; Silva E.A.M.; Casali V.W.D.; Nascimento E.A (2003): Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6: 1-7.
- Silva, A.G.; Almeida, D.L.; Ronchi, S.N.; Bento, A.C.; Scherer, R.; Ramos, A.C.; Cruz, Z.M.A. (2010): The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasites & Vectors*, 3: 79.
- Silva, A.G.; Lutz, L.V. (2004): Sinalização ou atração floral? Uma abordagem química para a polinização. *Natureza on line* 2(1): 10–14.
- Silva, P. D.; Leal, I. R.; Wirth, R.; Tabarelli, M. (2007): Harvesting of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. seeds (Burseraceae) by the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. promotes seed aggregation and seedling mortality. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 30.
- Silva, R.A.D. (1926): Elemi. In: *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. 1 ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, p. 281.
- Silva, R.K.; Feliciano, A.L.; Marangon, L.C.; Lima, R.B.; Santos, W.B. (2012): Estrutura e síndromes de dispersão de espécies arbóreas em um trecho de mata ciliar, Sirinhaém, Pernambuco, Brasil. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 32(69): 1-1
- Simões, C.M.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.; Mentz, L.A.; Petrovicks, P.R. (2004): Farmacognosia: da planta ao medicamento. In: Simões, C.M.; Spitzerr, V. (5ed.) Óleos voláteis. Florianópolis, Porto Alegre: UFS/UFRGS, p. 467-469.
- Siqueira, J.B.G. Estudo fitoquímico do gênero *Protium* (1991): *P. unifoliolatum* (Engl.) Engl. e *laxiflorum* P. Engl. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.
- Spencer, K.C. (1988): *Chemical mediation of coevolution*. San Diego: Academic Press.

Srivastava, M.K.; Upendra, N. D. (2000): Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science* 87-96.

Stefanello, D.; Bulhão, C.F.; Martins, S.V. (2009): Síndromes de dispersão de sementes em três trechos de vegetação ciliar (nascente, meio e foz), ao longo do rio Pindaíba, MT. *Revista Árvore*, 33(6): 1051-1061.

Stefanello, D.; Ivanauskas, N.M.; Martins, S.B.; Silva, E.; Kunz, S.H. (2010): Síndromes de dispersão de diásporos das espécies de trechos de vegetação ciliar do rio das Pacas, Querência – MT. *Acta Amazônica*, 40(1): 141-150.

Storage, D. (2012): Effect of salicylic acid and essential oils treatments on quality characteristics of apple (*Malus domestica* Var. Granny Smith) fruits. *Asian Journal of Biochemistry*.

Susunaga, G. S. (1996): Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae). Tese de Mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil.

ter Braak, C.J.F. (1987): Ordination. In: Jongman, R.H.G.; ter Braak C.J.F.; van Tongeren O.F.R. (eds.) *Data analysis in community and landscape ecology*, pp. 91-173. Wageningen, Pudoc.

Thomazi, R.D, Silva, A.G (2014): Florística, diversidade e estrutura horizontal e vertical de uma área de vegetação arbustiva aberta numa planície arenosa costeira do Espírito Santo, sudeste do Brasil. *Natureza on line* 12 (1): 10-18.

van der Pijl L. (1982): *Principles of dispersal in higher plants*. Springer-Verlag, Berlin.

Verçoza, F.C.; Martinelli, G.; Baumgratz, J.F.; Esbérard, C.E. (2012): Polinização e dispersão de sementes de *Dysochroma viridiflora* (Sims) Miers (Solanaceae) por morcegos no Parque Nacional da Tijuca, um remanescente de Floresta Atlântica no Sudeste do Brasil. *Natureza on line*, 10(1): 7-11.

Vilegas, J.H.Y. (1997): Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicadas ao controle de qualidade de plantas medicinais brasileiras. 150f. Tese (Livre Docências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Vogel, S. (1963): Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung; über Bau und Funktion der Osmophoren. Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse: Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mainz 10: 1-165.

Williams NH; Whitten WM (1983): Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. Biological Bulletin 164 355-395.

Zar, J.H. (2010): Biostatistical analysis. 5 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall.