



MANOEL EUCLIDES DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA EM
DIFERENTES AMBIENTES E ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIMES DE
Copaifera langsdorffii Desf.**

**LAVRAS - MG
2010**

MANOEL EUCLIDES DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA EM DIFERENTES AMBIENTES E
ÓLEOS ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIMES DE *Copaifera langsdorffii*
Desf.**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, área de concentração em
Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, para a
obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

**LAVRAS - MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Nascimento, Manoel Euclides do.

Caracterização anatômica em diferentes ambientes e óleos
essenciais de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii* Desf. /
Manoel Euclides do Nascimento. – Lavras : UFLA, 2010.

166 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Copaíba. 2. Composição química. 3. Meio ambiente. 4. Luz.
5. Temperatura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.883323

MANOEL EUCLIDES DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA EM DIFERENTES AMBIENTES E
ÓLEOS ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIMES DE *Copaifera langsdorffii*
Desf.**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, área de concentração em
Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, para a
obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de julho de 2010

| | |
|--------------------------------------|------|
| Dr. Evaristo Mauro de Castro | UFLA |
| Dra. Maria das Graças Bichara Zoghbi | MPEG |
| Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci | UFLA |
| Dr. Jorge Henrique Chagas | UFLA |

Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

**LAVRAS – MG
2010**

*A minha esposa, **Lúcia** e a minha filha, **Mira Ketlen**,*

OFEREÇO

Aos meus pais, **Euclides e Carolina**;
a minha irmã **Vera**
a ao meu sogro **Lucínio**
(*in memoriam*),

*entes queridos que perdi neste período de minha vida e que hoje intercedem
junto a Deus por mim.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Nossa Senhora, a São Miguel e a toda a Corte celeste, que sempre protegem e iluminam meu caminho.

A minha família, meu grande exército de três pessoas, sempre imbatíveis em Jesus Cristo, pelo amor e pela oração.

Ao meu orientador, José Eduardo Brasil Pereira Pinto, que não vacilou em confiar no meu potencial, na minha capacidade e profissionalismo, estando sempre atento às minhas necessidades, minha gratidão, *forever*.

Aos meus irmãos, em especial a Maria e Joaquim, que movem montanhas pelo meu bem-estar.

A minha sogra e ao meu cunhado, que redirecionaram suas vidas em função do meu doutorado.

A tia Tetê (Terezinha de Jesus Carvalho), pelas constantes orações, indispensáveis para o sucesso deste trabalho.

Ao Padre Luiz Carlos, pela amizade e apoio espiritual dado a mim e a toda a minha família, especialmente nos momentos mais difíceis.

Ao querido amigo Padre Severino, pela amizade, orações e pelo grande apoio a toda a minha família, pelo carinho e solidariedade, prestando importante contribuição, meus sinceros agradecimentos.

A amiga Iracy, pela amizade, pelas orações, jejuns e interseções, nos diversos momentos, inclusive quando estive doente, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos da igreja, especialmente a Ana, Jacy e Maria Franco, pela amizade, carinho, respeito e orações. Pessoas como vocês provam, com a simplicidade e com a verdadeira amizade, a beleza, a mística e a força da vida em comunidade.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pelo acolhimento, confiança, carinho e amizade, sempre disponibilizando equipamentos, literaturas e materiais necessários ao desenvolvimento do meu trabalho, obrigado!

À Dra. Maria das Graças Bichara Zoghbi, pela amizade, ajuda, companheirismo e cumplicidade, indispensáveis na realização deste trabalho, meu carinho e respeito incondicional.

Ao Dr. Osmar Alves Lameira, pelo incentivo, amizade e contribuições para a efetivação desta importante etapa de minha vida.

Ao professor Eduardo Alves, que soube, com toda paciência e perícia, encontrar um tempo para transmitir as técnicas e estar ao meu lado no preparo de lâminas para este trabalho, o meu respeito e agradecimentos.

Aos professores Daniel Melo de Castro e Suzan Kelly Vilela Bertollucci, pelas valiosas sugestões e contribuições.

Em particular, aos professores José Luis Contado, Renato Lima e Maria das Graças Cardoso, pelo apoio e especial amizade, sempre disponíveis quando solicitados.

Aos professores do Setor de Sementes, Renato Guimarães Mendes, João Almir e Maria Laene, pelos ensinamentos, orientações, apoio e acolhimento, minha admiração e meu muito obrigado.

A todos os meus professores, pela dedicação, aprofundamento e seriedade com que transmitiram valiosos conhecimentos.

Aos amigos Jessé e Ataander, verdadeiros irmãos, pelo apoio e atenção, pessoas do bem, que não mediram esforços quando solicitados.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, em especial ao Evaldo, Luiz, Fúlvia, Priscila, Lucila e Carla, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Eloísa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, sempre muito atenciosa e disposta a colaborar nos diversos momentos em que foi solicitada.

Ao Dico e aos demais funcionários do Horto de Plantas Medicinais, que sempre se colocaram à disposição para ajudar, especialmente na montagem dos experimentos.

Aos funcionários da Biblioteca, sempre atenciosos e eficientes, e que contribuíram para a efetivação de várias pesquisas bibliográficas.

Aos colegas de estudo, Francisco, Marcelo, Márcia, Keline, Dione e Fernando, meu sincero agradecimento pelo apoio e amizade.

À Capes, pela concessão de um ano e meio de bolsas, possibilitando o custeio de despesas com pesquisas e experimentos.

À dona Cidinha, sempre preocupada com meu bem-estar e minha alimentação, expressando carinho e amizade, durante minha estadia em Lavras.

Aos demais colegas que, de alguma forma, contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado !!!.

RESUMO GERAL

O óleo-resina de *C. langsdorffii* é produzido no interior de estruturas secretoras, cujos estudos anatômicos são raros, sobretudo em diferentes fases de desenvolvimento da planta. É uma espécie com crescimento inicial normal, porém, ele torna-se lento na fase subsequente. São escassos os estudos sobre a composição química intraespecífica do óleo essencial nos diferentes órgãos da planta. Este trabalho foi realizado com os objetivos de caracterizar a anatomia dos elementos secretores nos órgãos vegetativos, em diferentes ambiente e fases de desenvolvimento; testar os efeitos do estresse térmico e a intensidade e a qualidade de luz sobre as plantas jovens e, ainda, analisar o teor e realizar a identificação dos constituintes químicos do óleo essencial nos diferentes órgãos da planta adulta. O estudo anatômico foi realizado a partir do material botânico nativo do campus da UFLA, em Lavras, MG e foi processado em microscopia fotônica e eletrônica. Após trinta dias do início da germinação, as plantas jovens provenientes de sementes foram aclimatizadas em dois experimentos. No primeiro, sob malhas azul, vermelha e preta (50%), preta (70%) e pleno sol; no segundo experimento, em câmaras BOD, nas temperaturas de 15°C, 25°C, 35°C e a testemunha, que permaneceu em casa de vegetação (29°C). As amostras de folha, caule, pericarpos e sementes foram reduzidas, acondicionadas e armazenadas em freezer, a -20°C, para posterior extração do óleo essencial por hidrodestilação em Clevenger. Foi medido o teor de óleo essencial em 240 amostras das folhas, caules e pericarpos. Cada órgão foi analisado em cinco diferentes espécimes e em quatro diferentes tempos de hidrodestilação. A composição química foi identificada por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas, a partir de cinco amostras das folhas, caules e pericarpos e quatro amostras das sementes. O óleo essencial acumula-se em cavidades secretoras nas folhas e em ductos secretores no caule das plantas jovens e adultas. Nos dois experimentos, sob diferentes ambientes, constataram-se variações na densidade estomática, na espessura do mesófilo, na área foliar e na produção de biomassa seca, para as mudas cultivadas sob malhas vermelha e azul e para as plantas jovens submetidas a 25°C, que se tornaram mais vigorosas, com melhores condições morfoanatômicas nos órgãos vegetativos, estruturas e tecidos foliares. Ocorreu significativa variação nos teores de óleo essencial entre os órgãos e os espécimes, tendo o maior rendimento sido observado nos pericarpos, seguido das folhas e dos caules. Os compostos majoritários encontrados em todos os espécimes e órgãos avaliados foram δ -elemeno, α -copaeno, β -cubebeno, cipereno, β -cariofileno, cumarina, germacreno D, viridifloreno, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *iso*-espatulenol, *epi*- α -muurolol, α -muurolol, α -cadinol

e (2*E*, 6*E*)-farnesoato de metila. Houve significativa variação intraespecífica e maior similaridade entre os constituintes químicos das folhas e dos caules.

Palavras-chave: Caracterização anatômica. Aclimatização. Óleo essencial. Constituintes voláteis. *C. langsdorffii*.

ABSTRACT GERAL

The oil-resin of *C. langsdorffii* is produced within the secretory structures, whose anatomical studies are rare, especially at different stages of plant development. It is a species with normal initial growth, but it is slow in the subsequent phase. Are few studies on the chemical composition of intra-specific essential oil in different plant organs. The aim of this study was to characterize the anatomy of secretory elements in vegetative organs at different stages of development and environment, test the effects of heat stress and intensity and light quality on young plants, and analyze the content and perform identification of chemical constituents of essential oil in different organs of the adult plant. The anatomical study was performed using the native plant material on the campus of UFLA, Lavras-MG and was sued by light microscopy and electron. After thirty days of the onset of germination, the young plants from seeds were acclimatized in two experiments: under blue mesh, red and black (50%), black (70%) and full sun, the second experiment was conducted in chambers BODs temperatures: 15 ° C, 25 ° C, 35 ° C, and the witness, who remained in the greenhouse (29 C). Samples of leaf, stem, pericarp and seeds were cut, packed and stored at -20 ° C freezer for subsequent extraction of essential oil by hydrodistillation in Clevenger. We measured the essential oil content in 240 samples of leaves, stems and pericarps, each organ was analyzed in five different specimens and four different times of hydrodistillation. The chemical composition was identified by gas chromatography / mass spectrometry from five samples of leaves, stems and pericarps and four samples of seeds. The essential oil accumulates in secretory cavities in leaves, and secretory ducts in the stem of juvenile and adult plants. In both experiments under different environments, it was found variations in stomatal density, thickness of mesophyll leaf area and dry biomass production, for the seedlings grown under mesh red and blue for the young plants under 25 ° C, which became stronger, with better conditions morphoanatomical in vegetative organs, structures and leaves. There was significant variation in levels of essential oil from organs and specimens, the highest yield observed in the pericarp, followed by leaves and stems. δ -elemene, α -copaene, β -cubebene, ciperene, β -caryophyllene, coumarin, germacrene D, viridiflorene, bicyclogermacrene, δ -cadinene, spathulenol, caryophyllene óxide, epóxide of humulene II, *iso*-spathulenol, *epi*- α -muurolol, α -muurolol, α -cadinol e (2*E*, 6*E*)-farnesoato de metila. A significant intraspecific variation and a greater similarity between the chemical constituents of leaves and stems.

Keywords: Anatomical characterization. Acclimatization. Essential oil. Volatile constituents. *C. langsdorffii*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Aspectos morfológicos de *Copaifera langsdorffii*. Figuras A-E (arquivo pessoal) e Figura F (timblindim.wordpress.com/arvores/copaiba/). A – árvore, B – ramo com fruto, C – caule em secção transversal, D – extração de óleo-resina do tronco, E – fruto aberto evidenciando o pericarpo, a semente e o arilo e F – ramo florido 33
- Figura 2 Caracterização anatômica foliar em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*. A – superfície epidérmica abaxial; B - superfície epidérmica adaxial; C - mesofilo com cavidade secretora e D - venação foliar com cavidades secretoras. Est – estômatos, ES – estrutura secretora e CS – cavidade secretora..... 63
- Figura 3 Fotomicrografias do caule e da raiz de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*..... 65
- Figura 4 Eletromicrografias de varredura de *Copaifera langsdorffii* em nitrogênio líquido. A – vista do mesofilo da folha em secção transversal, evidenciando: epiderme adaxial (EAD), parênquima paliádico (PP), cavidade secretora (CS) e seu respectivo epitélio secretor (ES), feixes vasculares (FV), parênquima esponjoso (PE) e epiderme abaxial (EAB); B – vista interna da cavidade secretora (CS), evidenciando um revestimento cuticular (C) sob o epitélio secretor (ES)..... 67
- Figura 5 Fotomicrografias da folha de *Copaifera langsdorffii*. A – secção transversal, com ductos secretores (DS) na nervura central; B – vista frontal da folha com cavidades secretoras (CS) 69

- Figura 6 Eletromicrografias de varredura de *Copaifera langsdorffii* em nitrogênio líquido. A – vista da região medular do caule em secção transversal, com dois ductos secretores (DS) e seus respectivos epitélios secretores (ES) e grãos de amido (GA); B – vista do caule da região cortical em secção longitudinal, com o felogênio (FG), um ducto secretor (DS) rompido longitudinalmente e vista interna do epitélio secretor (ES) 71
- Figura 7 Plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, com desenvolvimento da parte aérea em 120 dias, sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$: A – em BOD a 15°C ; B – em BOD a 25°C ; C – em Casa de vegetação a 29°C ; D – em BOD a 35°C 87
- Figura 8 Plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, desenvolvimento do sistema radicular em 120 dias, sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$: A – em BOD a 15°C ; B – em BOD a 25°C ; C – em casa de vegetação a 29°C ; D – em BOD a 35°C 87
- Figura 9 Superfície epidérmica abaxial da folha de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, desenvolvidas sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$: A – em BOD a 15°C ; B – em BOD a 25°C ; C – em casa de vegetação a 29°C ; D – em BOD a 35°C 93
- Figura 10 Mesofilo de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, desenvolvidas sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$: A – em BOD a 15°C ; B – em BOD a 25°C ; C – em casa de vegetação a 29°C ; D – em BOD a 35°C 95
- Figura 11 Superfície foliar de *Copaifera langsdorffii*, densidade dos estômatos (Est.). Plantas jovens: A – a pleno sol; B – sob malha vermelha; C – sob malha azul; D – sob malha preta com 50% e E – sob malha preta com 70% de sombreamento 101

Figura 12 Mesofilo de *Copaifera langsdorffii*, epiderme adaxial (Ead), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (Eab) e as cavidades secretoras de óleo-resina (CS). Plantas jovens: A – a pleno sol, B – sob malha vermelha, C – sob malha azul, D – sob malha preta com 50% e E – sob malha preta com 70% de sombreamento 103

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Análise de regressão da área foliar (cm²) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii* em função da temperatura 90
- Gráfico 2 Biomassa seca da raiz (mg) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii* em função da temperatura..... 91
- Gráfico 3 Biomassa seca do caule e das folhas (mg) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii* em função da temperatura..... 92
- Gráfico 4 Frequência estomática (unid./área) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii* em função da temperatura 94
- Gráfico 5 De 1 a 5. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais das folhas de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes de 1 a 5. Sinais: 1) α -copaeno; 2) β -cubebeno; 3) β -cariofileno; 4) germacreno D; 5) biciclogermacreno; 6) δ -cadineno; 7) espatulenol; 8) óxido de cariofileno; 9) *epi*- α -muurolol; 10) α -cadinol e 11) (*E, E*)-farnesoato de metila..... 137
- Gráfico 6 De 6 a 10. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais dos caules de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes de 1 a 5. Sinais: 1) cipereno; 2) β -cariofileno; 3) germacreno D; 4) viridifloreno; 5) biciclogermacreno; 6) δ -cadineno; 7) espatulenol; 8) óxido de cariofileno; 9) *iso*-espatulenol; 10) *epi*- α -muurolol; 11) α -muurolol; 12) α -cadinol e 13) e (*2E,6E*)-farnesoato de metila..... 139

- Gráfico 7 De 11 a 15. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais dos pericarpos de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes de 1 a 5. Sinais: 1) δ -elemeno; 2) α -copaeno; 3) β -cubebeno; 4) β -cariofileno; 5) germacreno D; 6) biciclogermacreno; 7) espatulenol; 8) óxido de cariofileno; 9) *iso*-spatulenol; 10) α -muurolol e 11) α -cadinol..... 141
- Gráfico 8 De 16 a 19. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais das sementes de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes 1, 2, 3 e 5. Sinais 1) cumarina; 2) espatulenol; 3) óxido de cariofileno; 4) epóxido de humuleno II; 5) *iso*-espatulenol e 6) α -cadinol 142
- Gráfico 9 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais das folhas de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1** (espécime com cerca de 8 m de altura e CAP – circunferência à altura do peito, de 74 cm). **2** (espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm). **3** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm). **4** (espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm). **5** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm). **F** (folha). **A e B** (tipos de óleos) ... 144

- Gráfico 10 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais dos caules de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1** (espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm). **2** (espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm). **3** (espécime Com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm). **4** (espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm). **5** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm). **C** (caule). **A e B** (tipos de óleos)..... 146
- Gráfico 11 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais dos pericarpos de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1** (espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm). **2** (espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm). **3** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm). **4** (espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm). **5** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm). **P** (pericarpo). **A e B** (tipos de óleos)..... 148
- Gráfico 12 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais das sementes de quatro espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1** (espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm). **2** (espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm). **3** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm). **4** (espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm). **5** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm). **S** (semente). **A e B** (tipos de óleos)..... 150

| | | |
|------------|--|-----|
| Gráfico 13 | Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de <i>Copaifera langsdorffii</i> do espécime 1 (espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm). P (pericarpo). C (caule). S (semente) e F (folha). A, B e C (tipos de óleos)..... | 151 |
| Gráfico 14 | Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de <i>Copaifera langsdorffii</i> do espécime 2 (espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm). P (pericarpo). F (folha). C (caule) e S (semente) A e B (tipos de óleos)..... | 152 |
| Gráfico 15 | Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de <i>Copaifera langsdorffii</i> do espécime 3 (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm). P (pericarpo). F (folha). C (caule) e S (semente). A e B (tipos de óleos)..... | 153 |
| Gráfico 16 | Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da..... | 154 |
| Gráfico 17 | Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de <i>Copaifera langsdorffii</i> do espécime 5 (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm). P (pericarpo). F (folha). C (caule) e S (semente). A e B (tipos de óleos)..... | 155 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Constituintes químicos dos óleos essenciais extraído de folhas, pericarpos e caules de <i>Copaifera langsdorffii</i> de acordo com diferentes autores..... | 43 |
| Tabela 2 | Médias dos diâmetros polar (DpCs) e equatorial (DeCs) das cavidades secretoras de óleo da folha de cinco espécimes de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 69 |
| Tabela 3 | Médias obtidas a partir das variações morfológicas nas folhas, caules, raízes e Biomassa seca de <i>Copaifera langsdorffii</i> , nos diferentes tratamentos: área foliar (AF) em (cm ²), altura da planta jovem (AP) em (cm), comprimento da raiz (CR) em (cm), biomassa seca da parte subterrânea (BSS) e biomassa seca da parte aérea (BSA) em (mg)..... | 89 |
| Tabela 4 | Média de contagens obtidas na superfície foliar de <i>Copaifera langsdorffii</i> referentes à frequência estomática (FE), e mensurações micrométricas dos estômatos (µm): diâmetro polar do estômato (DpE), diâmetro equatorial do estômato (DeE) e relação entre o diâmetro polar e equatorial (RDpe)..... | 92 |
| Tabela 5 | Medidas da espessura média (µm) de folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> sob estresse térmico da epiderme adaxial (EpAd), parênquima paliádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (EpAb) e limbo foliar (LF) | 95 |
| Tabela 6 | Médias obtidas das cavidades secretoras de óleo na folha em µm: diâmetro polar (DpCs), diâmetro equatorial (DeCs), e nervura central: diâmetro polar (DpNc) e diâmetro equatorial (DeNc) de <i>Copaifera langsdorffii</i> sob estresse térmico | 97 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 7 | Biomassa seca da parte aérea (BSA) e da parte raiz (BSS) de plantas jovens de <i>Copaifera langsdorffii</i> , após cultivo a pleno sol, sob malhas vermelha, azul e preta com 50 % e 70 % de sombreamento | 99 |
| Tabela 8 | Frequência estomática (FE), diâmetro polar (Dp), diâmetro equatorial (De), razão entre os diâmetros polar /equatorial de estômatos (RDpe) e área foliar de <i>Copaifera langsdorffii</i> , após cultivo em pleno sol, malhas coloridas e malhas preta | 100 |
| Tabela 9 | Espessura do limbo e tecidos foliares de <i>Copaifera langsdorffii</i> , sob malhas coloridas e malhas pretas. Ead – epiderme da face adaxial, PP – parênquima paliçádico, PE – parênquima esponjoso, Eab – epiderme da face abaxial | 102 |
| Tabela 10 | Frequência e diâmetro das cavidades secretoras e dos feixes vasculares da nervura central da folha de <i>Copaifera langsdorffii</i> , sob malhas coloridas e malhas pretas. FCs = densidade de cavidades secretoras; DpCs e DeCs = diâmetro polar e equatorial da cavidade secretora; DpFv e DeFv = diâmetro polar e equatorial do feixe vascular | 104 |
| Tabela 11 | Teor médio (%) do óleo essencial extraído das folhas de cinco espécimes de <i>Copaifera langsdorffii</i> em diferentes tempos de hidrodestilação e em diferentes métodos..... | 124 |
| Tabela 12 | Teor médio (%) do óleo essencial extraído dos caules de cinco espécimes de <i>Copaifera langsdorffii</i> em diferentes tempos de hidrodestilação e em diferentes métodos..... | 126 |
| Tabela 13 | Teor médio (%) do óleo essencial extraído dos pericarpos de cinco espécimes de <i>Copaifera langsdorffii</i> em diferentes tempos de hidrodestilação e em diferentes métodos | 127 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 14 | Teor médio (%) do óleo essencial obtido nas folhas, caules e pericarpos de cinco espécimes de <i>Copaifera langsdorffii</i> em cada tempo de extração, comparando T, T-1 e T-2..... | 128 |
| Tabela 15 | Teor médio (%) do óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> obtido de quatro tempos de extração em cada espécime, comparando T, T-1 e T-2 | 130 |
| Tabela 16 | Principais constituintes identificados nos óleos essenciais dos pericarpos, folhas, caules e sementes de espécimes de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 132 |
| Tabela 17 | Constituintes químicos majoritários do óleo essencial extraído do Pericarpo (P), Folha (F), Caule (C) e Semente (S) de <i>Copaifera langsdorffii</i> em cinco espécimes e suas respectivas concentrações relativas..... | 134 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| | CAPÍTULO 1: Introdução geral | 25 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 28 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 30 |
| 2.1 | A família Leguminosae e o gênero <i>Copaifera</i> | 30 |
| 2.2 | Descrição botânica da espécie <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. | 32 |
| 2.3 | Características anatômicas do gênero e da espécie | 34 |
| 2.5 | O óleo-resina de copaíba | 36 |
| 2.5.1 | Extração, usos e mercado | 36 |
| 2.5.2 | Atividades biológicas e farmacológicas | 39 |
| 2.5.4 | O óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 43 |
| | REFERÊNCIAS | 45 |
| | CAPÍTULO 2: Caracterização anatômica dos elementos secretores de óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 54 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 57 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 59 |
| 2.1 | Material botânico | 59 |
| 2.2 | Técnica para microscopia fotônica | 60 |
| 2.3 | Testes histoquímicos | 60 |
| 2.4 | Técnica do nitrogênio líquido (MEV) | 60 |
| 2.5 | Testes estatísticos | 61 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 62 |
| 3.1 | Caracterização anatômica foliar da planta jovem de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 62 |
| 5.2 | Caracterização anatômica caulinar da planta jovem de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 64 |
| 5.4 | Anatomia foliar na planta adulta de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 66 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 5.5 | Anatomia caulinar da planta adulta de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 70 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 72 |
| | REFERÊNCIAS | 73 |
| | CAPÍTULO 3 Efeito do estresse térmico e da luz sobre a estrutura foliar de plantas jovens e a produção de biomassa seca em <i>Copaifera langsdorffii</i> | 75 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 79 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 82 |
| 2.2 | Instalação dos experimentos | 82 |
| 2.2.1 | Efeito do estresse térmico..... | 83 |
| 2.2.2 | Efeito da intensidade e qualidade de luz | 83 |
| 2.3 | Procedimentos laboratoriais e coleta de dados | 84 |
| 2.4 | Análise estatística..... | 85 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 86 |
| 3.1 | Efeito do estresse térmico sobre a morfologia externa e a biomassa seca | 86 |
| 5.2 | Efeito do estresse térmico sobre a superfície foliar | 92 |
| 5.3 | Efeito do estresse térmico sobre o mesofilo | 94 |
| 5.4 | Efeito do estresse térmico sobre as estruturas secretoras e nervura central | 96 |
| 5.5 | Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre a biomassa seca | 98 |
| 5.6 | Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre a superfície foliar | 100 |
| 5.7 | Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre o mesofilo foliar..... | 101 |
| 5.8 | Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre as estruturas secretoras e a nervura central..... | 104 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 6 | CONCLUSÕES | 106 |
| | REFERÊNCIAS | 107 |
| | CAPÍTULO 4 Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 111 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 114 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 117 |
| 2.1 | Material botânico | 117 |
| 2.2 | Extração e doseamento do óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 118 |
| 2.3 | Determinação da umidade nos materiais vegetais | 119 |
| 2.3.1 | Método gravimétrico | 119 |
| 2.3.2 | Destilação azeotrópica | 120 |
| 2.4 | Análises químicas dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 120 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 123 |
| 3.1 | Avaliação do teor de óleo essencial nos diferentes órgãos de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 123 |
| 3.1.1 | Avaliação do teor de óleo essencial das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 123 |
| 3.1.2 | Avaliação do teor de óleo essencial dos caules de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 125 |
| 3.1.3 | Avaliação do teor de óleo essencial dos pericarpos de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 126 |
| 3.1.4 | Avaliação do teor dos óleos essenciais nos diferentes órgãos e espécimes de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 128 |
| 3.2 | Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 131 |
| 3.2.1 | Cromatogramas parciais dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 136 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.2.2 | Óleos essenciais das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 143 |
| 3.2.3 | Óleos essenciais dos caules de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 145 |
| 3.2.5 | Óleos essenciais das sementes de <i>Copaifera langsdorffii</i> | 149 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 158 |
| | REFERÊNCIAS | 160 |

CAPÍTULO 1: Introdução geral

O gênero *Copaifera* L. é formado por 38 espécies, distribuídas nas Américas Central e do Sul, na África e na Ásia, das quais 26 espécies ocorrem no Brasil, sendo 22 delas endêmicas. O óleo-resina extraído do tronco de *Copaifera* spp. tem grande valor comercial, devido às suas propriedades medicinais e ao uso nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos e perfumaria. Outros usos potenciais são revelação de fotografias, fabricação de vernizes e biocombustível.

A espécie selecionada no presente estudo, *Copaifera langsdorffii* Desf., atinge a altura aproximada de 12 a 18 m e pode ser encontrada em diversas regiões do país, além de apresentar várias adaptações, de acordo com o ambiente de ocorrência e muitas variações morfológicas.

Vários estudos foram realizados com *C. langsdorffii* abordando diferentes aspectos, como genética de populações, testes de germinação de sementes, fenologia, ecologia voltada para a competição de plantas jovens com espécies invasoras no campo, anatomia da madeira, anatomia com foco em cultura de tecidos, ontogênese de estruturas secretoras e composição química dos óleos essenciais em diferentes órgãos da planta e do óleo-resina do tronco.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de ampliar o conhecimento anatômico em diferentes órgãos da espécie, na fase de planta jovem e na planta adulta, ressaltando a estrutura secretora com uso de nitrogênio líquido, a aclimatização de plantas jovens sob efeito da temperatura e da quantidade e qualidade de luz e a análise da variação da composição dos óleos essenciais de diferentes órgãos de cinco espécimes, assim como a variação do rendimento de óleo em diferentes tempos de hidrodestilação. Assim, foi organizado em quatro capítulos: no capítulo 1, trata-se do referencial teórico, voltado especialmente para os temas abordados no trabalho; no capítulo 2, fez-se a caracterização anatômica dos órgãos vegetativos na fase de planta jovem e na planta adulta, destacando a identificação e a localização dos elementos

secretores nos diferentes órgãos; no capítulo 3, avaliou-se o efeito da temperatura sobre a anatomia e a morfologia de plantas jovens em ambientes controlados e o efeito de diferentes quantidades e qualidades de luz na estrutura foliar e na produção de biomassa seca e no capítulo 4 analisou-se a variação química dos constituintes dos óleos essenciais em folhas, caule, pericarpos e sementes e o efeito do tempo de extração na variação do rendimento de óleo.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais de *C. langsdorffii* ocorrem nos diversos órgãos das plantas, no interior de estruturas especiais, os elementos secretores, cuja identificação estrutural, frequência e distribuição anatômica nos tecidos ainda não estão bem esclarecidos para as espécies do gênero *Copaifera*.

Alguns fatores ambientais atuam sobre a estrutura da folha durante o crescimento, tais como o nível de luz e a temperatura (RIDDOCH et al., 1991). Esse é um atributo comum das espécies que apresentam amplo potencial de aclimatização, condição indispensável para a melhor adaptação da planta em determinados ambientes.

A adaptação da planta ao ambiente de luz depende do ajuste de seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada da maneira mais eficiente possível (BJORKMAN, 1981). As respostas dessas adaptações terão reflexos no crescimento global da planta e, assim sendo, as modificações anatômicas ocorrem pelo fator ambiental (CASTRO et al., 2007). Dessa forma, a eficiência do crescimento pode ser relacionada à habilidade de adaptação das plantas jovens às condições de intensidade luminosa e à temperatura, dados inexistentes na literatura para a espécie em estudo. De acordo com Langenheim, Arrhenius e Nascimento (1981) e Cascon e Gilbert (2000), a intensidade de luminosa também afetam o teor e a composição química do óleo-resina de outras espécies do gênero *Copaifera*.

A partir de um espécime de *C. langsdorffii* coletado no nordeste brasileiro, Gramosa e Silveira (2005) relataram a variação no teor e na composição química do óleo essencial extraído de diferentes órgãos da planta. Entretanto, são necessários estudos com um número maior de acessos, visando contribuir para o conhecimento da variação desses constituintes nos diferentes órgãos da planta.

No presente estudo, objetivou-se caracterizar a anatomia dos elementos secretores de óleo e seus componentes voláteis, a influência do tempo de extração no teor de óleo na planta adulta, os efeitos da temperatura e da luz sobre a anatomia e o desenvolvimento de plantas jovens, e de informações científicas para produzir acessos em melhores condições morfo-anatômicas para a recuperação de áreas degradadas, a arborização de ruas e a produção de óleo-resina de *C. langsdorffii*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Desde a época do descobrimento do Brasil, os cronistas já relatavam, em suas cartas a Portugal, a ocorrência de espécimes de copaíba que eram utilizadas pelos povos indígenas na cicatrização de ferimentos, além de outros usos medicinais. No presente estudo é feito um retrospecto dos seus principais usos, posição taxonômica, dados morfológicos e anatômicos, assim como busca atualizar e ampliar informações agronômicas e o teor e a composição química dos óleos essenciais.

2.1 A família Leguminosae e o gênero *Copaifera*

A família Leguminosae, representada por cerca de 730 gêneros e em torno de 19.300 espécies, é cosmopolita e encontra-se distribuída em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS et al., 2005).

O gênero *Copaifera* é compreendido por 38 espécies distribuídas nas Américas Central (4 espécies) e do Sul (29 espécies), na África (4 espécies) e na Ásia (uma espécie). Destas, 26 espécies ocorrem no Brasil, sendo 22 endêmicas (COSTA, 2007, p. 2). As espécies de *Copaifera* estão distribuídas no continente americano entre a Costa Rica/Antilhas ($\pm 15^{\circ}\text{N}$) e o noroeste da Argentina/Sul do Brasil ($\pm 30^{\circ}\text{S}$), ocupando essa faixa de latitude também na porção oeste do continente africano e em Bornéu, na Malásia (COSTA, 2007).

O gênero *Copaifera* pertence à subfamília Caesalpinioideae (BARROSO, 1979) e tem como espécie tipo *C. officinalis* L. Segundo Lewis et al. (2005), a subfamília Caesalpinioideae abrange as tribos Cercideae, Detarieae e Cassieae, com cerca de 170 gêneros e aproximadamente 2.250 espécies, com

ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O Clado Detarieae inclui a espécie *C. langsdorffii* (COWAN; POLHILL, 1981).

As espécies do gênero *Copaifera*, mais conhecidas popularmente como copaíbas, também apresentam outras designações que são utilizadas nos diferentes locais de ocorrência, óleo-de-copaíba, óleo-vermelho, árvore-milagrosa, copaíba-mari-mari, copaíba-roxa, copaíba-angelim, copaíva, copal, *jesuit's-balsam*, árvore-do-óleo-diesel, mal-dos-sete-dias e pau-d'óleo, entre outros (MEDEIROS; XAVIER FILHO; BARBOSA FILHO, 1984; SHANLEY; CYMERIS; GALVÃO, 1998; SIQUEIRA et al., 1998).

Em levantamento realizado nos principais herbários da Amazônia, por Silva (2006), foram encontradas 12 espécies do gênero *Copaifera*: *C. duckei* Dwyer, *C. epunctata* Amshoff, *C. elíptica* Mart., *C. glycyarpa* Ducke, *C. guyanensis* Desf., *C. martii* Hayne, *C. multijuga* Hayne, *C. oblongifolia* Mart., *C. officinalis* (Jacq.) L., *C. piresii* Ducke, *C. reticulata* Ducke e *C. trapezifolia* Hayne.

Dentre as espécies do gênero *Copaifera* ocorrentes no Brasil extra-amazônico, a partir dos estudos taxonômicos e filogenéticos realizados por Costa (2007), foram aceitas 17 espécies e oito variedades: *C. arenicola* Ducke, *C. coriacea* Mart., *C. depilis* Dwyer, *C. duckei* Dwyer, *C. elliptica* Mart., *C. langsdorffii* var. *langsdorffii* Desf., *C. langsdorffii* var. *glabra* (Vogel) Benth., *C. langsdorffii* var. *grandifolia* Benth., *C. langsdorffii* var. *krukovii* Dwyer, *C. lucens* Dwyer, *C. luetzelburgii* Harms, *C. magnifolia* Dwyer, *C. majorina* Dwyer, *C. malmei* Harms, *C. marginata* Benth., *C. martii* var. *rigida* Hayne, *C. nana* Rizzini, *C. oblongifolia* var. *oblongifolia* Mart., *C. oblongifolia* var. *comosa* Mart., *C. oblongifolia* var. *dawsonii* Mart., *C. sabulicola* J.A.S. Costa & L. P. Queiroz e *C. trapezifolia*.

2.2 Descrição botânica da espécie *Copaifera langsdorffii* Desf.

De acordo com Costa (2007), a espécie em estudo apresenta porte arbóreo com 3 a 15 m de altura (Figura 1 A). O pecíolo mede de 0,6 a 2,2 cm de comprimento; raque glabro, pubescente ou tomentoso-hirsuta, com 2,3 a 7,8 cm de comprimento; 3 a 4 pares de folíolos, os proximais duas vezes menores que os distais; peciólulos com 1 a 5 mm de comprimento; lâminas com pontuações presentes, coriáceas ou cartáceas, elípticas ou elíptico-oblongas com 3 a 5 x 1,5 a 3 cm, margens planas, ápice agudo ou obtuso, emarginado, raramente obtuso, base obtusa, glabros, pubérulos, pubescentes ou tomentosos na face adaxial, glabros, pubérulos, pubescentes ou tomentosos na face abaxial; nervura principal central, raramente deslocada nos folíolos distais, mas central nos demais, glabra, pubérula, pubescente ou tomentosa na face adaxial, glabra, pubescente ou hirsuta na face abaxial (Figura 1 B). As inflorescências são em panículas com comprimento menor até o dobro das folhas subjacentes, raramente três vezes maiores, com 3 a 11 cm de comprimento; pedúnculo glabro, pubérulo, pubescente ou tomentoso-hirsuto. As flores são sésses; sépalas com 4 a 5 x 2,2 a 4 mm, face externa glabra ou pubescente, face interna tomentosa, hirsuta ou glabra; estames 10, filetes com 7 a 9 mm de comprimento, anteras com 1,1 a 2,1 mm de comprimento, ovário orbicular, com 1,7 a 2 x 1,7 a 2 mm, margem glabra a pubescente, estilete com 2,8 a 5 mm de comprimento (Figura 1 F). O fruto é um legume com 2,8 a 3,5 x 2,2 a 3,3 cm, margens glabras ou espaçadamente pubescentes. A semente é orbicular ou oblonga, com 1,5 a 2 x 1 a 2,4 cm; arilo amarelo, laranja ou vermelho, cobrindo 2/3 ou quase toda a semente (Figura 1 E). No caule, os elementos secretores localizam-se próximo ao xilema, organizados concentricamente em cada anel cambial, rompidos quando o tronco é perfurado, deixando extravasar o óleo-resina (Figuras 1 C e 1 D).



Figura 1 Aspectos morfológicos de *Copaifera langsdorffii*. Figuras A-E (arquivo pessoal) e Figura F (timblindim.wordpress.com/arvores/copaíba/). A – árvore, B – ramo com fruto, C – caule em secção transversal, D – extração de óleo-resina do tronco, E – fruto aberto evidenciando o pericarpo, a semente e o arilo e F – ramo florido

As fenofases mais sincronizadas são a queda e o brotamento das folhas que ocorrem no final da estação seca (julho-agosto) e no início da estação chuvosa (setembro-outubro), logo relacionados com a precipitação. A floração ocorre na estação chuvosa e a frutificação na estação seca, em ciclos supra- anuais, com anos de produção intensa seguidos de anos sem frutificação. Interações com dispersores e predadores de sementes também parecem

influenciar no padrão de frutificação observados em *C. langsdorffii* (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS et al., 2002).

2.3 Características anatômicas do gênero e da espécie

A anatomia do gênero *Copaifera* foi citada, pela primeira vez, por Metcalfe e Chalk (1950), referindo-se às Caesalpinioideae, que estudou alguns tecidos e estruturas secretoras, principalmente relacionados à anatomia da madeira. Poucas são as citações para a folha e nenhuma referência foi feita no âmbito intraespecífico.

A formação dos elementos secretores, de acordo com Esaú (1972) e Fahn (1979), ocorre a partir do rompimento e ou do afastamento de células do parênquima. Assim sendo, são classificados de lisígenos ou esquizógenos ou, ainda, esquizolisígenos.

Marcati, Alfonso e Benetati (2001) realizaram um estudo comparativo do lenho de *C. langsdorffii* nativa da floresta e do cerrado e descreveram a anatomia dos tecidos do caule e os ductos secretores de óleo-resina, classificando-os de origem esquizógena.

De acordo com Azevedo (2003), há a ocorrência de variações anatômicas, em âmbito foliar, entre plantas de *C. langsdorffii* cultivadas *in vitro*, em sala de crescimento e no campo, especialmente no mesófilo e na cutícula, em que as plantas cultivadas no campo apresentam, geralmente, cutícula mais espessa, mais de uma camada no parênquima paliçádico e número maior de camada do parênquima lacunoso.

Rodrigues (2008) realizou um estudo com *C. langsdorffii*, no estado de São Paulo, e fez um relato sobre a estrutura dos espaços secretores de origem esquizógenos, ratificando a classificação já realizada pelos autores acima, porém, mencionou a existência de um epitélio bisseriado contornando esses

espaços secretores. Para a espécie em estudo, não consta, na literatura consultada, um estudo mais ampliado sobre a anatomia dos diferentes órgãos vegetativos da planta e nem abordagens sobre as possíveis variações anatômicas entre espécimes e entre plantas jovens e adultas.

2.4 Influência da luz nas características anatômicas da espécie

O teor de óleo numa planta está condicionado a fatores genéticos, porém o acúmulo em determinados órgãos é influenciado por fatores ecológicos, tais como fertilidade do solo, intensidade e qualidade de luz, temperatura, umidade, herbivoria, poluição do ar, época de coleta e horário da coleta, podendo interferir na variação, na produção ou na destruição de princípios ativos (TEUSCHER, 1990).

A luz tem grande influência na anatomia da planta, especialmente na folha. É absorvida por pigmentos presentes nas folhas, principalmente clorofila **a** e **b** nos cloroplastos, cuja distribuição pode ser esclarecida pela anatomia (LEE; BONE; STORCH, 2000).

O aumento da espessura da folha, especialmente pela alongação ou adição de camadas de células do parênquima paliçádico, tem sido ligado a uma redução na resistência do mesófilo ao dióxido de carbono (NOBEL, 1977) e correlacionado ao aumento de fatores potencialmente limitantes do processo fotossintético (BJORKMAN, 1981). Segundo este autor, plantas cultivadas em ambiente ensolarado têm folhas menores, mais espessas e têm mais massa por unidade de área em relação às cultivadas à sombra.

A densidade de fluxo de fótons influencia o desenvolvimento do parênquima paliçádico. Em experimento realizado com espécies do gênero *Nauclea* L. (Rubiaceae) crescendo em alta densidade de fluxo de fótons, foi observado um parênquima paliçádico mais desenvolvido, constituído de duas

camadas de células. Entretanto, quando a planta cresceu sob baixa densidade de fluxo de fótons, foi observada apenas uma camada de células (RIDDOCH et al., 1991).

Dentre outras características, as adaptações das folhas ao sombreamento incluem modificações morfológicas e anatômicas, tais como aumento da área foliar, diminuição da espessura e redução do número de células do mesófilo por unidade de área (BARREIRO et al., 1992).

Tais variações podem ocorrer em folhas de uma mesma planta, quando exposta a diferentes regimes de luz. Dessa forma, a anatomia foliar deve ser avaliada em relação à intensidade, à qualidade e à quantidade de luz (CASTRO et al., 1997; CASTRO et al., 2008; CASTRO; ALVARENGA, 2002; COLARES; SEELIGER, 2006).

2.5 O óleo-resina de copaíba

O bálsamo de copaíba foi mencionado pela primeira vez num trabalho de Puchas, na Inglaterra, porém, os franceses foram os que mais se dedicaram ao seu estudo e exploração. Já no período da guerra de 1914 se exportavam cerca de 30 a 50 toneladas de óleo resina de copaíba e no período da borracha, o óleo-de-copaíba foi exportado em grande escala para França, Alemanha e Estados Unidos. Nessa época, a exportação alcançou 200 toneladas por ano (FERNANDES, 1986; SIQUEIRA, 1996).

2.5.1 Extração, usos e mercado

O gênero *Copaifera* apresenta variação no volume de óleo-resina produzido pelos indivíduos de uma mesma espécie, o que tem sido atribuído por alguns autores ao tamanho e à idade da árvore (AZEVEDO et al., 2004), ao

método de extração utilizado, à altura e/ou à profundidade de acesso aos ductos secretores (NASCIMENTO; ZOGHBI; SILVA, 2006) e ao período de maior ou menor precipitação pluviométrica (ZOGHBI et al., 2007).

De acordo com inventários florestais, realizados no âmbito do projeto Radambrasil, a produção de óleo-resina varia conforme a região e a espécie explorada, estimando-se uma extração de 2,5 litros por árvore/ano. Isso representaria uma produção regional de óleo de copaíba de até 4 mil toneladas/ano (SIQUEIRA et al., 1998), com um volume expressivo proveniente da espécie *C. multijuga*.

A produção do óleo-resina varia de acordo com o período de extração. Segundo Alencar (1982) e Carvalho et al. (2001), a melhor época de extração é no período chuvoso, enquanto Ferreira e Braz (2003) demonstraram que, no estado do Acre, a maior produção foi verificada nas extrações no período seco, julho e agosto. Oliveira (2004) concluiu, em seu trabalho, com espécies de *Copaifera* do município de Mojú, PA, que a melhor produção é também o período seco, de agosto a outubro.

Alencar (1982) correlacionou a produção de óleo-resina com o tipo de solo arenoso ou argiloso e observou que a maior densidade de plantas ocorre em solo argiloso e cuja produção é maior quando comparada às plantas de solo arenoso. Carvalho et al. (2001) concluiu que a maior ou a menor produção dependem do DAP. De acordo com o autor, árvores com DAP (diâmetro à altura do peito) inferior a 60 cm não exsudaram óleo e quanto maior o DAP maior a produção do óleo.

Ferreira e Braz (2003) também correlacionaram a produção com o habitat em ecossistema de várzea e terra firme e concluíram que as árvores de terra firme produzem mais óleo que as árvores de várzea.

No Brasil, espécies de Leguminosae fornecem madeiras de qualidade usadas na marcenaria e carpintaria, na indústria de compensados, de móveis,

embalagens e um óleo-resina de valor comercial, que é extraído do seu tronco (VAN DEN BERG, 1982). Alguns dos copais, ou resinas viscosas, largamente utilizados na produção de vernizes, tintas e lacas, são produzidos a partir de árvores de leguminosas, especialmente de espécies pertencentes aos gêneros *Hymenaea* e *Copaifera* (LEWIS; OWEN, 1989). Segundo Veiga Júnior e Pinto (2002) e Siqueira (1996), o óleo de copaíba é empregado também na indústria de vernizes como matéria-prima e pode substituir o óleo de linhaça como secativo.

O óleo de copaíba, por ser comburento, é utilizado pelas populações do interior na iluminação doméstica, em pequenas lamparinas. Com base nessas informações, Mourão et al. (1980) realizaram várias análises químicas e concluíram que o óleo de copaíba pode ser usado como combustível, substituindo o óleo diesel.

Em pesquisas realizadas na Universidade da Califórnia, observou-se que o óleo de copaíba é inteiramente constituído de hidrocarbonetos e com uma distribuição de peso molecular muito parecida com a do óleo diesel (ALENCAR, 1982). A fração volátil do óleo-resina de *C. langsdorffii* também apresentou resultado bastante favorável como biocombustível (SOARES, 2008).

O óleo de copaíba vem sendo utilizado na indústria de perfumes, como fixador de fragrâncias (SIMONETI, 1991) e na indústria de cosméticos (FLEURY, 1997). Excelentes resultados vêm sendo obtidos tanto no cenário científico quanto comercial. Trata-se de matéria-prima de apelo ecológico nos diversos produtos e isso vem despertando o interesse de grandes empresas e tem merecido boa aceitação por parte dos consumidores em geral (BLOISE, 2003; SCHULMAN, 2003).

O mercado exterior absorveu grande parte da produção de óleo de copaíba. No período entre 1973 e 1989 foram comercializadas, com o mercado internacional, 871 toneladas, contra 164 toneladas vendidas ao mercado nacional (SEPLAM/CODEAMA/CACEX, 1989). Nas últimas décadas, nossas maiores

exportações têm sido para os Estados Unidos, Holanda, Japão, Argentina, Bélgica e Inglaterra (FARIA; COSTA, 1998).

A Amazônia é a maior produtora de óleo-resina de copaíba e as principais espécies fornecedoras são *C. reticulata*, *C. guyanensi*, *C. multijuga* e *C. officinalis*, responsáveis por, respectivamente, 80%, 10%, 5% e 5% da produção brasileira. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2003), foram comercializadas 463 t de óleo-resina de copaíba em 2002, somando, aproximadamente, R\$ 1,4 bilhão, dos quais 458 t eram provenientes da região norte e 5 t da região centro-oeste. De acordo com dados mais recentes do IBGE (2009), a produção de óleo de copaíba foi de 513 t das espécies acima mencionadas, provenientes dos estados do Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso. Nas regiões próximas do cerrado e sudeste do país ocorrem outras espécies com menor produção de óleo-resina como *C. langsdorffii*, que são espécies de menor porte, com cerca de 15 m de altura (CARVALHO et al., 2001; SIQUEIRA et al., 1998).

2.5.2 Atividades biológicas e farmacológicas

De acordo com a literatura, o óleo essencial produz a desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002) ou como resposta a danos mecânicos (PLOWDEN, 2001).

Na indústria, os óleos essenciais são utilizados, principalmente, para conferir aroma a produtos alimentícios e de perfumaria, em produtos domissanitários e na conservação de produtos alimentícios (CRAVEIRO; FERNANDES; ANDRADE, 1981; SANTOS et al., 2002). Além disso, os óleos essenciais podem ter um papel ecológico, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra perda de água e no aumento da temperatura, na

atração de polinizadores, na defesa contra herbívoros e como reguladores de decomposição da matéria orgânica no solo (CRAVEIRO; MACHADO, 1986; DEANS; WATERMAN, 1993).

O óleo de copaíba é um produto que vem sendo largamente estudado, com variadas aplicações biológicas. Ohsaki et al. (1994) comprovaram a ação antitumoral do óleo de *C. langsdorffii* em ratos, sobre câncer de útero. Lima et al. (2003) revelaram também a atividade do óleo de *C. multijuga* como anticâncer do tipo melanoma.

Na odontologia o óleo de copaíba vem sendo estudado para o combate, *in vivo*, sobre *Streptococcus mutans*, causadora da cárie dentária (ARRIEL; SILVA; AMARAL, 2004).

Em estudos recentes foram demonstradas várias atividades biológicas do óleo de *C. langsdorffii*, tais como larvicida contra *Aedes aegypti* (MENDONÇA et al., 2005) e genotóxica em culturas de fibroblastos (CAVALCANTI et al., 2006).

Os espécimes de copaíba vêm sendo utilizada há muito tempo pelos índios e caboclos da Amazônia como medicamento. Desse modo, são empregados como anti-inflamatórios, antileucorreicos, antiblenorrágicos, antirreumáticos, cicatrizantes, balsâmicos, hipotensores, anticancerígenos, no tratamento de ferimentos em geral, em psoríase, em ulcerações, e como antissépticos das vias urinárias, antibacterianos, gastroprotetores, analgésicos, antioxidantes, inseticidas e repelentes de insetos, sendo manipulado por farmácias no Pará e no Rio de Janeiro (ALENCAR, 1982; AZEVEDO; WADT; WADT, 2004; BARATA; DUARTE; PACHECO, 2006; BENVENUTTI, 2008; FERNANDES, 1986; SIQUEIRA, 1996, 1998; VAN DEN BERG, 1982).

Dentre as diversas finalidades do óleo de copaíba, destaca-se o uso medicinal, sendo empregado como antiblenorrágicas, no tratamento de doenças da pele, das vias respiratórias e urinárias (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

2.5.3 Composição química dos óleos essenciais do gênero *Copaifera*

O óleo de copaíba é constituído de dois grupos de substâncias distintas, volúveis entre si, sendo um constituído de substâncias voláteis, correspondendo cerca de 90% de massa do óleo-resina e outro grupo constituído de substâncias não voláteis, resinosa de cor caramelo que começa a ser decomposta à temperatura próxima de 300°C e que corresponde a 10% da massa total do óleo-resina (VEIGA JÚNIOR; PINTO; PATITUCCI, 1997).

O óleo-resina é um exsudado composto por ácidos resinosos e constituintes voláteis. Dentre estes citam-se diterpenos e, principalmente, sesquiterpenos, dos quais 72 foram identificados até 2002 (VEIGA JÚNIOR PINTO, 2002), predominando α -humuleno, α - e β -selineno, β -bisaboleno e β -cariofileno (LANGENHEIM; FEIBERT, 1988).

Os óleos essenciais possuem, na maioria das vezes, cerca de 90% de monoterpenos na sua composição (SIMÕES et al., 2003), além de fenilpropanoides, cetonas, álcoois, aldeídos e diterpenos (GUILHON et al., 2008; MAIA; ZOGHBI, 1998).

Os fatores fisiológicos que estão condicionados à influência da luz interferem intensamente na produção de óleo essencial. Segundo Ming (1996), os efeitos da luz são determinantes na qualidade e na quantidade dos compostos químicos vegetais, que variam de acordo com a idade da planta e o ciclo fisiológico, uma vez que enzimas, hormônios e outros compostos são produzidos, degradados e ou reelaborados para expressar respostas fisiológicas que são características de cada uma dessas fases.

A luz atua de forma significativa e complexa e influencia o acúmulo e a variedade dos componentes dos óleos essenciais, uma vez que afeta direta ou indiretamente a produção de fitomassa, a proporção de órgão e as vias biossintéticas desses metabólitos secundários (OLIVEIRA, 2006).

A análise da composição química do óleo produzido por várias espécies de *Copaifera*, como *C. multijuga*, *C. guianensis* e *C. duckei*, com predominância de hidrocarbonetos, com 60% de α -copaeno e β -cariofileno, 43% de α -bergamoteno, α -humuleno e δ -cadineno, 16% de sesquiterpenos oxigenados, óxido de cariofileno e 20% de ácidos diterpênicos, ácido copálico, hardwickico, kaurênico e acetocopálico, o que tem mostrado uma ampla variação entre espécies e localidades (CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA JÚNIOR PINTO, 2002). Langenheim e colaboradores analisaram a influência de fatores ambientais, como a luminosidade, a infecção por fungos e patógenos, os nutrientes do solo e a estacionalidade sobre a variação na composição de sesquiterpenos no óleo-resina extraído das folhas de *Copaifera* (LANGENHEIM; ARRHENIUS; NASCIMENTO, 1981; LANGENHEIM et al., 1984; LANGENHEIM et al., 1986; LANGENHEIM; FEIBERT, 1988; MACEDO; LANGENHEIM, 1989a; MACEDO; LANGENHEIM, 1989b; MACEDO; LANGENHEIM, 1989c; WANG; LANGENHEIM, 1990). Posteriormente, diversos autores analisaram a composição do óleo extraído diretamente do tronco (CASCON; GILBERT, 2000; LAMEIRA et al., 2009; ZOGHBI; LAMEIRA; OLIVEIRA, 2007). Entretanto, com exceção de Medeiros (2006), que estudou 16 espécimes de *C. multijuga* e de Zoghbi et al. (2009), que analisaram a variação da composição química de 12 indivíduos de *C. reticulata*, a maioria dos trabalhos foi realizada com amostras procedentes de um a três indivíduos (AMORIM, 2003; CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA JÚNIOR et al., 2007; LAMEIRA et al., 2009; ZOGHBI et al., 2007). Logo, não é bem conhecida a variabilidade intraespecífica, nem os fatores que podem influenciar em sua composição.

2.5.4 O óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*

Alguns constituintes presentes nos óleos de *Copaifera* spp. apresentaram atividades biológicas comprovadas, tais como α -elemeno, β -cariofileno e α -cadineno, que são agentes anticarcinogênicos, sendo último também bactericida (BARBOSA; YOSHIDA; SCUDELLER, 2009; BENVENUTTI, 2008; KANG et al., 1992; ZHENG; KENNEY; LAM, 1992; LEEWENBERG, 1987; KUBO; MUROI, 1993; SOARES et al., 2003).

De acordo com Silva et al. (2006), 30 compostos foram identificados no óleo das folhas de *C. langsdorffii*, com predominância do germacreno D, germacreno B, t-cadinol, δ -cadineno e β -cariofileno. Amorim (2003), cuja análise foi realizada a partir de extrato hexânico e metanólico, identificou 14 constituintes majoritários. Gramosa e Silveira (2005) identificaram 40 diferentes constituintes, sendo β -cariofileno e γ -muuroleno os principais compostos encontrados nas folhas e nos frutos e óxido de cariofileno, nas cascas dos frutos e nos caules. Nesses estudos, os autores analisaram apenas um espécime de *C. langsdorffii* e o tempo de extração dos óleos essenciais foi constante. Na Tabela 1 são apresentados os constituintes químicos dos óleos essenciais de *C. langsdorffii* identificados por diferentes autores.

Tabela 1 Constituintes químicos dos óleos essenciais extraídos de folhas, pericarpos e caules de *Copaifera langsdorffii*, de acordo com diferentes autores

| Constituintes químicos | Gramosa e Silveira (2005) | | | Silva et al. (2006) | Pereira et al. (2008) | Amorim (2003) |
|------------------------|---------------------------|-----|-----|---------------------|-----------------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| p-cymene | 1,4 | - | - | - | - | - |
| Camphor | 1,0 | - | - | - | - | - |
| δ -elemeno | 2,1 | - | 4,1 | - | - | - |
| α -cubebeno | 0,5 | 3,1 | - | - | - | - |
| α -copaeno | 0,8 | - | 1,8 | - | 0,91 | P |
| 1-gurjuneno | - | - | - | - | 2,90 | - |

“Continua”...

Tabela 1 “Cont.”.

| Constituintes químicos | Gramosa e Silveira (2005) | | | Silva et al. (2006) | Pereira et al. (2008) | Amorim (2003) |
|---|------------------------------|------|------|------------------------|--------------------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| Z-cariofileno | - | - | - | - | 1,41 | - |
| E-cariofileno | - | - | - | - | 7,68 | - |
| β-cariofileno | 16,6 | 1,3 | - | 6,04 | - | - |
| β-gurjuneno | 0,6 | - | - | - | - | - |
| trans-α-bergamoteno | 0,7 | - | - | - | - | - |
| Aromadendreno | - | - | - | - | 0,67 | P |
| α-humuleno | 2,9 | - | - | - | 1,38 | - |
| (E)-9-epi-cariofileno | - | - | - | - | 2,63 | - |
| germacreno D | - | - | - | 21,04 | - | - |
| α-muuroleno | 3,0 | - | - | - | - | - |
| γ-cadineno | 0,8 | 1,9 | 3,7 | - | - | - |
| cis-calamenene | 1,4 | - | - | - | - | - |
| δ-cadineno | 6,5 | - | - | 6,64 | - | - |
| t-cadinol | - | - | - | 7,57 | - | P |
| Cubebene | 0,8 | - | - | - | - | - |
| α-cadineno | 0,8 | - | - | - | - | - |
| β-selineno | - | - | - | - | 1,37 | P |
| Elemol | 2,0 | - | - | - | - | - |
| germacreno B | 2,7 | - | - | 11,61 | 5,77 | - |
| (E)-nerolidol | - | - | - | - | 2,20 | - |
| 1,5-epoxisalvial-4(14)-eno | - | - | - | - | 8,29 | - |
| Espatulenol | - | - | - | - | - | P |
| óxido de cariofileno | 1,3 | 47,3 | 31,0 | - | 33,72 | - |
| Guaiol | 2,6 | - | - | - | - | - |
| óxido de humuleno | - | - | - | - | 5,52 | - |
| iso-espatulenol | - | - | - | - | 6,0 | - |
| epi-α-cadinol | - | - | 1,9 | - | - | - |
| cis-β-elemenona | - | - | - | - | 1,26 | - |
| α-muurolol | 3,6 | - | 2,3 | - | - | P |
| β-eudesmol | 2,1 | - | - | - | - | - |
| Farnesol | - | - | - | - | 1,54 | - |
| acetato de sandaracopimar-15-en-8-β-ila | - | - | - | - | 4,33 | - |
| 14-hidroxi-δ-cadineno | - | - | - | - | - | - |
| Caureno | - | - | 30,2 | - | - | - |
| Ledeno | - | - | - | - | - | P |
| Epiglobulol | - | - | - | - | - | P |
| Torreyol | - | - | - | - | - | P |
| Limoneno | - | - | - | - | - | P |
| metil farnesato | - | - | - | - | - | P |

1. Folha; 2. Pericarpo; 3. Caule; P. presença do constituinte químico sem informação do teor

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne: leguminosae, na Amazônia Central: produção de óleo-resina. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 75-89, 1982.
- AMORIM, A. C. L. **Caracterização química da *Copaifera langsdorffii* Desfon e avaliação de sua atividade fungitóxica**. 2003. 94 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- ARRIEL, E. F.; SILVA, A. F.; AMARAL, L. C. S. Avaliação da atividade do extrato de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) contra *Streptococcus mutans*. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA, 12., 2004, Goiânia; ENCONTRO CENTRO-OESTE DE QUÍMICA, 2., 2004, Goiânia, SEMANA DO QUÍMICO, 4., 2004, Goiânia; ENCONTRO CENTRO-OESTE DE DEBATES SOBRE O ENSINO DE QUÍMICA, 13., 2004, Goiânia. Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2004.
- AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- AZEVEDO, O. C. R. et al. Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. no sudoeste da Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de óleos e Fibras**, Campina Grande, v. 8, n. 2/3, p. 851-861, maio/dez. 2004.
- AZEVEDO, O. C. R.; WADT, L. H. O.; WADT, P. G. S. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. Rio Branco: EMBRAPA, 2004. 28 p. (Documentos, 91).
- BARATA, L. E. S.; DUARTE, M. C. T.; PACHECO, T. A. R. C. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp.) balsams. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 21, p.123-124, 2006.
- BARBOSA, K. S.; YOSHIDA, M.; SCUDELLER, V. V. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, p. 57-60, 2009.

BARBOSA FILHO, J. M.; XAVIER FILHO, L.; MEDEIROS, D. F. Triagem fitoquímica de plantas medicinais do estado da Paraíba. **Boletim da Sociedade Broteriana**, Coimbra, v. 2, p. 57-68, 1984.

BARREIRO, R. et al. Regulation of the photosynthetic capacity of primary bean leaves by the red:far-red ratio and photosynthetic photon flux density of incident light. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 97-101, 1992.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: LTC/EDUSP, 1979. 255 p. v. 2.

BENVENUTTI, P. **Obtenção, caracterização química e atividade antibacteriana de óleos voláteis de *Copaifera langsdorffii* Desfon**. 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Química orgânica) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2008.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L. et al. **Encyclopedia of plant physiology: physiological plant ecology I**. New York: Springer Verlag, 1981. p. 57-107, v. 12.

BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, p. 46-49, 2003.

BRAZ, E. M.; FERREIRA, L. A. **Avaliação do potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*)**. Rio Branco: Florística e Botânica Econômica do Acre/EMBRAPA, 2003. Disponível em: < <http://www.nybg.org/bsci/acre/www1/evaluation.html>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

CARVALHO, J. O. P. et al. **Informações básicas sobre ecologia e silvicultura de cinco espécies arbóreas da Amazônia brasileira**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2001. (Documentos, 101).

CASCON, V.; GILBERT, R. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf. *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, Oxford, v. 7, n. 55, p. 773-778, 2000.

CASTRO, E. M. et al. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 8-16, 2007.

- CASTRO, E. M. et al. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumar sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, ago. 1998.
- CASTRO, E. M.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber): obtenção de plantas jovens assépticas para iniciar a micropropagação. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Curitiba, n. 27, p. 58-61, jul./ago. 2002.
- CAVALCANTI, B. C. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 388-392, 2006.
- COLARES, I. G.; SEELIGER, U. Influência da luz sobre o crescimento e a produção de biomassa de *Ruppia maritima* L. em cultivo experimental. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 31-36, jan./mar. 2006.
- COSTA, J. A. S. **Estudos taxonômicos, biosistemáticos e fisiológicos em *Copaifera* L. (Leguminosae – Detarieae) com ênfase nas espécies do Brasil Extra-Amazônico**. 2007. 266 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.
- COWAN, R. S.; POLHILL, R. M. Detarieae DC. (1825). In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Londres: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 117-134. Part 1.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.
- CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, São Paulo, n. 4, p. 54-63, 1986.
- DEANS, S. G.; WATERMAN, P. G. Biological activity of volatile oils. In: HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G. **Volatile oils crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman Group, 1993. p. 97-109.
- ESAÚ, K. **Anatomia vegetal**. Barcelona: Ômega, 1972. 778 p.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic, 1979. 302 p.
- FARIA, L. J. G.; COSTA, C. M. L. **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém: UFPA, 1998. 302 p. (Poema, n. 7).

FERNANDES, R. M. **Contribuição para o conhecimento do efeito antiinflamatório e analgésico do bálsamo de copaíba e alguns de seus constituintes químicos (éster metílico do ácido solidago e ácido copálico)**. 1986. 60 p. Mestrado (Farmacologia/Terapêutica Experimental) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1986.

FLEURY, M. On medicinal role of copahu balsam. **Acta Botanica Gallica**, Montpellier, v. 144, n. 4, p. 473-479, 1997.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 17, p. 130-132, Mar./Apr. 2005.

GUILHON, G. M. S. P. et al. Volatiles from aerial parts and rhizomes of *Kyllinga brevifolia* Rottb. growing in Amazon. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 20, p. 545-548, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e silvicultura 2002**. Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=extracao vegetal](http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=extracao%20vegetal)>. Acesso em: 25 out. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e silvicultura 2008**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=extracaovegetal>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

KANG, R. et al. Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2328-2330, 1992.

KUBO, I.; MUROI, H. Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 7, p. 1102-1105, 1993.

LAMEIRA, O. A. et al. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the States of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 21, p. 105-107, 2009.

LANGENHEIM, J. H. et al. Leaf development in the tropical leguminous tree *Copaifera* in relation to microlepidopteran herbivory. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 14, p. 51-59, 1986.

LANGENHEIM, J. H. et al. Photosynthetic responses to light in seedlings of selected Amazonian and Australian rainforest tree species. **O Ecologia**, México, v. 63, n. 2, p. 215-224, 1984.

LANGENHEIM, J. H.; ARRHENIUS, S. P.; NASCIMENTO, J. C. Relationship of light intensity to leaf resin composition and yield in the tropical Leguminous genera *Hymenaea* and *Copaifera*. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 9, n. 1, p. 27-37, 1981.

LANGENHEIM, J. H.; FEIBERT, E. B. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorffii*: relation to irradiance and herbivory. **Phytochemistry**, Oxford, v. 8, n. 27, p. 2527-2532, 1988.

LEE, D. W.; BONE, S. T.; STORCH, D. Correlates of optical properties in tropical forest extreme shade and sun plants. **American Journal of Botany**, Ames, v. 77, n. 3, p. 370-380, Mar. 2000.

LEEWENBERG, A. J. M. **Medicinal and poisonous plants of the tropics**. Pudoc: Wageningen, 1987.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. Londres: Royal Botanic Gardens, 2005. 369 p.

LEWIS, G. P.; OWEN, P. E. **Legumes of the Ilha de Maracá**. Londres: Royal Botanic Gardens, 1989. 95 p.

LIMA, S. R. M. et al. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, Brisbane, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.

MACEDO, C. A.; LANGENHEIM, J. H. A further investigation of leaf Sesquiterpene variation in Relation to Herbivory in two Brazilian Populations of *Copaifera langsdorffii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 17, n. 3, p. 207-216, 1989a.

MACEDO, C. A.; LANGENHEIM, J. H. Intraplant and interplant leaf sesquiterpene variability in *Copaifera langsdorffii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 17, n. 7-8, p. 551-557, 1989b.

MACEDO, C. A.; LANGENHEIM, J. H. Microlepidopteran herbivory in relation to leaf sesquiterpenes in *Copaifera langsdorffii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 17, n. 3, p. 217-224, 1989c.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B. Óleos essenciais da Amazônia: inventário da flora aromática. In: CRISTIANE, M. L. C.; LÊNIO, J. G. P. **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém: UFPA, 1998. p. 127-146.

MARCATI, C. R.; ALFONSO, V. A.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 311-320, 2001.

MEDEIROS, R. D. **Sustentabilidade da extração, produção e características químicas do óleo-resina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

MENDONÇA, F. A. C. et al. Larvicidal activity of *Cybastax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, Carlet, v. 76, n. 7/8, p. 639-636, Dec. 2005.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**. 2nd ed. Oxford: Clarendon, 1983. 297 p. v. 2.

MING, L. C. **Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função de fases de desenvolvimento, calagem e adubações mineral e orgânica em *Ageratum conyzoides* L.** 1996. 65 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1996.

MOURÃO, A. P. et al. Estudo do óleo resina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) como fonte não convencional de energia, visando sua utilização em motores diesel. In: ENCONTROS DE PROFISSIONAIS DE QUÍMICA DA AMAZÔNIA, 1., 2., 1980, Belém. **Anais...** Belém, 1980. p. 103-112.

NASCIMENTO, M. E.; ZOGHBI, M. G. B.; SILVA, R. C. V. M. Aspectos anatômicos dos elementos secretores na folha de *Copaifera multijuga* Hayne (Leg. Caes.) e análise química do óleo-resina proveniente do tronco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais...** Varginha, 2006.

NOBEL, P. S. Internal leaf area and cellular CO₂ resistance; photosynthetic implications of variations with growth conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 137-144, 1977.

OLIVEIRA, E. C. P. **Identificação da época de coleta do óleo de copaíba (*Copaifera spp.*) do Município de Mojú-PA e avaliação na inibição do crescimento micelal in vitro de Fitopatógenos.** 2004. 54 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2004.

OLIVEIRA, M. I. **Crescimento, características estruturais e teor de óleo essencial de *Artemisia vulgaris*, submetidas a diferentes espectros luminosos.** 2006. 85 p. Dissertação (Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

OHSAKI, A. et al. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *C. langsdorffii* Desf. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae, Cesalpinioideae) em uma floresta semidecídua do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 183-194, 2002.

PLOWDEN, C. **The ecology, management and marketing of Non-Timber forest products in the Alto Rio Guamá Indigenous Reserve (Eastern Brazilian Amazon).** 2001. 252 p. Dissertation (Ph.D.) - Pennsylvania State University, Pennsylvania, 2001.

RIDDOCH, I. et al. Photosynthesis and successional status of seedlings in a tropical semi-deciduous rain forest in Nigeria. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 491-503, June 1991.

RODRIGUES, T. M. **Espaços secretores em *Copaifera langsdorffii* Desf. de *Pterodon pubescens* Benth: ontogênese, estrutura e secreção.** 2008. 146 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2008.

SANTOS, A. S. et al. Análise técnica, econômica e de tendências da indústria brasileira de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 8, 2002.

SANTOS JUNIOR, N. A. **Estabelecimento inicial de espécies florestais nativas em sistema de semeadura direta.** 2000. 96 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SCHULMAN, M. Plantas da Amazônia reinam em cosméticos e sabonetes. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 22 ago. 2003. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=3760>. Acesso em: 15 dez. 2009.

SHANLEY, P.; CYMERIS, M.; GALVÃO, J. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Belém: EMBRAPA, 1998. 127 p.

SILVA, F. H. et al. Estudo do óleo essencial e extrato hidrometanólico de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinaceae) do cerrado e Mata Atlântica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2006.

SILVA, R. C. V. M. **Taxonomia das espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae) ocorrentes na Amazônia brasileira**. 2006. 258 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SIMONETTI, G. **MacDonald encyclopedia of herbs and spices**. Verona: MacDonald, 1991.

SIQUEIRA, G. C. L. **Produtos potenciais da Amazônia**. Brasília: SEBRAE, 1996. 97 p.

SIQUEIRA, G. C. L. et al. **Copaíba: produtos potenciais da Amazônia**. Brasília: SEBRAE, 1998. 28 p.

SOARES, J. G. et al. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e látices da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 9, p. 65-59, 2003.

SOARES, S. B. **Análise do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e o estudo da sua potencialidade como biocombustível**. 2008. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2008.

SOUZA, C. C. **Estabelecimento e crescimento inicial de espécies florestais em plantios de recuperação de matas de galeria do Distrito Federal**. 2002. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

TEUSCHER, E. **Pharmazeutische biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.

TIMBLINDIM. **Inflorescência de *Copaifera langsdorffii***. Disponível em: <timblindim.wordpress.com/arvores/copaiba/>. Acesso em: 19 out. 2008.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais da Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1982. 223 p. (Botânica).

VEIGA JÚNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, London, v. 2, n. 112, p. 248-254, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286. 2002.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; PATITUCCI, M. L. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 612-617, 1997.

WANG, J.; LANGENHEIM, J. H. Seasonal and diurnal variation in leaf sesquiterpenes of greenhouse-grow samplings of *Hymenaea* and *Copaifera*. **Acta Botânica Yunnanica**, Sichuan, v. 1, n. 12, p. 85-91, 1990.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the States of Pará and Amapá, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 21, p. 501-503, 2009.

ZOGHBI, M. G. B.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal variation of oleoresin and volatiles from *Copaifera martii* Hayne growing wild in the State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 19, n. 6, p. 504-506, Nov./Dec. 2007.

**CAPÍTULO 2: Caracterização anatômica dos elementos secretores de óleo
de *Copaifera langsdorffii***

RESUMO

Embora muitos trabalhos tratem da produção, dos variados usos e das atividades biológicas do óleo-resina de espécies de *Copaifera*, poucos são os estudos realizados sobre os sítios de produção desse metabólito secundário no diferentes órgãos da planta. Com esse objetivo, caracterizaram-se a anatomia dos elementos secretores de óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, sua identificação, localização nos diferentes tecidos e suas dimensões. Testou-se se as dimensões dos elementos secretores sofrem variações significativas entre espécimes, uma vez que tais dimensões podem estar relacionadas ao maior volume de secreção e se a ocorrência das estruturas secretoras apresenta variações no mesmo órgão entre as fases de planta jovem e planta adulta. Raiz, caule e folha foram coletados de plantas jovens cultivadas em casa de vegetação e fixados em FAA e álcool 70% para microscopia fotônica e caule e folha de espécimes adultos no campus da UFLA, em Lavras, MG, foram fixados para microscopia fotônica e em Karnovsky para microscopia eletrônica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com plantas jovens e espécimes adultos, com cinco repetições, consistindo nas medições dos elementos secretores da folha, que representa o órgão mais disponível na planta. Os elementos secretores são de dois tipos, cavidades secretoras e ductos, e ocorrem em ambos os órgãos estudados. Nas folhas, são principalmente cavidades secretoras e ocorrem entre o parênquima paliçádico e o esponjoso. No caule, são, principalmente, elementos mais alongados ou ductos e localizam-se no parênquima fundamental da região cortical e da região central. Nas folhas, há grande concentração de cavidades secretoras e foram encontradas diferenças significativas de suas dimensões entre os espécimes adultos e pequena variação de tamanho com relação às plantas jovens, nas quais são maiores. A caracterização anatômica foliar nas plantas jovens e nos espécimes adultos é semelhante, porém, entre os caules são diferentes, especialmente no sistema de revestimento e vascular. Quanto aos ductos secretores, apresentam-se semelhantes em quantidade e em localização nos tecidos desse órgão e também na raiz das plantas jovens.

Palavras-chave: Elementos secretores. Anatomia. Plantas jovens. Planta adulta. *Copaifera langsdorffii*.

ABSTRACT

Although many works deal with the production of the various uses and biological activities of the oil-resin of *Copaifera* species, there are few studies on the sites of secondary metabolite production in different plant organs. With this objective, characterized the anatomy of the secretory elements of oil-resin of *Copaifera langsdorffii*, Identification, location in different tissues and its dimensions. We tested whether the dimensions of the secretory suffer significant variations between specimens, since these dimensions may be related to increased volume of secretion and the occurrence of secretory structures varies in the same organ between phases of seedling and adult plant. The botanical material root, stem and leaf were collected from seedlings grown in a greenhouse set at F. A. A. and 70 % ethanol for light microscopy and stem and leaf of adult specimens on the campus of UFLA - Lavras-MG, fixed for light microscopy and electron microscopy Karnovisky. The experimental design was randomized, with seedlings and adult specimens, with five replicates. Consisted of measurements of the secretory elements of the leaf that represents the body longer available in the plant. Secretory elements are of two types, secretory cavities and ducts, occur in both organs studied. In the leaves and are mainly secretory cavities occur between the palisade and spongy parenchyma. In the stems are mostly elongated or more elements and ducts are located in the central parenchyma of the cortical region and the central region. In leaves there are large concentrations of secretory cavities and significant differences were found between the dimensions of adult specimens, and little variation in size relative to the seedlings, which are larger. Anatomical characterization leaf in the seedlings and in adult specimens is similar, but among the stems are different, especially in the coating system and vascular, on the secretory ducts were similar in amount and localization in tissues of this organ and also at the root of seedlings.

Keywords: secretory elements. Anatomy. Young plants. Adult plant. *Copaifera langsdorffii*.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *C. langsdorffii* é nativa do Brasil e ocorre em todas as regiões do país. Do seu tronco é extraído um óleo-resina. O conteúdo secretado nessa espécie ocorre em diversos órgãos da planta no interior de cavidades secretoras na folha (AZEVEDO, 2003), no pericarpo (PEREIRA et al., 2008) e em espaços secretores com epitélio bisseriado tipo canais, no caule (RODRIGUES, 2008).

Segundo Fahn (1979), as cavidades e ductos de óleo ou resina consistem de grandes espaços contornados internamente por um epitélio de células secretoras, que pode ser formado pela separação das paredes das células vizinhas (canais esquizógenos). As células secretoras do epitélio eliminam as substâncias produzidas no lume no ducto ou na cavidade. Os óleos voláteis presentes no conteúdo secretor podem atrair agentes polinizadores ou repelir insetos, reduzindo a herbivoria, enquanto as resinas podem bloquear ferimentos, com papel relevante na defesa contra patógenos (APEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Uma das grandes lacunas no estudo dessa espécie está na caracterização anatômica da estrutura secretora, cuja composição estrutural, especialmente do epitélio secretor que se encontra indevidamente classificado quanto à sua estrutura bisseriada, sendo, todavia, necessário maior discernimento estrutural desses elementos secretores, motivo pelos quais devem ser utilizadas técnicas especiais com microscopia eletrônica de varredura para evidenciar tais estruturas.

Apesar de muitos estudos sobre a produção, a comercialização, os usos medicinais e as atividades biológicas, poucos são os trabalhos relacionados aos sítios de produção do óleo-resina na planta, especialmente sua distribuição e localização nos tecidos. Embora as estruturas secretoras surjam na fase inicial de crescimento, não foram encontradas, na literatura consultada, descrições

anatômicas do organismo vegetal dessa espécie, após o primeiro mês, quando a planta já apresenta os diferentes tecidos.

Assim, visando ampliar e aprofundar o conhecimento anatômico de *C. langsdorffii*, o presente trabalho foi realizado com o principal objetivo de fazer uma caracterização anatômica dos elementos secretores nos órgãos vegetativos, em plantas jovens e na planta adulta, destacando a identificação e a localização desses elementos no organismo vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia do presente trabalho foi desenvolvida com amostras botânicas provenientes de plantas jovens e espécimes adultos e constou de diferentes técnicas de microscopia fotônica e eletrônica, com a utilização variada de equipamentos, conforme discriminados a seguir.

2.1 Material botânico

O material botânico para estudo anatômico foi composto por raiz, segmento da região do coleto, caule apical e (folíolos medianos) de folhas compostas com três pares de folíolos do segundo nó a partir do ápice de plantas jovens cultivadas em casa de vegetação e folíolos medianos e segmentos caulinares do entrenó apical de plantas adultas de *C. langsdorffii*, nativas do campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. As plantas jovens utilizadas estavam com 30 dias e aproximadamente 15 cm de altura. As plantas adultas encontravam-se diferentes fases de desenvolvimento, sendo: espécime 1, com aproximadamente 8 m de altura e CAP de 74 cm; espécime 2, com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm; espécime 3, com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm; espécime 4, com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm e espécime 5, com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm, ambas em fase final de dispersão das sementes.

As coletas foram realizadas no campus da UFLA. Amostras do material vegetal foram herborizadas e incorporadas ao acervo do Herbário ESAL, da mesma universidade, sob os números 24946, 24947, 24952, 24954 e 24956, correspondentes aos espécimes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

O trabalho foi conduzido no Departamento de Biologia, no Laboratório de Anatomia e no Laboratório de Microscopia Eletrônica, todos UFLA, no período de setembro a outubro de 2008.

2.2 Técnica para microscopia fotônica

A fixação das folhas, dos segmentos do caule e da raiz principal de cinco plantas jovens e cinco plantas adultas, seguiu a metodologia para microscopia fotônica com FAA e álcool 70%. Foram preparadas lâminas histológicas semipermanentes, cujo material foi seccionado à mão-livre com o auxílio de lâmina de aço, coradas com safrablau 1% aquoso, montadas em água glicerinada entre lâmina e lamínulas e fixadas com esmalte incolor (KRAUS; ARDUIN, 1997). Para as descrições anatômicas, seguiu-se a nomenclatura de acordo com Esaú (1972) e Fahn (1979).

2.3 Testes histoquímicos

A partir de material *in natura*, foram realizados testes histoquímicos com Sudam IV, para detectar a presença de substâncias lipídicas nos elementos secretores dos diferentes órgãos, com cloreto férrico para detectar grãos de amido e ácido cianídrico e ácido sulfúrico para a identificação de cristais (JOHANSEN, 1940).

2.4 Técnica do nitrogênio líquido (MEV)

Secções com 2 mm de largura e 4 mm de comprimento, de folíolos medianos da terceira folha e segmentos de 0,3 mm do caule, foram fixados em solução de Karnovsky a 2,5%, em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,3), imerso em

glicerol 30% por 30 minutos e lavados em água destilada. Depois, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio, lavadas em água destilada e desidratadas em gradientes crescentes de acetona. Sequencialmente, foram seccionadas em nitrogênio líquido com auxílio de bisturi e secas em ponto crítico de dessecação de CO₂, em equipamento BAL-TEC, CPD-03. As amostras foram coladas sobre fita dupla face de carbono fixadas em “stubs” previamente envolvidos com papel alumínio, cobertas com ouro com espessura de aproximadamente 10nm, em aparelho BAL-TEC, SCD-050. O material preparado foi observado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO 40, XVP.

2.5 Testes estatísticos

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados do diâmetro polar e equatorial das cavidades secretoras de plantas jovens e de plantas adultas foram medidos em cinco lâminas, com cinco repetições. Foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR versão 4.3 (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os elementos secretores são os sítios de produção do óleo-resina. São de formatos e dimensões variadas e cada tipo identificado ocorre em tecidos específicos da planta adulta e em plantas jovens, conforme resultados descritos abaixo.

3.1 Caracterização anatômica foliar da planta jovem de *Copaifera langsdorffii*

As folhas são dorsiventrals e hipoestomáticas. Os estômatos são paracíticos em sua maioria, podendo ocorrer também o tipo anisocítico e tetracítico. Em vista frontal, destacam-se as paredes onduladas das células epidérmicas abaxiais e levemente retas na face epidérmica adaxial, em que, esporadicamente, são verificadas estruturas secretoras superficiais, por onde extravasa conteúdo secretor, cuja reação histoquímica foi positiva para a substância lipídica. De acordo com a literatura consultada, tal ocorrência ainda não havia sido descrita para a espécie em estudo (Figuras 2-A e 2-B).

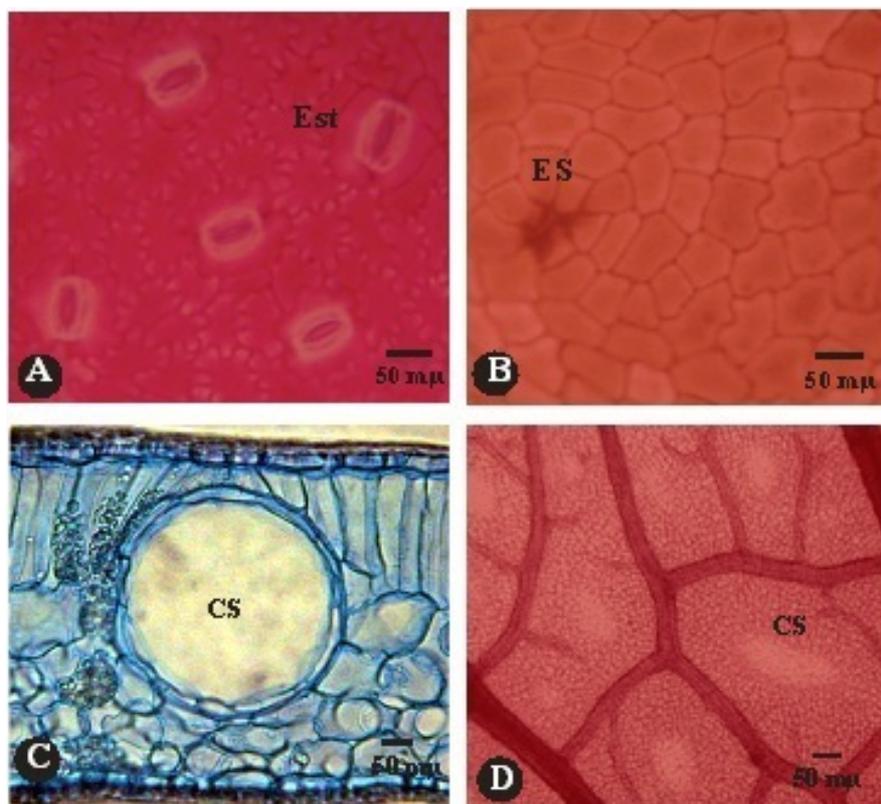


Figura 2 Caracterização anatômica foliar em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*. A – superfície epidérmica abaxial; B - superfície epidérmica adaxial; C - mesófilo com cavidade secretora e D - venação foliar com cavidades secretoras. Est – estômatos, ES – estrutura secretora e CS – cavidade secretora

As faces adaxial e abaxial da epiderme têm características anatômicas semelhantes: são uniestratificadas, formadas por células achatadas, levemente alongadas no sentido transversal e recobertas por uma cutícula que penetra entre as paredes anticliniais da mesma. O parênquima paliçádico é uniestratificado, constituído por uma camada de células alongadas perpendicularmente à epiderme e ricas em grãos de amido. O parênquima esponjoso é formado por

células arredondadas e heterodimensionais, com espaços intercelulares característicos desse tecido e entre os dois parênquimas encontram-se as cavidades secretoras (Figura 2-C).

Essas cavidades são arredondadas e contornadas por um epitélio secretor limitando um espaço interior onde o conteúdo secretado é armazenado. Tais estruturas se localizam próximas às terminações das nervuras quaternárias (Figuras 2-C e 2-D). Os ductos são estruturas alongadas e ocorrem na nervura central e no caule, em disposição paralela ao maior eixo do órgão.

A espécie em estudo apresenta padrão de venação foliar, de acordo com Hickey (1973), do tipo “camptódromous-brochidódromous”, com nervuras que diminuem de calibre até a quarta grandeza. Possui nervura intercostal, limitando os arcos formados pelas nervuras secundárias (Figuras 2-D e 2-B).

5.2 Caracterização anatômica caulinar da planta jovem de *Copaifera langsdorffii*

O caule em estrutura primária apresenta epiderme uniestratificada, recoberta por uma cutícula e estômatos e tricomas tectores. A região cortical é formada por 5 a 6 camadas de células parenquimáticas com estruturas secretoras mais alongadas longitudinalmente, caracterizando ductos secretores (Figura 3 A). Ainda na região cortical, verifica-se uma faixa contínua, formada por 2 a 4 camadas de células com paredes esclerificadas, protegendo externamente os agrupamentos de floema contra danos mecânicos, os quais são separados entre si por raios parenquimáticos. Embora o caule esteja em estágio inicial de crescimento, o câmbio vascular é formado por um anel contínuo de células achatadas no sentido periclinal, a partir das quais é formado o tecido floemático em direção externa e o xilemático em direção interna. O xilema forma uma faixa contínua, porém irregular, contornando a região medular do órgão, onde são

verificados ductos secretores em diferentes estágios de desenvolvimento (Figuras 3 A e 3 B).



Figura 3 Fotomicrografias do caule e da raiz de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*. A - corte transversal do caule; B - detalhe do caule; C – corte transversal da raiz e D – detalhe da raiz. DS – ducto secretor, X – xilema, F – floema e Esc – esclerênquima

Um corte transversal da raiz principal na região do coleto revela os diferentes tecidos, sequencialmente dispostos, com a presença de periderme bem característica, evidenciando felognio, feloderme e sber. Uma região cortical é formada por cerca de seis camadas de células parenquimáticas, com a presença de ductos secretores. O floema, disposto em pequenos agrupamentos, é encontrado contornado por uma faixa de tecido esclerificado irregular, porém, em

estágio mais adiantado, quando comparado ao caule, cujas células apresentam paredes celulares mais espessadas e pouco lúmen celular. Raramente, os raios parenquimáticos que separam perpendicularmente o floema intercalam a faixa de esclerênquima, causando descontinuidade. O anel cambial é contínuo e, diferentemente do caule, produz uma faixa de tecido mais desenvolvido, floemático em direção externa e xilemático em direção interna. Na região medular, o parênquima fundamental também revela a presença de ductos secretores em diferentes fases de desenvolvimento (Figuras 3-C e 3-D).

5.4 Anatomia foliar na planta adulta de *Copaifera langsdorffii*

Nas seções transversais e paradérmicas da região central de folíolos medianos da folha de *C. langsdorffii* pode ser visualizado o mesófilo dorsiventral, com face epidérmica adaxial e abaxial uniestratificada revestida por uma cutícula. O parênquima paliçádico é também uniestratificado, com células bem alongadas ocupando aproximadamente 50% do mesófilo, ou biestratificado em alguns pontos. O parênquima esponjoso é formado por três ou quatro camadas de células mais curtas, de formatos irregulares, com projeções e espaços intercelulares. Os feixes vasculares são dispostos em posição intermediária entre os parênquimas paliçádico e esponjoso e, próximos a esses feixes, são encontrados os elementos secretores.

Um corte transversal do limbo foliar submetido a tratamento com Sudam IV revelou, em microscopia fotônica, pela coloração avermelhada dos resíduos do conteúdo secretado, a presença de compostos lipídicos e resinas nas cavidades secretoras.

De acordo com a classificação de Apezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2006), Esaú (1972) e Fahn (1979), os elementos secretores de *C. langsdorffii* podem ser identificados de dois tipos: cavidades secretoras e ductos

secretoras. As cavidades secretoras ocorrem nas folhas, no limbo foliar e em porção intermediária no mesofilo (Figura 4-A). De acordo com Milani (2010), em *C. trapezifolia* Hayne, as cavidades secretoras das folhas apresentam formato esférico. Entretanto, na espécie em estudo, a venação foliar revelou diferentes dimensões e formatos, esféricos, elípticos e até alongados, cujo maior eixo é paralelo à epiderme.

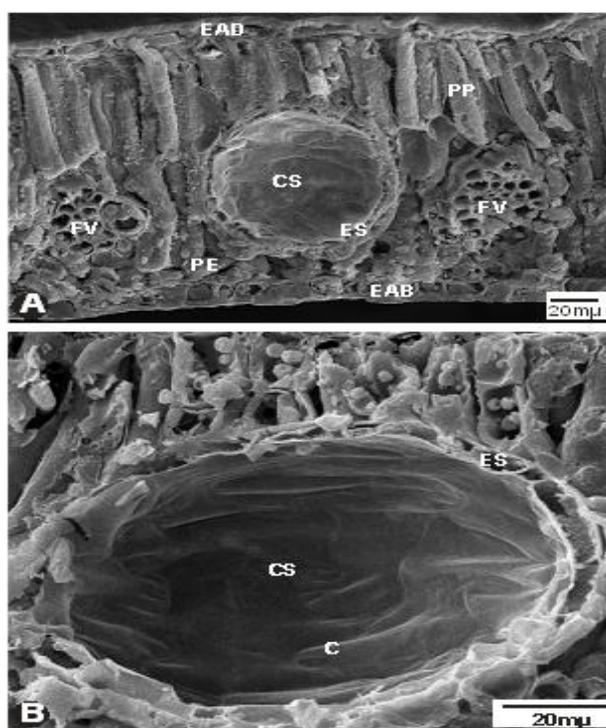


Figura 4 Eletromicrografias de varredura de *Copaifera langsdorffii* em nitrogênio líquido. A – vista do mesofilo da folha em secção transversal, evidenciando: epiderme adaxial (EAD), parênquima paliádico (PP), cavidade secretora (CS) e seu respectivo epitélio secretor (ES), feixes vasculares (FV), parênquima esponjoso (PE) e epiderme abaxial (EAB); B – vista interna da cavidade secretora (CS), evidenciando um revestimento cuticular (C) sob o epitélio secretor (ES)

Em eletromicrografia ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) (2000X) é evidenciado um epitélio secretor, limitando externamente cada cavidade secretora. Este é revestido internamente por uma fina película contínua, semelhante a um revestimento cuticular (Figura 4-B).

O revestimento cuticular interno da cavidade secretora em MEV não evidencia a presença de microporos, rompimentos ou qualquer outro tipo de via apoplástica por onde possa ser extravazado o conteúdo secretado das células do epitélio secretor. Possivelmente, esse revestimento interno é permeável ao conteúdo secretado por esse epitélio, sendo, todavia, necessários mais estudos para evidenciar os possíveis caminhos de secreção nas estruturas secretoras e dessas aos tecidos anexos.

Na nervura central, os elementos secretores são estruturas mais alongadas, tubulares, descontínuas e heterodimensionais, as quais podem ser denominadas ductos secretores. O maior eixo é paralelo aos feixes vasculares no sentido longitudinal. Localizam-se no parênquima cortical da região abaxial da nervura e, geralmente, são visualizados de 1 a 3 ductos nas secções transversais (Figura 5-A). Amostras da parte central da folha, em vista frontal, preparada pela técnica de diafanização foliar, evidenciam espaços esbranquiçados de dimensões e formatos variados, geralmente próximos às terminações da nervura. São as cavidades secretoras, semelhantes às encontradas na folha das plantas jovens (Figura 5-B).

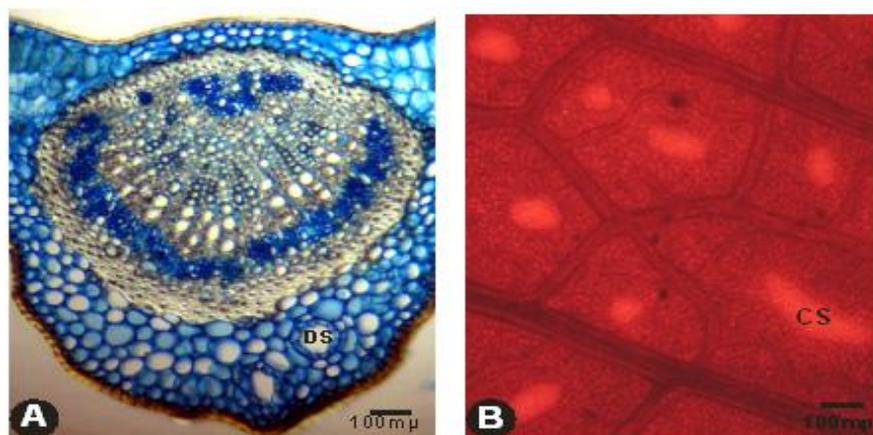


Figura 5 Fotomicrografias da folha de *Copaifera langsdorffii*. A – secção transversal, com ductos secretores (DS) na nervura central; B – vista frontal da folha com cavidades secretoras (CS)

As cavidades secretoras, de acordo com teste de Tukey, apresentam diferenças significativas quanto às suas dimensões entre os espécimes adultos (Tabela 1) e ligeiramente menores que nas plantas jovens, nas quais o diâmetro polar médio da cavidade secretora em casa de vegetação foi $DpCs = 211,60$ e o diâmetro equatorial médio da cavidade secretora foi $DeCs = 232,10$ (capítulo 3).

Tabela 2 Médias dos diâmetros polar ($DpCs$) e equatorial ($DeCs$) das cavidades secretoras de óleo da folha de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*

| Variáveis | Espécimes | | | | | Média geral | CV(%) |
|---|-----------|----------|----------|----------|----------|-------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| $DpCs$ (μm) | 92.16 a | 89.75 a | 137.17 b | 133.33 b | 125.41 b | 115.56 | 24.29 |
| $DeCs$ (μm) | 112.56 a | 108.15 a | 200.12 b | 153.25 b | 184.52 b | 151.72 | 18,46 |

Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

De acordo com Castro et al. (1998), Castro et al. (2007) e Castro e Alvarenga (2002), a variação anatômica foliar deve ser avaliada em relação à intensidade, à qualidade e à quantidade de luz. Porém, por se tratarem de

espécies arbóreas sujeitas às mesmas condições ambientais e mesma intensidade de luz, possivelmente, as diferenças nas dimensões das cavidades secretoras nas folhas são devido a variações genótípicas desses espécimes.

5.5 Anatomia caulinar da planta adulta de *Copaifera langsdorffii*

Secções transversais do caule, com nitrogênio líquido, revelam os tecidos sequencialmente dispostos: periderme, felogênio, parênquima cortical com elementos secretores, floema, xilema e parênquima central com elementos secretores. Esses elementos apresentam-se também alongados, semelhantes aos que ocorrem na nervura central, cujo maior eixo é paralelo ao eixo caulinar, caracterizando ductos secretores (DS). Os ductos secretores são heterodimensionais e não ocorrem em local pré-determinado, mas distribuem-se diferentemente nas ramificações do caule. Todavia, podem ocorrer distanciados ou próximos entre si (Figuras 6-A e 6-B).

Em corte transversal, os ductos secretores, assim como as cavidades secretoras, tanto nas plantas jovens quanto na planta adulta, apresentam o epitélio secretor formado por células menores que as do tecido onde ocorrem. São comprimidas no sentido anticlinal, possuem parede interna íntegra, sugerindo um possível afastamento das células durante a sua formação, caracterizando elementos secretores esquizógenos (Figuras 1-C, 2-B, 2-D, 3-B e 5-A), ratificando as observações feitas por, Marcati, Alfonso, Benetati (2001) e Rodrigues (2008), no caule de *C. langsdorffii*. Nas células do parênquima central, são observados muitos grãos de amido, como material de reserva aos processos fisiológicos da planta (Figura 5-A e 5-B).

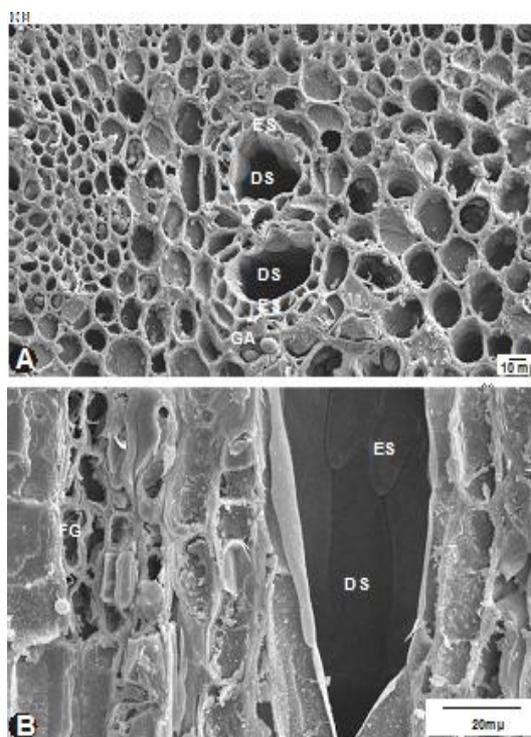


Figura 6 Eletromicrografias de varredura de *Copaifera langsdorffii* em nitrogênio líquido. A – vista da região medular do caule em secção transversal, com dois ductos secretores (DS) e seus respectivos epitélios secretores (ES) e grãos de amido (GA); B – vista do caule da região cortical em secção longitudinal, com o felogênio (FG), um ducto secretor (DS) rompido longitudinalmente e vista interna do epitélio secretor (ES)

Barata (1997) caracterizaram o óleo-resina de *Copaifera* como proveniente da decomposição das paredes das células do interior do tronco da árvore. De acordo com os testes histoquímicos realizados nesse estudo, foram observados resultados diferentes, nos quais os conteúdos lipofílicos foram detectados somente em cavidades, cujas paredes das células do epitélio secretor apresentavam-se aparentemente íntegras e não revelaram resíduos de óleo em outros tecidos.

6 CONCLUSÕES

A partir das observações anatômicas realizadas no presente trabalho, foi possível destacar algumas características peculiares à espécie em estudo, como presença de estruturas secretoras nos diversos órgãos da planta. Apesar da alta produção de conteúdo de óleo-resina, apenas dois tipos de estruturas secretoras podem ser identificados, as cavidades secretoras, cuja principal ocorrência foi na folha e os ductos secretores distribuídos tanto na região cortical quanto na medular do caule e da raiz de *C. langsdorffii*.

Tais estruturas têm localizações semelhantes, tanto nas plantas jovens quanto nos espécimes adultos. Entretanto, suas dimensões variaram significativamente entre os diferentes espécimes adultos estudados.

Com base nos testes histoquímicos e nas observações anatômicas, que revelam a presença de uma cutícula revestindo internamente as cavidades secretoras, não foi observada a presença de conteúdo secretor fora dos elementos secretores.

Tanto na planta jovem como na adulta foi detectada, nas estruturas secretoras, a presença de conteúdo secretor, indicando, portanto, a produção de óleo-resina ainda na fase jovem.

REFERÊNCIAS

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 438 p.

AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

BARATA, L. E. S. **Copaíba: propriedades farmacológicas, etnofarmacologia e usos**. Rio de Janeiro: GEF/Instituto Pró-Natura, 1997. (Relatório 1).

CASTRO, E. M. et al. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 8-16, 2007.

CASTRO, E. M. et al. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumar sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, ago. 1998.

CASTRO, E. M.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber): obtenção de plantas jovens assépticas para iniciar a micropropagação. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Curitiba, n. 27, p. 58-61, jul./ago. 2002.

ESAÚ, K. **Anatomia vegetal**. Barcelona: Ômega. 1972. 778 p.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic, 1979. 302 p.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3: sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000.

HICKEY, L. J. Classification of the architecture of dicotyledons leaves. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 60, n. 1, p. 17-33, 1973.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. Bombay: McGraw-Hill, 1940. 532 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

MARCATI, C. R.; ALFONSO, V. A.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 311-320, 2001.

MILANI, J. F. **Cavidades secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Copaifera trapezifolia* Hayne** (Leguminosae, Caesalpinioideae). 2010. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

PEREIRA, F. J. et al. Isolamento, composição química e atividade anti-inflamatória do óleo essencial do pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 3, p. 74-369, 2008.

RODRIGUES, T. M. **Espaços secretores em *Copaifera langsdorffii* Desf. de *Pterodon pubescens* Benth**: ontogênese, estrutura e secreção. 2008. 146 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

CAPÍTULO 3 Efeito do estresse térmico e da luz sobre a estrutura foliar de plantas jovens e a produção de biomassa seca em *Copaifera langsdorffii*

RESUMO

Foi avaliado o efeito do estresse térmico e da intensidade e da qualidade de luz sobre as características morfoanatômicas foliares, destacando as cavidades secretoras de óleo e a biomassa seca de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*. As plantas jovens foram obtidas a partir de sementes e colocadas para germinar em câmara BOD, a 30°C e, após trinta dias, foram submetidas a dois diferentes experimentos em delineamento inteiramente casualizado. No experimento sob efeito do estresse térmico, as plantas jovens com o primeiro par de folhas completamente expandidas foram transplantadas para copos contendo plantimax, aclimatizadas durante quinze dias em casa de vegetação e transferidas para BOD com temperaturas de 15°C, 25°C, 35°C e o controle que permaneceu em casa de vegetação (29°C), por um período de 120 dias. No experimento sob efeito da intensidade e da qualidade de luz, as plantas jovens foram transplantadas para sacos de polipropileno contendo um substrato composto por terra preta, areia e esterco, na proporção 1:2:1. Inicialmente, permaneceram por quinze dias sob sombrite 70% e, em seguida, foram transferidas para cada tratamento, onde foram cultivadas por seis meses sob malhas coloridas de polipropileno com 50% de sombreamento, nas cores vermelho, azul e verde; sob malha preta de 70% e o controle a pleno sol. Os resultados demonstraram diferenças significativas no tamanho e na frequência dos estômatos, nas dimensões das cavidades secretoras de óleo e na espessura do mesofilo, entre os diferentes tratamentos de cada experimento. As plantas jovens submetidas a 25°C se tornaram mais vigorosas e com melhores condições morfoanatômicas nos órgãos vegetativos, estruturas e tecidos foliares. As plantas cultivadas sob malhas colorida vermelha e azul obtiveram o maior desenvolvimento em espessura na epiderme foliar adaxial e abaxial e nos parênquima paliçádico e esponjoso, maior frequência estomática, maior diâmetro polar e equatorial dos estômatos e maior área foliar, porém, com exceção da área foliar, não exibiram diferenças significativas entre si. Foram significativamente diferentes quanto à frequência das cavidades secretoras e a biomassa seca da parte aérea e subterrânea, em que as plantas conduzidas sob malha vermelha apresentaram maior biomassa seca da parte subterrânea e as plantas mantidas sob malha azul apresentaram a maior biomassa seca da parte aérea. Quanto aos diferentes sombreamentos, as plantas mantidas sob malha preta exibiram desenvolvimento semelhante ao das plantas sob malhas coloridas e a pleno sol apresentaram os menores índices de desenvolvimento. Esses resultados revelaram que tanto a intensidade quanto a qualidade espectral da luz interfere no desenvolvimento das plantas jovens de *Copaifera langsdorffii* e as malhas vermelhas e azuis mostraram-se mais adequadas para a obtenção de mudas mais promissoras ao seu estabelecimento no campo.

Palavras-chave: Estresse térmico. Efeito da luz. Anatomia foliar. Biomassa seca.
Copaifera langsdorffii.

ABSTRACT

The effect of heat stress and the intensity and light quality on leaf characteristics morphoanatomical, highlighting the secretory cavities of oil and dry biomass of young plants of *Copaifera langsdorffii*. Seedlings were obtained from seeds and germinated in the House chamber at 30 °C and, after thirty days were subjected to two different experiments. In the experiment under the effect of heat stress, seedlings with the first pair of fully expanded leaves were transplanted into cups containing Plantimax, acclimatized for two weeks in a greenhouse and transferred to BODs with temperatures of 15 °C, 25 °C, 35 °C, and the control that remained in the greenhouse (29 °C) for a period of 120 days. In the experiment under the effect of the intensity and quality of light, seedlings were transplanted into polypropylene bags containing a substrate composed of black soil, sand and manure in the ratio 1:2:1. Initially, remained for fifteen days under 70 % shade, and then were transferred to each treatment, which were grown for six months under colored nets polypropylene with 50 % shading in the colors red, blue and green under black mesh 70 % and control in full sun. The results showed significant differences in size and frequency of stomata, the size of the secretory cavities of oil and the thickness of mesophyll between the different treatments of each experiment. Seedlings subjected to 25 °C became more vigorous and better able morphoanatomical in vegetative organs, structures and leaves. Plants grown under mesh colored red and blue had the biggest development in the thick adaxial and abaxial leaf epidermis and palisade and spongy parenchyma, the greater stomatal frequency, the more polar and equatorial diameter of the stomata and leaf area, however, with the exception of the area leaf did not show significant differences between them. Were significantly different in the frequency of secretory cavities and dry biomass of shoots and underground, where the plants were conducted under red shading showed higher dry biomass of underground parts, and the plants grown under blue mesh showed the highest dry biomass of shoot. As for the different shading, the plants kept under black mesh exhibited development similar plants under colored nets and full sunlight showed the lowest levels of development. These results revealed that both the intensity and spectral quality of light interferes with the development of seedlings of *Copaifera langsdorffii* and the red and blue meshes were more suitable for the seedling establishment of its most promising field.

Keywords: Thermal stress. Effect of light. Leaf anatomy. Dry biomass. *Copaifera langsdorffii*.

1 INTRODUÇÃO

C. langsdorffii, por suas propriedades medicinais, está entre as espécies que sofrem extrativismo, sendo de fundamental importância a obtenção de informações agronômicas e de aclimatização para o cultivo *ex situ*. Essa espécie secundária tardia a clímax e com grande plasticidade ecológica é indicada para reflorestamento, arborização e recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2002).

O desenvolvimento dos vegetais é influenciado por diversos fatores ambientais, sendo a luz um agente determinante da morfologia e da anatomia foliar (COSTA et al., 2007; MARTINS et al., 2009).

O estudo da anatomia foliar é de grande importância para a compreensão da plasticidade adaptativa de uma espécie submetida a diferentes condições ambientais, por estar correlacionado com processos de trocas gasosas, assimilação de CO₂ e outras características inerentes ao crescimento da planta (LIMA et al., 2006; SANTIAGO et al., 2001). Também é conhecida a relação entre os tipos e a organização dos tecidos vegetais e a produção de diferentes metabólitos pela planta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As alterações nos tecidos internos da folha, em especial as dimensões das cavidades de armazenamento de óleo, estão condicionadas a fatores genéticos, porém, a intensidade e a qualidade da radiação podem interferir na formação e na densidade dos elementos secretores (HARBORNE, 1993). Do ponto de vista anatômico, informações a esse respeito são escassas.

Em plantio direto no seu ambiente natural, *C. langsdorffii* integrou o grupo de espécies florestais com o menor desenvolvimento inicial, cuja sobrevivência foi ameaçada pela matocompetição (SANTOS JÚNIOR, 2000). De acordo com Souza (2002), a taxa de sobrevivência dessa espécie em mata de galeria do Distrito Federal foi menor que 33% e o crescimento inicial lento.

Sobre os efeitos da temperatura no crescimento e anatomia dessa espécie, nada foi encontrado na literatura consultada.

De acordo com Esaú (1972), a radiação promove efeitos substanciais nas dimensões e na espessura das folhas. Algumas plantas apresentam plasticidade no seu desenvolvimento, crescendo como plantas de sol ou plantas de sombra (TAIZ; ZEIGER, 2004). Essa variação das características morfoanatômicas também pode ocorrer nas folhas de um mesmo indivíduo exposto a diferentes regimes de luz (TAIZ; ZEIGER, 2004). Segundo Castro e Alvarenga (2002), esses regimes podem ser avaliados quanto à quantidade, à qualidade e à intensidade da luz.

A identificação de melhores condições de temperatura e de sombreamento, bem como da qualidade espectral da luz, pode desempenhar papel fundamental no funcionamento do aparato fotossintético, visando maior eficiência na captação e na utilização da energia radiante, influenciando o desenvolvimento anatômico e morfológico da planta.

Considerando a crescente demanda por informações sobre espécies com potencial para serem transplantadas em ambientes degradados, torna-se necessário o conhecimento de suas variações morfoanatômicas sob a influência de diferentes condições de temperatura, intensidade e qualidade de luz, logo nos primeiros meses de crescimento, período crítico, em que as plantas jovens encontram-se mais susceptíveis às variações climáticas. Possivelmente, essas variações devem provocar alterações em nível de células, tecidos e das estruturas secretoras de óleo, comprometendo a sobrevivência e a adaptação das plantas jovens.

Nessa perspectiva, objetivou-se, com a realização deste estudo, avaliar a ação de diferentes temperaturas, quantidades e qualidade de luz sobre a anatomia foliar, a morfologia dos órgãos vegetativos e a produção de biomassa seca, na tentativa de identificar as condições mais adequadas para uma produção mais

eficiente de mudas de *C. langsdorffi*, favorecendo um melhor estabelecimento das mesmas quando do seu replantio no ambiente natural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *C. langsdorffii* de um mesmo lote foram obtidas a partir de frutos maduros, coletados em árvores existentes no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Após o beneficiamento, as sementes foram armazenadas, em sacos de polietileno semipermeáveis, por cerca de dois meses, em temperatura ambiente, até o início da germinação no Laboratório de Análises de Sementes (LAS/UFLA), dispostas em recipientes de plástico do tipo gerbox, com areia autoclavada, em câmara BOD, a 30°C, onde permaneceram por trinta dias.

2.1 Material botânico

Plantas jovens, obtidas a partir de sementes com crescimento uniforme, contendo duas folhas completamente expandidas, foram transplantadas para um novo substrato e aclimatizadas em casa de vegetação por 15 dias.

A coleta de material para estudo anatômico foi realizada ao final de cada experimento e consistiu na retirada de cinco folíolos de cada planta jovem, tendo sido utilizadas as folhas completamente expandidas, do segundo nó apical, produzidas durante os experimentos. Para o tratamento T1 sob efeito da temperatura, foram utilizados folíolos do único par de folhas apicais, uma vez que não produziram folhas novas.

2.2 Instalação dos experimentos

Em ambos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). O experimento sob efeito do estresse térmico foi montado com um controle, três tratamentos e cinco repetições. Sob efeito da luz, foi montado com

um controle, quatro tratamentos e cinco repetições, conduzidos em laboratório e no campus experimental da UFLA.

2.2.1 Efeito do estresse térmico

As plantas jovens foram aclimatizadas inicialmente em recipientes contendo plantimax. Em seguida, foi montado o experimento, sendo T a testemunha conduzida em casa de vegetação, cuja temperatura variou de 20°C a 33,5°C, com média no período de $29\pm 2^\circ\text{C}$, e os demais com temperatura controlada em câmara BOD regulada: T1 = $15\pm 2^\circ\text{C}$, T2 = $25\pm 2^\circ\text{C}$ e T3 = $35\pm 2^\circ\text{C}$. As câmaras foram reguladas com fotoperíodo de 12 horas e as plantas jovens foram regadas diariamente. O experimento foi instalado em novembro de 2007 e observado por 120 dias.

2.2.2 Efeito da intensidade e qualidade de luz

As plantas jovens foram aclimatizadas, inicialmente, em sacos de polipropileno contendo areia, solo e esterco (1:2:1) e deixadas, por 15 dias, para adaptação ao novo substrato em ambiente com 70% de sombreamento. Em seguida, foi montado o experimento, sendo T o controle conduzido em pleno sol; T1 sob malha vermelha (50%), T2 sob malha azul (50%), T3 sob malha verde (50%) e T4 sob malha preta com 70% de interceptação da radiação solar. Os tratamentos foram dispostos em área uniforme e sujeita às mesmas condições climáticas com temperatura média no período de $21,7^\circ\text{C}$, variando de $17,1^\circ\text{C}$ a $29,4^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar média de 77,5 UR. A insolação média no período foi de 6,1 h (dados da Estação Meteorológica da UFLA - 2007/2008). Esse experimento foi conduzido entre os meses de novembro de 2007 a abril de 2008, sob condições de viveiro, por um período de 180 dias.

As taxas fotossintéticas e os demais dados fisiológicos, como taxa de transpiração, incidência de radiação e condutância estomática, foram medidos na folha do terceiro nó apical, em cinco folíolos de cada planta jovem, com cinco repetições em cada tratamento. Os dados foram obtidos por volta das 11 horas, com pouca presença de nuvens, efetuados no nível da superfície foliar, com auxílio do aparelho IRGA (analisador automático de fotossíntese) modelo Licor LI 6400XT, equipamento portátil, por meio do qual a dinâmica da folha é medida em tempo real e as trocas gasosas (fotossíntese líquida) são analisadas por infravermelho. A área foliar foi medida em cinco folhas por planta e cinco plantas por tratamento, utilizando-se um integrador de área foliar (LICOR, modelo LI-3100). As três telas coloridas têm espectros de transmitância distintos na faixa visível, com densidade da malha de 50% de sombreamento na região da radiação fotossinteticamente ativa. O espectro típico da tela azul apresenta um pico principal de transmitância na região do azul-verde (400-540 nm), enquanto a tela vermelha tem maior transmitância além de 590 nm (OREN-SHAMIR et al., 2001)

2.3 Procedimentos laboratoriais e coleta de dados

Os folíolos foram fixados em FAA e álcool 70% aquoso (KRAUS; ARDUIN, 1997). Foram realizados testes histoquímicos para detectar a presença de lipídeos, cristais de oxalato de cálcio e grãos de amido e, a partir de cortes feitos à mão-livre com auxílio de lâmina de aço, foram preparadas lâminas histológicas semipermanentes, coradas com safrablau 1% aquoso, montadas em água glicerizada entre lâmina e lamínulas e fixadas com esmalte incolor (JOHANSEN, 1940). Para as descrições anatômicas, seguiu-se a nomenclatura de acordo com Apezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2006), Esaú (1972) e Fahn (1979) foram avaliados os seguintes dados: frequência estomática, razão

dos diâmetros polar/equatorial de estômatos, área foliar; espessura do limbo foliar, da epiderme adaxial, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso e da epiderme abaxial; densidade e diâmetro polar e equatorial das cavidades secretoras e dos feixes vasculares da nervura central e biomassa seca da parte aérea, da parte subterrânea. A radiação fotossinteticamente ativa foi medida sob malhas coloridas (50%) de sombreamento, malhas pretas (50% e 70%) de sombreamento e a pleno sol. As contagens de estômatos foram obtidas em área de 0,017 mm² e as mensurações, em µm. A área do limbo foliar para a contagem das cavidades secretoras foi de 0,3 mm² e todas as demais variáveis foram analisadas e fotografadas com auxílio do programa Sigma Pro 5.0. A biomassa seca da parte aérea e da parte subterrânea foi obtida quando a monitoração da secagem em estufaa indicou peso constante, verificados a partir de pesagens, com auxílio de balança analítica com quatro casas decimais.

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou análise de regressão, utilizando o software SISVAR versão 4.3 (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura, a intensidade e a qualidade de luz exerceram influência significativa nos diversos aspectos observados. Suas consequências tornaram-se visíveis na anatomia e na morfologia dos órgãos, especialmente na folha, cujas alterações fotossintéticas resultaram no desenvolvimento dos tecidos e na variação da biomassa seca de partes aéreas e subterrâneas de plantas jovens de *C. langsdorffii*.

3.1 Efeito do estresse térmico sobre a morfologia externa e a biomassa seca

Decorrido o período de 120 dias, as plantas jovens provenientes dos diferentes tratamentos revelaram características morfológicas peculiares e conspícuas em todos os órgãos avaliados. O efeito da temperatura influenciou a morfologia em âmbito foliar caulinar e radicular (Figuras 7 e 8), sobretudo o sistema radicular, cuja variação no comprimento da raiz principal atingiu aproximadamente 25 cm (Figura 8).

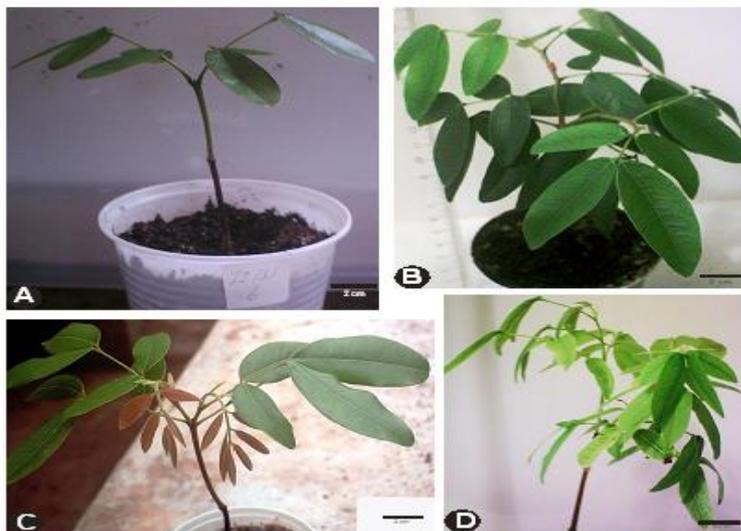


Figura 7 Plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, com desenvolvimento da parte aérea em 120 dias, sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$: A – em BOD a 15°C ; B – em BOD a 25°C ; C – em Casa de vegetação a 29°C ; D – em BOD a 35°C



Figura 8 Plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, desenvolvimento do sistema radicular em 120 dias, sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$: A – em BOD a 15°C ; B – em BOD a 25°C ; C – em casa de vegetação a 29°C ; D – em BOD a 35°C

As plantas jovens submetidas à temperatura de 15°C praticamente não apresentaram crescimento em altura, sendo o menor crescimento entre os tratamentos, com apenas 1 a 2 mm de crescimento e sem emissão de novas folhas e ramos. Folhas mais coriáceas e a coloração em tons de verde mais escuro foram as evidências morfológicas mais destacadas (Figura 7-A, Tabela 3).

Das diferentes condições de temperatura testadas, o melhor desempenho ocorreu nas mudas conduzidas em BOD a 25°C (Figuras 7-B e 8-B), que apresentaram as melhores condições morfológicas, com crescimento regular e mais vigoroso, emissões de ramos e folhas bem desenvolvidas. O mesmo ocorreu com o sistema radicular, que atingiu o maior desenvolvimento com relação ao controle e demais tratamentos.

Na casa de vegetação, onde permaneceram as testemunhas, cuja temperatura média foi de 29°C, as plantas jovens também apresentaram crescimento regular em todos os órgãos, porém, com menos emissão de ramos e folhas (Figuras 7-C e 8-C).

Nas plantas jovens desenvolvidas na BOD de 35°C (Figuras 7-D e 8-D) houve destacado crescimento em altura e grande número de novos ramos e folhas. Entretanto, o caule se desenvolveu muito em altura, tornando-se delgado e lateralmente achatado. As raízes atrofiaram e não atingiram crescimento satisfatório. Quanto às folhas, elas não atingiram o desenvolvimento esperado, apresentando a menor área foliar, consistência mais membranácea e em tons de verde mais claro que o das folhas das plantas jovens testemunhas.

Tabela 3 Médias obtidas a partir das variações morfológicas nas folhas, caules, raízes e biomassa seca de *Copaifera langsdorffii*, nos diferentes tratamentos: área foliar (AF) em (cm²), altura da planta jovem (AP) em (cm), comprimento da raiz (CR) em (cm), biomassa seca da parte subterrânea (BSS) e biomassa seca da parte aérea (BSA) em (mg)

| Variáveis | Tratamentos com variação de temperatura ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) | | | | CV (%) |
|-----------------------|---|------------|------------|------------|--------|
| | T0 (29 °C) | T1 (15 °C) | T2 (25 °C) | T3 (35 °C) | |
| AF (cm ²) | 3,26 | 3,35 | 5,20 | 1,43 | 20,58 |
| AP (cm) | 12,34 a | 8,98 b | 14,58 a | 15,56 a | 18,21 |
| CR (cm) | 19,22 a | 2,82 b | 19,42 a | 3,08 b | 37,07 |
| BSS (mg) | 0,05 | 0,05 | 0,21 | 0,03 | 41,11 |
| BSA (mg) | 0,37 | 0,29 | 0,54 | 0,29 | 26,34 |

Média seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Com dados da AF, BSS e BSA, foi realizada análise de regressão.

Apesar de não ter ocorrido emissão de novas folhas nas plantas jovens conduzidas na BOD de 15°C, o único par de folhas atingiu seu maior desenvolvimento e permaneceu na planta jovem até o final do experimento. A menor área foliar foi observada na BOD de 35°C e a maior, na BOD de 25°C (Tabela 3). Dessa forma, tanto a condição de 15°C quanto a de 35°C não deve ser utilizada para a produção de mudas destinadas ao cultivo em campo.

Quando ajustada a equação a partir da análise de regressão, pode-se estimar uma área foliar máxima de 4,82 cm², sob temperatura de 22,71°C, observando-se que, nesses intervalos, a área foliar não foi diretamente relacionada à variação da temperatura, com coeficiente de determinação de 90% (Gráfico 1).

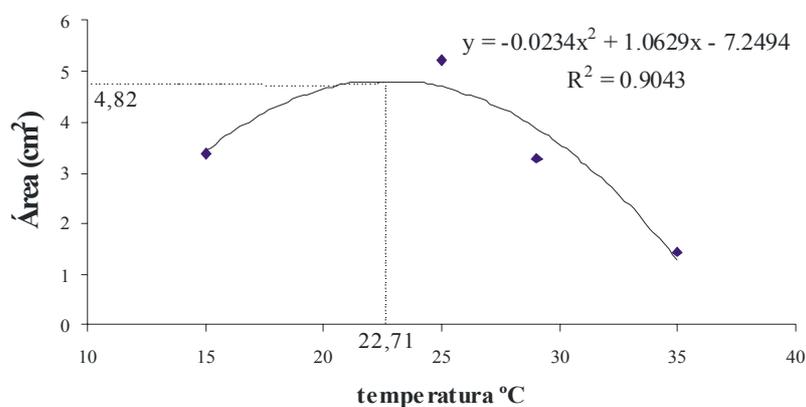


Gráfico 1 Análise de regressão da área foliar (cm²) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, em função da temperatura

A média da altura das plantas jovens entre os tratamentos apresentou diferença significativa, observando-se que, nesses intervalos, a altura das plantas jovens aumentou de acordo com a elevação da temperatura. Entretanto, as folhas e as raízes não cresceram nas mesmas proporcionalidades, comprometendo, assim, o vigor e a sobrevivência das plantas jovens.

As raízes apresentaram diferenças significativas e chegaram a medir, em média, 19,42 cm de comprimento a 25°C, contrastando com os tratamentos de 15°C, com 8,98 cm e 35°C, com 15,56 cm (Tabela 3).

As variações no sistema radicular, na planta jovem, são, certamente, fatores que influenciam o estabelecimento da planta no campo. Alguns autores têm demonstrado que restrições ao sistema radicular de mudas podem apresentar sérias deformações radiculares após o plantio e menores taxas de crescimento inicial da parte aérea no campo (BARROSO et al., 2000; FREITAS, 2003; FREITAS et al., 2005; NOVAES et al., 2002), acarretando perdas de produtividade.

O crescimento do sistema radicular, como nos demais órgãos, está diretamente relacionado com as taxas fotossintéticas, conforme resultados

observados por Lima et al. (2006), para a espécie *Cupania vernalis* Camb. No presente trabalho, as taxas fotossintéticas foram influenciadas pelas temperaturas de 15°C e 35°C, comprometendo, possivelmente, o crescimento de toda planta jovem.

O tratamento sob BOD 25°C favoreceu significativamente a biomassa seca da parte subterrânea e aérea das plantas jovens cultivadas sob diferentes temperaturas (Tabela 3). A partir da análise de regressão, pode-se estimar maior produção de biomassa seca da raiz sob 23,08°C e biomassa seca do caule e folhas sob 24,03°C (Gráficos 2 e 3). Esse melhor desempenho deve-se, possivelmente, à temperatura mais adequada à realização dos processos fisiológicos e reações bioquímicas indispensáveis ao crescimento da planta.

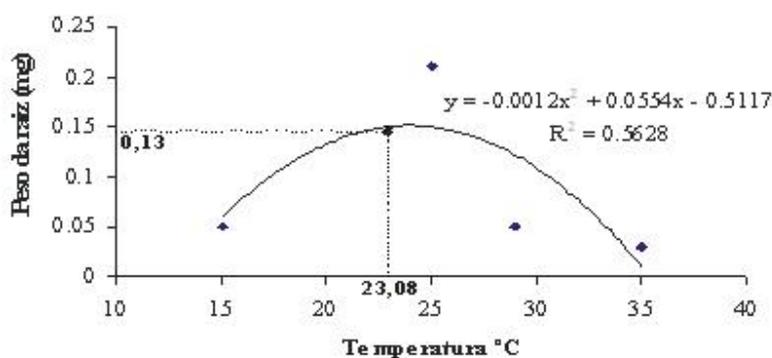


Gráfico 2 Biomassa seca da raiz (mg) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, em função da temperatura

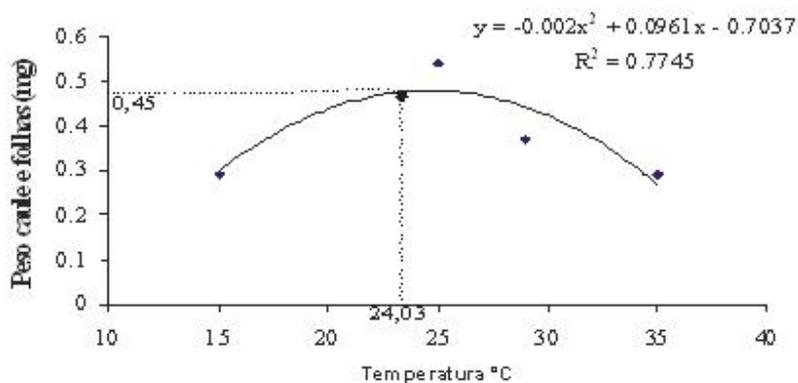


Gráfico 3 Biomassa seca do caule e das folhas (mg) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, em função da temperatura

5.2 Efeito do estresse térmico sobre a superfície foliar

A frequência estomática por área foliar aumentou de acordo com a elevação da temperatura, com exceção das folhas do tratamento a 25°C que, embora tenham apresentado boas condições morfológicas, apresentaram frequência estomática menor que nos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 4 Média de contagens obtidas na superfície foliar de *Copaifera langsdorffii*, referentes à frequência estomática (FE) e mensurações micrométricas dos estômatos (μm): diâmetro polar do estômato (DpE), diâmetro equatorial do estômato (DeE) e relação entre o diâmetro polar e equatorial (RDpe)

| Variáveis | Tratamentos com variação de temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$) | | | | CV (%) |
|-----------|---|------------|------------|------------|--------|
| | T0 (29 °C) | T1 (15 °C) | T2 (25 °C) | T3 (35 °C) | |
| FE | 19,68 | 12,36 | 11,04 | 21,68 | 10,72 |
| DpE | 43,72 a | 37,89 b | 35,08 c | 34,85 c | 5,52 |
| DeE | 32,96 a | 26,53 b | 28,68 b | 31,21 a | 4,88 |
| RDpe | 1,34 b | 1,43 a | 1,23 c | 1,12 d | 4,58 |
| FE | 19,68 | 12,36 | 11,04 | 21,68 | 10,72 |

Média seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Com os dados da FE, foi realizada análise de regressão

A frequência estomática foi a variável mais sensível aos efeitos da temperatura e apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, tendo a maior frequência sido atingida na temperatura mais alta (35°C) (Figura 9-D) e a menor, sob temperatura de 25°C (Figura 9-A). Apesar de as plantas jovens responderem ao estresse térmico a 35°C, com o aumento do número de estômatos e com o maior desenvolvimento em altura. Isso não favorece o estabelecimento das mesmas no campo, pois se trata de respostas morfoanatômicas imediatas para a sobrevivência da mesma, porém instáveis, o que comprometeria o estabelecimento da planta, quando do seu replantio no ambiente natural.

A partir da análise de regressão, pode-se estimar a frequência estomática de 11,76 estômatos por área foliar à temperatura de 17,47°C (Gráfico 4), sem, contudo, haver correlação direta entre o número de estômatos e o melhor desempenho no desenvolvimento geral da planta jovem (Tabela 5, Figura 9).

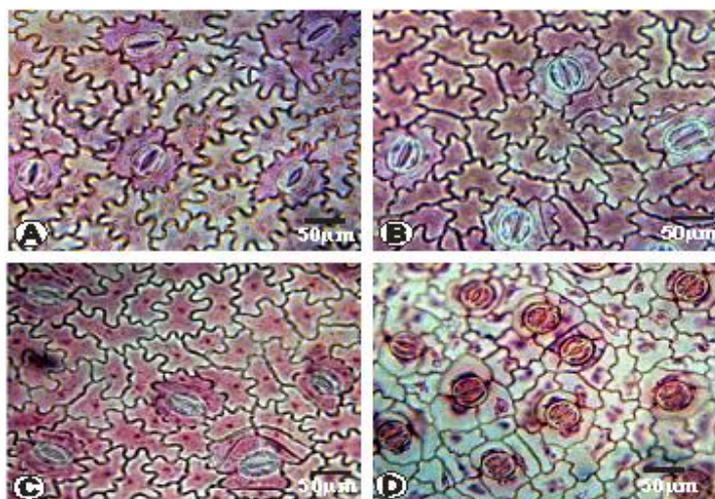


Figura 9 Superfície epidérmica abaxial da folha de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, desenvolvidas sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$: A – em BOD a 15°C; B – em BOD a 25°C; C – em casa de vegetação a 29°C; D – em BOD a 35°C

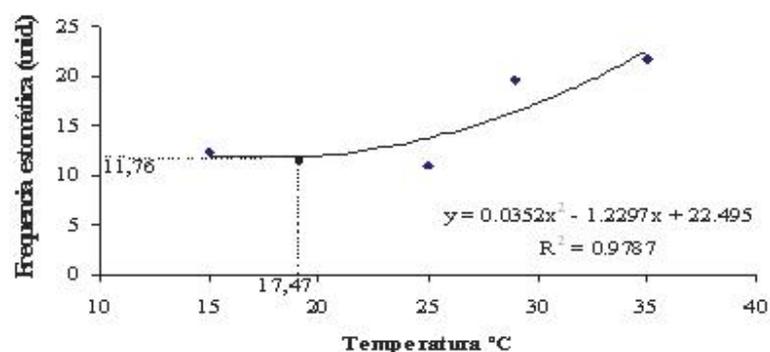


Gráfico 4 Frequência estomática (unid./área) em plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, em função da temperatura

Diferenças significativas foram detectadas nas dimensões estomáticas, nos diâmetros polar e equatorial, nos diferentes tratamentos. Porém, outros fatores estão envolvidos no desenvolvimento da planta. Isso pode ser confirmado no presente estudo com relação às plantas jovens conduzidas sob 29°C e a 15°C, que não apresentaram o maior crescimento, mas apresentaram os maiores estômatos (Tabela 5, Figura 9-C). Pode-se inferir que, embora as dimensões e a frequência estomática influenciem os processos fisiológicos da planta, outros tecidos, como o parênquima paliçádico, que é o principal tecido clorofiliano, cuja maior espessura foi atingida sob temperatura de 25°C e 29°C, podem apresentar contribuição mais efetiva no desenvolvimento geral da planta.

5.3 Efeito do estresse térmico sobre o mesófilo

O efeito do estresse térmico influenciou na variação significativa da espessura do limbo foliar, cuja maior espessura foi observada no controle a 29°C, seguido do tratamento a 25°C e as menores medidas ocorreram sob as temperaturas extremas de 15°C e de 35°C (Tabela 5). Temperaturas próximas desses extremos indicam situação de estresse para a espécie em estudo.

Tabela 5 Medidas da espessura média (μm) de folhas de *Copaifera langsdorffii* sob estresse térmico da epiderme adaxial (EpAd), parênquimapaliádico PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (EpAb) e limbo foliar (LF)

| Variáveis | Tratamentos com variação de temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$) | | | | CV (%) |
|-----------|---|-----------|-----------|-----------|--------|
| | TO (29°C) | T1 (15°C) | T2 (25°C) | T3 (35°C) | |
| EpAd | 19,68 c | 31,20 a | 32,56 a | 23,68 b | 12,95 |
| PP | 144,36 a | 70,64 c | 121,80 b | 79,57 c | 7,97 |
| PE | 231,67 a | 149,28 c | 197,88 b | 142,18 c | 13,07 |
| EpAb | 32,89 a | 29,56 a | 30,52 a | 29,16 a | 11,54 |
| LF | 428,60 a | 280,68 c | 382,76 b | 274,59 c | 5,68 |

Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

A espessura da epiderme na face adaxial é significativamente diferente entre os experimentos, cuja maior espessura foi verificada na BOD a 25°C e semelhante quanto à espessura na face abaxial (Figura 10).

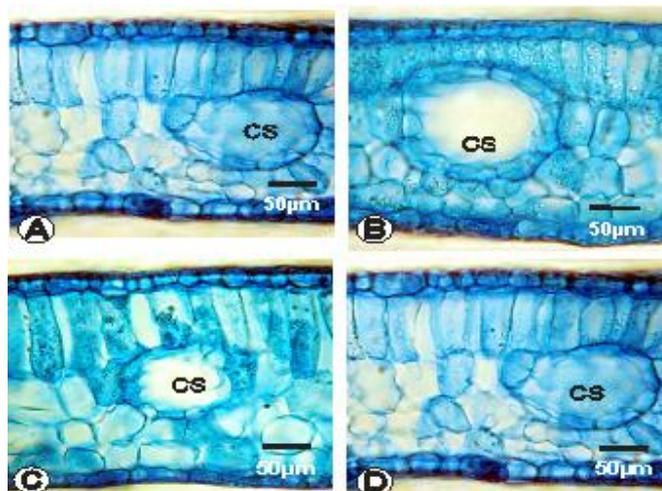


Figura 10 Mesofilo de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, desenvolvidas sob diferentes temperaturas com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$: A – em BOD a 15°C; B – em BOD a 25°C; C – em casa de vegetação a 29°C; D – em BOD a 35°C

Quanto aos parênquimas paliádico, esponjoso e limbo foliar, há evidente variação na espessura, sendo, todavia, menor nos tratamentos a 15°C e 35°C (Figuras 10-A e 10-D), e maiores no tratamento a 25°C e no controle a 29°C (Figuras 10-B e 10-C). Tais resultados estão de acordo com Metcalfe e Chalk (1983), cujo crescimento e organização da lâmina foliar são altamente influenciados por fatores ambientais, como a temperatura, a intensidade de luz e a disponibilidade de água.

Azevedo (2003) ao realizar estudo comparativo sobre o desenvolvimento foliar de espécies cultivadas *in vitro*, em sala de crescimento e no campo, ressaltou o maior crescimento em espessura do parênquima paliádico e lacunoso para as amostras de *C. langsdorffii* cultivadas no campo. De acordo com análise de variância, o maior crescimento em espessura foliar foi estimado para plantas jovens cultivadas em BOD (25°C), destacando-se como ambiente propício para um maior desenvolvimento inicial de mudas dessa espécie.

5.4 Efeito do estresse térmico sobre as estruturas secretoras e nervura central

O diâmetro polar e equatorial das cavidades secretoras de óleo apresentou diferenças significativas, de acordo com o teste de Tukey, como se observa na Tabela 6.

O controle a 29°C e o tratamento a 25°C apresentaram os maiores diâmetros polar e equatorial das cavidades secretoras de óleo e, nas temperaturas de 35°C e 15°C, foram menores diâmetros (Tabela 4). Na nervura central, os feixes vasculares mostraram-se ligeiramente diferentes quanto ao diâmetro polar e equatorial, com destaque apenas para o tratamento a 29°C (Tabela 6).

Tabela 6 Médias obtidas das cavidades secretoras de óleo na folha, em μm : diâmetro polar (DpCs), diâmetro equatorial (DeCs), e nervura central: diâmetro polar (DpNc) e diâmetro equatorial (DeNc) de *Copaifera langsdorffii* sob estresse térmico

| Variáveis | Tratamentos com variação de temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$) | | | | |
|-------------|---|------------|------------|------------|--------|
| | T0 (29 °C) | T1 (15 °C) | T2 (25 °C) | T3 (35 °C) | CV (%) |
| DpCs | 211,60 a | 133,60 b | 200,45 a | 123,41 b | 14,31 |
| DeCs | 232,10 a | 176,52 b | 206,72 a | 133,33 b | 21,63 |
| DpNc | 307,25 a | 149,53 b | 155,26 b | 133,74 b | 8,73 |
| DeNc | 331,90 a | 193,01 bc | 225,62 b | 160,69 c | 14,37 |
| DpCs | 211,60 a | 133,60 b | 200,45 a | 123,41 b | 14,31 |

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

De acordo com Larcher (2000), o estresse é um desvio significativo das condições ótimas para a vida, ou seja, é tudo que desvia a planta das condições ideais de crescimento e desenvolvimento, tanto para mais como para menos. No presente trabalho, essa situação de estresse foi verificada à temperatura de 15°C e de 35°C, cujos efeitos foram percebidos em âmbito morfológico, anatômico e na biomassa seca.

Para um determinado fator estressante, cada planta tem um limite de tolerância, podendo variar entre espécies ou entre genótipos de uma mesma espécie e entre fases fenológicas de um mesmo genótipo (SAMALLWOOD; CALVERT; BOWLES, 1999). Para a espécie em estudo, o efeito da temperatura exerceu grandes transformações para, aproximadamente, 90% das plantas jovens em cada tratamento, especialmente nas BODs de 15°C e 35°C.

Apesar da paralisação do crescimento nas plantas jovens conduzidas a 15°C, elas sobreviveram após o período de 120 dias. De acordo com e St. John e Christiansen (1976), a ocorrência de frio após emissão da radícula e nos primeiros estádios de desenvolvimento afeta o crescimento inicial e causa vazamento de metabólitos por meio da membrana; interferência na produção de ATP; decréscimo na síntese de proteínas e de ácido nucleico e alterações no

tamanho e na forma das primeiras folhas. Esses efeitos em âmbito foliar foram os mais evidentes na BOD de 35°C o que, possivelmente, confirma a ocorrência dos demais eventos destacados pelo autor acima.

Para algodoeiro, a temperatura acima de 32°C diminuiu a fotossíntese bruta, o tamanho da maçã e o comprimento de fibra e tornou mais lento o enchimento das maçãs (YFOULIS; FASOULAS, 1978). De acordo com e Reddy, Hodges e Reddy (1992), acima de 35°C, o número de flores e de frutos formados foi afetado. Para a espécie em estudo, por se tratar de plantas jovens nos primeiros meses de crescimento, os efeitos principais foram manifestados no pequeno tamanho e na coloração mais clara das folhas, pelo aumento do número de estômatos, na diminuição da espessura do parênquima paliçádico, esponjoso e do limbo foliar em geral, afetando, ainda, a diminuição do tamanho dos estômatos e das cavidades secretoras de óleo.

De acordo com Hall (1992), sob temperaturas elevadas, foram observados incremento de biomassa, aumento na taxa de transpiração, alongamento excessivo de entrenós, autossombreamento e alterações na partição de fotoassimilados em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Efeitos semelhantes foram observados no presente trabalho, no qual o alongamento dos entrenós e o achatamento lateral do caule tornaram-se bem visíveis nas plantas jovens conduzidas em BOD a 35°C.

5.5 Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre a biomassa seca

De acordo com Recieri et al. (2002), a intensidade média de radiação incidente é maior no mês de março, no período do equinócio, quando a radiação solar difusa apresenta valores relativamente altos. Os níveis de radiação fotossinteticamente ativa foram medidos na superfície foliar em cada tratamento, cujas médias foram significativamente diferentes: 707,20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a pleno

sol; 436,60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob malha azul (50%); 342,60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob malha vermelha (50%); 215,60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob malha preta (50%) e 147,60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob malha preta (70%) de sombreamento.

A maior biomassa seca da parte aérea ocorreu sob malha vermelha e da raiz sob malha azul, ambas sob sombreamento de 50%, corroborando os resultados de Chapin et al. (1987), Lima et al. (2006) e Oliveira et al. (2007). Diferenças significativas na produção de biomassa seca estão registradas na literatura para espécies florestais por Almeida et al. (2005), confirmadas com a espécie em estudo sob diferentes quantidades luminosas e também sob a mesma intensidade, em diferentes qualidades de luz, sob malhas verde, vermelha e azul (Tabela 7).

Tabela 7 Biomassa seca da parte aérea (BSA) e da parte raiz (BSS) de plantas jovens de *Copaifera langsdorffii*, após cultivo a pleno sol, sob malhas vermelha, azul e preta com 50% e 70% de sombreamento

| Tratamentos | BSA (g) | BSS (g) | BSA /BSS (g) |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| Pleno sol 100% | 0,98 b | 0,70 b | 1,40 ab |
| Malha vermelha (50%) | 1,88 a | 1,10 ab | 1,71 a |
| Malha azul (50%) | 1,64 ab | 1,38 a | 1,18 b |
| Malha preta (50%) | 1,42 ab | 0,88 b | 1,61 a |
| Malha preta (70%) | 1,30 ab | 1,04 ab | 1,25 b |
| CV(%) | 27,21 | 23,49 | 23,00 |

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

O aumento da irradiância, de acordo com Colares e Seeliger (2006), para a espécie *Ruppia marítima* L., espécie adaptada a altas irradiâncias, aumentou a produção de folhas e biomassa seca. Esse comportamento não foi evidenciado no presente trabalho para irradiâncias extremas, possivelmente por se tratar de espécie florestal clímax tolerante à sombra, cujo ambiente natural de sua regeneração, conforme Lorenzi (2002), é parcialmente sombreado.

A variação espectral e a sua qualidade influenciaram a produção de biomassa seca, tanto da parte aérea quanto da subterrânea, sendo, então, verificados os melhores desempenhos no desenvolvimento da biomassa aérea, sob malhas vermelha e azul. O maior equilíbrio foi alcançado no desenvolvimento da biomassa aérea e subterrânea sob malha azul, com valores medianos de irradiância em ambos os tratamentos. Kawabata et al. (2007) também evidenciaram maior produção de biomassa seca para espécies *Dracaena marginata* Lam. sob malha vermelha. O controle a pleno sol apresentou a menor biomassa seca, tanto da parte aérea quanto da raiz.

5.6 Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre a superfície foliar

Na superfície foliar, as telas coloridas exerceram influência significativa sobre a frequência estomática e a razão do diâmetro polar e equatorial, que foi menor sob malha verde e maior sob malha vermelha. Quanto à área foliar, também foram observadas diferenças significativas, sendo a menor área registrada para as folhas de plantas jovens a pleno sol e a maior área sob malha azul (Tabela 8 e Figura 11).

Tabela 8 Frequência estomática (FE), diâmetro polar (Dp), diâmetro equatorial (De), razão entre os diâmetros polar/equatorial de estômatos (RDpe) e área foliar de *Copaifera langsdorffii*, após cultivo em pleno sol, malhas coloridas e malhas preta

| Tratamentos | FE | DP (μm) | DE (μm) | RDpe | Área foliar |
|-------------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------|---------------|
| Pleno sol 100% | 15,68 b | 34,13 b | 26,75 b | 1,13 cd | 2,83 c |
| Malha verm. (50%) | 19,72 a | 40,89 a | 32,63 a | 1,35 a | 3,51 b |
| Malha azul (50%) | 19,52 a | 38,56 a | 32,81 a | 1,31 ab | 3,92 a |
| Malha preta (50%) | 15,56 b | 37,10 ab | 29,47 ab | 1,06 d | 3,38 b |
| Malha preta (70%) | 18,80 a | 38,79 a | 32,41 a | 1,21 bc | 3,23 b |
| CV(%) | 7,98 | 6,09 | 7,04 | 4,55 | 4,40 |

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

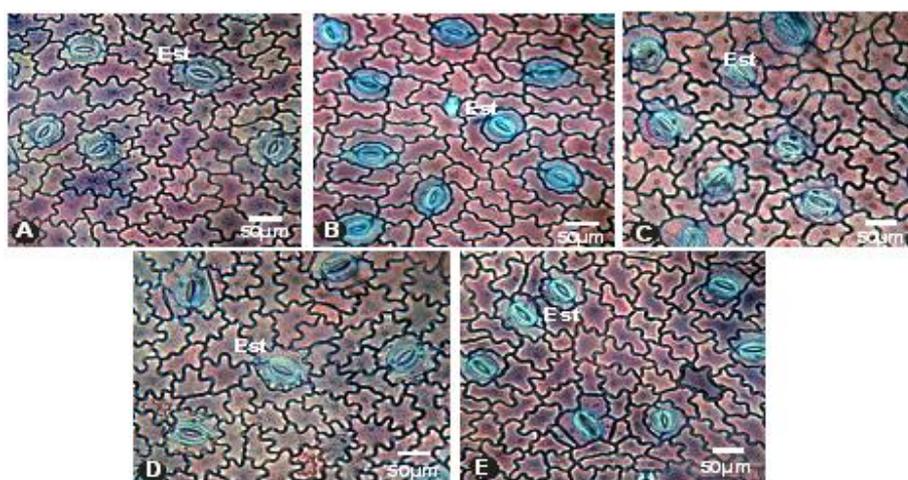


Figura 11 Superfície foliar de *Copaifera langsdorffii*, densidade dos estômatos (Est.). Plantas jovens: A – a pleno sol; B – sob malha vermelha; C – sob malha azul; D – sob malha preta com 50% e E – sob malha preta com 70% de sombreamento

Os diferentes níveis de radiação exerceram influência significativa sobre a densidade estomática e sobre a relação dos diâmetros polar e equatorial. Este resultado se assemelha ao obtido por Meirelles (2007), que observou uma densidade estomática maior em mudas de palmeira-ráfia cultivadas sob malha azul, bem como com as informações de Taiz e Zaiger (2004), que registraram a maior área foliar para diferentes plantas cultivadas sob malha azul.

5.7 Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre o mesófilo foliar

A espessura da epiderme em sua face adaxial apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo menor no controle a pleno sol e maior sob malha azul. Já em sua face abaxial, manteve a menor espessura a pleno sol e

maior sob malha verde, indicando a importância da qualidade de luz e de sua baixa intensidade $215,60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para o desenvolvimento desse tecido, nessa espécie.

Corroborando os resultados de acordo com Castro et al. (2005) e Lee et al. (2000) a altura das células do parênquima paliçádico e o número de camadas de células no parênquima esponjoso variaram de acordo com os diferentes níveis de sombreamento e quantidades de radiação incidente, indicando que tanto a intensidade quanto a qualidade da luz apresentam efeito adaptativo para esta espécie, onde o espessamento foliar é feito apenas da intensidade luminosa, uma vez que a variação da qualidade espectral da luz sob malhas coloridas, não tem a capacidade de produzir novas camadas de tecido.

O efeito da intensidade da radiação incidente promoveu diferenças significativas na espessura do limbo foliar, tendo os tratamentos a 50% e a 70% sido semelhantes entre si e apresentado maior espessura com relação ao controle a pleno sol (Tabela 9 e Figura 12).

Tabela 9 Espessura do limbo e tecidos foliares de *Copaifera langsdorffii*, sob malhas coloridas e malhas pretas. Ead – epiderme da face adaxial, PP - parênquima paliçádico, PE – parênquima esponjoso, Eab – epiderme a face abaxial

| Tratamentos | Espessura (μm) | | | |
|-----------------------|-----------------------------|----------|----------|---------|
| | Ead | PP | PE | Eab |
| Pleno sol 100% | 25,90 c | 111,11 a | 151,20 a | 23,93 b |
| Malha vermelha (50 %) | 35,44 a | 111,17 a | 163,39 a | 34,08 a |
| Malha azul (50 %) | 35,12 a | 104,57 a | 170,91 a | 35,88 a |
| Malha preta (50 %) | 30,92 b | 99,89 a | 161,91 a | 32,50 a |
| Malha preta (70 %) | 35,08 a | 99,68 a | 168,16 a | 33,64 a |
| CV(%) | 4,84 | 9,50 | 7,91 | 5,93 |

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

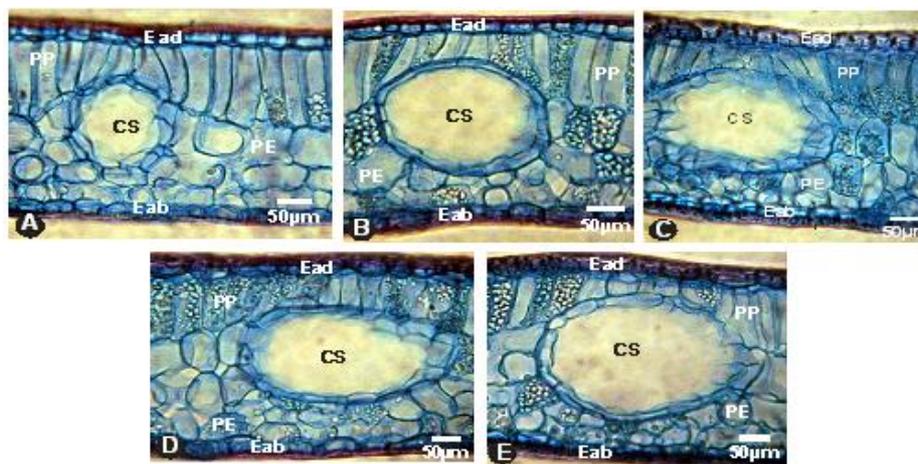


Figura 12 Mesofilo de *Copaifera langsdorffii*, epiderme adaxial (Ead), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (Eab) e as cavidades secretoras de óleo-resina (CS). Plantas jovens: A – a pleno sol, B – sob malha vermelha, C – sob malha azul, D – sob malha preta com 50% e E – sob malha preta com 70% de sombreamento

Resultados semelhantes foram obtidos por Castro et al. (2007) para a espécie *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker, sob malha colorida, com diferenças significativas, tendo o maior comprimento das células do parênquima paliçádico propiciado maior espessura ao limbo foliar. Esse resultado reforça a importância da utilização de malhas coloridas, que estabelecem a qualidade mais adequada da radiação luminosa na produção de mudas dessa espécie, o que, possivelmente, assemelha-se aos ambientes de sub-bosque onde elas se desenvolvem naturalmente. Porém, sob malha preta com sombreamento de 70%, foi registrada a menor intensidade luminosa, que propiciou diminuição no crescimento geral da planta, influenciando a biomassa seca da parte aérea e da raiz. Resultados diferentes foram descritos por Alvarenga et al. (2003) para a espécie florestal *Croton urucurana* Baill, espécie pioneira que atingiu as maiores

taxas fotossintéticas e maior crescimento a pleno sol, quando comparada a outras espécies florestais.

5.8 Efeito de diferentes intensidades e qualidade de luz sobre as estruturas secretoras e a nervura central

O desenvolvimento dos feixes vasculares da nervura central foi semelhante em todos os tratamentos, diferindo apenas do controle, a pleno sol, cujo diâmetro polar e equatorial foi menor que nos demais tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10 Frequência e diâmetro das cavidades secretoras e dos feixes vasculares da nervura central da folha de *Copaifera langsdorffii*, sob malhas coloridas e malhas pretas. FCs = densidade de cavidades secretoras; DpCs e DeCs = diâmetro polar e equatorial da cavidade secretora; DpFv e DeFv = diâmetro polar e equatorial do feixe vascular

| Tratamentos | Diâmetro (μm) | | | | |
|-----------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | FCs(μm^2) | DpCs | DeCs | DpFv | DeFv |
| Pleno sol 100 % | 14,60 ba | 137,82 b | 143,34 b | 156,47 b | 195,57 b |
| Malha vermelha (50 %) | 16,12 a | 173,54 a | 192,67 a | 209,60 ba | 264,00 a |
| Malha azul (50 %) | 11,48 b | 126,43 b | 199,99 a | 205,88 ba | 251,36 a |
| Malha preta (50 %) | 14,76 ab | 76,34 c | 219,69 a | 225,20 a | 265,60 a |
| Malha preta (70 %) | 15,48 ab | 129,44 b | 215,43 a | 204,31 ba | 261,60 a |
| CV(%) | 15,83 | 14,20 | 12,65 | 14,25 | 11,18 |

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As cavidades secretoras apresentaram diferentes formas, tamanhos, frequência e distribuição entre as plantas jovens nos diferentes tratamentos. A frequência de cavidades secretoras sob os diferentes níveis de sombreamento, pleno sol e malhas pretas (50% e 70%), não apresentaram diferenças significativas.

O efeito promovido pela variação da qualidade de luz sob malhas coloridas, azul, vermelha e verde, interferiu significativamente na densidade de

cavidades secretoras. A menor frequência foi de 11,48 cavidades secretoras por 0.3 mm^2 , sob malha azul e a maior foi de 16,12 cavidades secretoras sob malha vermelha (Tabela 10).

A intensidade e a qualidade de luz afetam de forma inequívoca as características de crescimento, área foliar, espessura do limbo, biomassa seca da parte aérea e da raiz, demonstrando plasticidade fenotípica de plantas jovens de *C.langsdorffii*, quando submetidas a diferentes níveis de sombreamento. A radiação fotossinteticamente ativa mais apropriada ao desenvolvimento da espécie ocorre sob malha azul.

6 CONCLUSÕES

Trata-se de uma espécie com ampla plasticidade anatômica. Os ambientes controlados com diferentes faixas de temperatura podem proporcionar profundas alterações na anatomia foliar de *Copaifera langsdorffii*. Essas alterações manifestam-se em níveis morfológicos e na produção de biomassa. Embora tenham ocorrido similaridades entre os resultados obtidos nas temperaturas de 25°C e 29°C, as mudas de *C. langsdorffii* cultivadas na temperatura de 25°C destacam-se pela formação de plantas jovens mais vigorosas, caracterizadas pelas melhores condições morfoanatômicas e maior acúmulo de biomassa. Nas temperaturas extremas, as plantas jovens expressaram sinais de estresse térmico pela paralisação do crescimento à temperatura de 15°C e pelo crescimento desregulado na temperatura de 35°C. A submissão das plantas jovens a ambientes controlados com temperatura de 25°C pode ser utilizada como estratégia para a produção de mudas com boas condições para o plantio no campo.

Sob diferentes intensidades e qualidade de luz, o melhor desempenho no cultivo de plantas jovens de *C. langsdorffii* ocorreu sob malha azul, com sombreamento de 50%.

As malhas coloridas interferem na densidade e nos diâmetros equatorial e polar das cavidades secretoras das folhas. Quanto às intensidades de luz avaliadas, não foram observadas diferenças significativas para a densidade das cavidades secretoras.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. M. Z. et al. Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, jan./fev. 2005.
- ALVARENGA, A. A. et al. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p. 53-57, 2003.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006, 438 p.
- AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- BARROSO, D. G. et al. Efeitos do recipiente sobre o desempenho pós-plantio de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 24, n. 3, p. 291-296, 2000.
- CASTRO, E. M. et al. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 8-16, 2007.
- CASTRO, E. M. et al. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a fotoperíodos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 846-850, jul./ set. 2005.
- CASTRO, E. M.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber): obtenção de plantas jovens assépticas para iniciar a micropropagação. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Curitiba, n. 27, p. 58-61, jul./ago. 2002.
- CHAPIN, F. S. et al. Interaction of environmental factors in the control of plant growth. **BioScience**, Califórnia, v. 37, p. 49-57, 1987.

- COLARES, I. G.; SEELIGER, U. Influência da luz sobre o crescimento e a produção de biomassa de *Ruppia maritima* L. em cultivo experimental. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 20 n. 1, jan./mar. 2006.
- COSTA, L. B. C. et al. Aspectos da anatomia foliar de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae) em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 6-8, jul. 2007. Supl. 1.
- ESAÚ, K. **Anatomia vegetal**. Barcelona, Ômega: 1972. 778 p.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic, 1979. 302 p.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2000.
- FREITAS, T. A. S. **Sistemas de blocos prensados para produção de mudas clonais de eucalipto**. 2003. 115 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Campo dos Goytacazes, 2003.
- FREITAS, T. A. S. et al. Desempenho radicular de mudas de eucalipto produzidas em diferentes recipientes e substratos. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 6, p. 853-861, 2005.
- HALL, A. E. Breeding for heat tolerance. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 10, n. 1, p. 129-168, 1992.
- HARBORNE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4th ed. London: Academic, 1993. 318 p.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. Bombay: McGraw-Hill, 1940. 532 p.
- KAWABATA, A. M. et al. Effects of photosensitive shade cloths on potted *Dracaena deremensis* 'Janet Craig' and *Dracaena marginata* 'Colorama'. **Journal of Hawaiian and Pacific Agriculture**, Hawaii, v. 14, p. 49-54, 2007.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.

LEE, D. W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian Hopea (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

LIMA, E. C. et al. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 351 p. v. 1.

MARTINS, J. R. et al. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 82-87, 2009.

MEIRELES, A. J. A. Desenvolvimento de mudas de palmeira - ráfia cultivada sob diferentes sombreamentos e nutrição foliar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1884-1887, 2007.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**. 2nd ed. Oxford: Clarendon, 1983. 297 p. v. 2.

NOVAES, A. B. et al. Comportamento de mudas de *Pinus taeda* produzidas em raiz nua e em dois tipos de recipientes, 24 meses após o plantio. **Floresta**, Curitiba, v. 31, p. 62-71, 2002.

OLIVEIRA, M. I. et al. Crescimento e teor de óleo essencial de plantas jovens de artemisia vulgaris submetidas a diferentes condições de radiação. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 2007.

OREN-SHAMIR, M. et al. Colored shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, England, v. 76, n. 3, p. 353-361, 2001.

RECIERI, R. P. et al. Modelos de estimativa da radiação solar difusa. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE GERAÇÃO DISTRIBUÍDA E ENERGIA NO MEIO RURAL, 2., 2002, Campinas. **Anais...** Cmpinas: Agrener, 2002.

REDDY, K. R.; HODGES, H. F.; REDDY, V. R. Temperature effects on cotton fruit retention. **Agronomy Journal**, New York, v. 84, p. 26-30, 1992.

SAMALLWOOD, M. F.; CALVERT, C. M.; BOWLES, D. J. **Plant responses to environmental stress**. New York: Bios Scientific, 1999. 224 p.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1035-1042, set./out., 2001.

SANTOS JÚNIOR, N. A. **Estabelecimento inicial de espécies florestais nativas em sistema de semeadura direta**. 2000. 96 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SOUZA, C. C. **Estabelecimento e crescimento inicial de espécies florestais em plantios de recuperação de Matas de Galeria do Distrito Federal**. 2002. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

ST. JOHN, J. B.; CHRISTIANSEN, M. N. Inhibition of linolenic acid synthesis and modification of chilling resistance in cotton seedlings. **Plant Physiology**, Massachusetts, v. 57, p. 257-259, 1976.

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

YFOULIS, A.; FASOULAS, A. Role of minimum and maximum environmental temperature on maturation period of the cotton boll. **Agronomy Journal**, Madison, v. 70, p. 421-425, 1978.

CAPÍTULO 4 Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Copaifera*
langsdorffii.

RESUMO

Os óleos essenciais das folhas, caules e pericarpos de *Copaifera langsdorffii* foram obtidos por hidrodestilação, em quatro diferentes tempos de extração e para a semente, devido à escassez de material, foi realizada apenas uma extração durante duas horas. Os óleos essenciais da semente obtidos em duas horas e das folhas, caules e pericarpos obtidos na hidrodestilação de quatro horas foram analisados por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas. As amostras botânicas foram colhidas de cinco espécimes adultos no campus da UFLA, em Lavras, MG. Os rendimentos de óleos das folhas caules e pericarpos foram calculados a partir de 240 amostras de óleos obtidos nos quatro diferentes tempos de extração. O delineamento empregado foi em blocos casualizados constituídos pelos cinco espécimes, três órgãos vegetais e quatro tratamentos representados pelos diferentes tempos de extração de 1, 2, 3 e 4 horas e aplicação de quatro repetições em cada tempo. O rendimento de óleo foi expresso em g/ 100 g e calculado com base na amostra livre de umidade, que foi determinada por dois métodos, gravimetria e destilação azeotrópica com ciclohexano. A composição química revelou diferenças nos teores dos constituintes dos óleos essenciais entre os órgãos de cada espécime e, entre os mesmos órgãos de cada espécime estudado, revelando maior ou menor similaridade entre órgãos e espécimes. Os compostos majoritários encontrados em todos os espécimes avaliados foram os sesquiterpenos δ -elemeno, α -copaeno, β -cubebeno, cipereno, β -cariofileno, germacreno D, viridifloreno, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *iso*-espatulenol, *epi*- α -muurolol, α -muurolol, α -cadinol e (2*E*, 6*E*)-farnesoato de metila. Além de terpenoides foi detectada a presença de cumarina nos óleos das sementes dos espécimes 2, 3, e 5 (8,8%, 4,0% e 11,9%, respectivamente). O maior rendimento de óleo foi observado para os pericarpos, seguido das folhas e caules em 4 horas de extração. Entretanto, se considerado proporcionalmente, o rendimento de óleo obtido da folha e do pericarpo foi maior em uma hora e o do caule, em 2 horas de extração. Concluiu-se que o tempo de extração influenciou o rendimento de óleo essencial de *C. langsdorffii*, que a determinação da umidade residual pelo método gravimétrico ou destilação azeotrópica não diferiu significativamente e que a composição química dos óleos essenciais apresentou alta variação intraespecífica.

Palavras-chave: Óleo essencial. Constituintes voláteis. Rendimento. *Copaifera langsdorffii*.

ABSTRACT

Essential oils from leaves, stems and pericarps of *Copaifera langsdorffii* were obtained by hydrodistillation in four different extraction times and the seed, due to the scarcity of an extraction was performed only for two hours. Essential oils from seed obtained in two hours and leaves, stems and pericarps obtained in four hours of hydrodistillation were analyzed by gas chromatography / mass spectrometry. The botanical samples were harvested from five adult specimens in the campus of UFLA, Lavras-MG, and yield oils obtained from leaves, stems and pericarps were calculated from 240 samples analyzed. The experiment design employed in this study was a randomized block, consisting of the five specimens, four vegetable organs and four treatments represented by different extraction times: 1, 2, 3 and 4 hours, and four applications. The oil yields were expressed in g / 100 g and calculated on the basis of the samples free of water, which was determined by two methods, gravimetric method, and azeotropic distillation using cyclohexane as solvent. The chemical composition revealed differences in the chemical composition of the essential oils from the different organs of each specimen, and between the organs from different specimens. The major compounds found in all oils were the sesquiterpenes δ -elemene, α -copaene, β -cubebene, ciperene, β -caryophyllene, germacrene D, viridiflorene, bicyclogermacrene, δ -cadinene, spathulenol, caryophyllene oxide, epoxide of humulene II, iso-spathulenol, *epi*- α -muurolol, α -muurolol, α -cadinol and (2*E*,6*E*)-farnesoato methyl. Besides terpenoids, coumarin was detected in seed oils of the specimens 2, 3, and 5 (8,8, 4,0 and 11,9 % respectively). The highest oil yield was observed for the pericarp, followed by the leaves and stems during 4 hours of extraction, however, the yield of oils obtained from leaves and pericarp were higher in 1 hour while the yield oil stem was higher in two hours of extraction. According the results we concluded that the extraction time influenced on the yield of essential oil of *C. langsdorffii* and that the determination of residual moisture by gravimetric method or azeotropic distillation no showed significantly differences, and the occurrence of high intra-specific variation in the chemical composition.

Keywords: Essential oil. Volatile constituents. Yield essential oils. *Copaifera langsdorffii*.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies produtoras de óleo-resina, *C. langsdorffii* destaca-se pela utilização de seu óleo ou produto do metabolismo secundário para os mais variados fins, seja como biocombustível (ALENCAR, 1982; MOURÃO et al., 1980; SOARES, 2008), na fabricação de vernizes e lacas (SIQUEIRA et al., 1998; VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002) e, principalmente, com propriedades medicinais e como cosmético (ALMEIDA, 2001; ARRIEL; SILVA; AMARAL, 2004; AZEVEDO; WADT; WADT, 2004; BARBOSA, 2001; BENVENUTTI, 2008; BLOISE, 2003; GRAMOSA; SILVEIRA, 2005).

O gênero *Copaifera* apresenta variação no volume de óleo-resina produzido pelos indivíduos de uma mesma espécie, o que tem sido atribuído, por alguns autores, ao tamanho e à idade da árvore (AZEVEDO; WADT; WADT, 2004), ao método de extração utilizado, à altura e ou à profundidade de acesso aos ductos secretores (LAMEIRA et al., 2009; NASCIMENTO; ZOGHBI; SILVA, 2007).

De acordo com Silva et al. (2006), o óleo extraído do tronco é constituído por uma parte sólida resinosa (55% a 60%) e uma parte volátil (40% a 45%). A fração resinosa é rica em diterpenos e a fração volátil é rica em sesquiterpenos (GRAMOSA; SILVEIRA, 2005; SOARES, 2008).

Os óleos de copaíba são misturas de sesqui- e diterpenos. Entre os diterpenos, o ácido copálico tem sido encontrado na maioria desses óleos e, de acordo com Soares et al. (2003), ele poderia ser usado como um biomarcador, para a autenticidade dos mesmos. Dentre os sesquiterpenos, de acordo com a literatura consultada, ainda não há consenso sobre um biomarcador para auxiliar no controle de qualidade. Isso porque são escassos os trabalhos comparativos efetivados entre espécimes de *C. langsdorffii*, sendo necessários mais estudos para contribuir com esse conhecimento.

De acordo com a literatura consultada, os principais componentes voláteis dos óleos de copaíba são: α -copaeno, β -cariofileno, *trans*- α -bergamoteno, α -humuleno, β -bisaboleno, β -selineno e δ -cadineno (CASCON; GILBERT, 2000; LAMEIRA et al., 2009; MAIA et al., 1978; ZOGHBI et al., 2009; ZOGHBI; LAMEIRA; OLIVEIRA, 2007; ZOGHBI; SILVA; TRIGO, 2009).

A composição química do óleo essencial de um espécime de *C. langsdorffii* que ocorre no nordeste brasileiro foi investigada por Gramosa e Silveira (2005), que identificaram diterpeno e vários sesquiterpenos nas folhas e frutos, β -cariofileno (16,6% e 14,8%) e γ -muuroleno (25,2% e 29,8%); nos pericarpos, óxido de cariofileno (47,3%) e, na madeira do caule, γ -muuroleno (8,3%), óxido de cariofileno (31,0%) e caureno (30,2%). Pereira et al. (2008) identificaram, nos pericarpos dessa espécie, (E)-cariofileno, germacreno B, 1,5-epoxisalvial-4(14)-eno, óxido de cariofileno e isoespatulenol. Lima Neto (2008) identificou, no fruto, ácido polialthico, nivenolide e mistura de óxido de cariofileno. A partir do extrato clorofórmico, foi isolada a cumarina das sementes. Os ácidos graxos foram obtidos por metilação, principalmente ácido oleico (33,1%). Vale ressaltar que tais estudos foram realizados com um espécime apenas.

Na literatura consultada, não foram encontrados, para o gênero *Copaifera*, trabalhos relacionados ao teor de óleo essencial em diferentes órgãos de diferentes espécimes e nos diferentes tempos de extração, nem referências à determinação de umidade (residual) de biomassa. De acordo com Santos et al. (2004), o rendimento de óleo deve ser calculado com base na amostra livre de umidade (ALU), que expressa o valor real do teor de óleo presente na biomassa, uma vez que este é padronizado e pode ser reproduzido, sem que haja desvios significativos.

Visando ampliar e aprofundar o conhecimento químico do óleo essencial de *C. langsdorffii*, o presente trabalho foi realizado com o principal objetivo de avaliar o teor de óleo essencial em diferentes espécimes e órgãos, comparando quatro diferentes tempos de hidrodestilação e dois métodos de determinação da umidade e identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais, analisando as variações e as similaridades intraespecíficas e entre os diferentes órgãos da planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, foram abordados dois aspectos dos óleos essenciais de *C. langsdorffii*, o teor e a composição química. Nesse sentido, foram utilizadas técnicas apropriadas para secagem de material botânico, embalagem, pesagem e armazenamento, para posterior identificação, conforme discriminado a seguir.

2.1 Material botânico

Folhas, caules, pericarpos e sementes de cinco espécimes nativos e adultos de *C. langsdorffii* foram coletados no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Os cinco espécimes se apresentavam em diferentes fases de desenvolvimento, mas em mesma fase fenológica de dispersão dos frutos, a saber: espécime 1, com aproximadamente 8 m de altura e circunferência à altura do peito (CAP) de 74 cm; espécime 2, com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm; espécime 3, com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm; espécime 4, com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm e espécime 5, com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm.

As amostras do material botânico foram herborizadas e incorporadas ao acervo do Herbário ESAL da UFLA, sob os números 24946, 24947, 24952, 24954 e 24956, correspondentes aos espécimes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. O material coletado foi seco em temperatura ambiente, com média de 20,7°C e umidade relativa média do ar de 74,5%, em ambiente protegido de luz solar direta, por um período de 15 dias, até atingir peso constante. A secagem e as extrações do óleo essencial foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da UFLA.

2.2 Extração e doseamento do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*

Materiais vegetais desidratados de cada órgão foram reduzidos a fragmentos de cerca de 0,3 cm e divididos em quatro parcelas de 100 g. Cada parcela foi ainda subdividida em quatro amostras de 25 g. A extração do óleo essencial das amostras foi realizada pelo método de hidrodestilação, em aparelho do tipo Clevenger, por períodos de 1, 2, 3 e 4 horas de destilação. Porém, para a semente, devido à escassez de material e ao baixo teor de óleo essencial obtido, foi realizada apenas uma extração por um período de duas horas, utilizada apenas para as análises químicas. O espécime quatro não forneceu quantidade suficiente para análise. Para a destilação, utilizou-se um balão de vidro de fundo redondo de 1.000 mL, contendo 500 mL de água destilada.

O óleo foi separado da fase aquosa com sucessivas lavagens em diclorometano e seco com sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples e o filtrado mantido à temperatura ambiental, sob capela de exaustão de gases em frascos âmbar tampados com papel alumínio perfurado para permitir a evaporação do solvente residual. Em seguida, as massas do óleo foram mensuradas em balança analítica com precisão de 0,01 mg, determinando-se o teor percentual do óleo essencial pela fórmula:

$$T (\%) = \text{massa do óleo (g)} / (25 \text{ g} - \% \text{ de umidade do material vegetal}) \times 100$$

Posteriormente, os frascos contendo os óleos essenciais foram vedados com tampa plástica e mantidos em freezer a -20°C até as análises químicas.

2.3 Determinação da umidade nos materiais vegetais

De cada órgão foram reservados 50 g, acondicionadas em sacos de polipropileno e armazenados em freezer -20°C, durante o processo de extração, para a realização do método gravimétrico e a destilação azeotrópica. O teor de óleo foi determinado pelos métodos a seguir, de acordo com Santos et al. (2004), pela fórmula:

$$TO = \frac{PO}{Bm - (Bm \times U)} \times 100$$

em que

TO = teor de óleo (g de óleo essencial em 100 g de biomassa seca);

PO = peso de óleo extraído (g) com precisão de 0,01 mg;

Bm = biomassa vegetal (folhas, caules, pericarpos), medida em gramas;

Bm x U = quantidade de umidade ou água presente na biomassa, determinada 100 por gravimetria ou destilação azeotrópica;

Bm - Bm x U = quantidade de biomassa seca livre de umidade determinada 100 por gravimetria ou destilação azeotrópica;

100 = fator de conversão para porcentagem.

2.3.1 Método gravimétrico

A determinação de umidade pelo método gravimétrico seguiu a metodologia descrita na Farmacopéia...(1988). Para isso, foram amostrados cerca de 3,0 g de cada repetição das amostras vegetais, que foram mantidas em estufa a 105°C em recipientes de alumínio, por 3 horas. Após esse período, as amostras foram arrefecidas em dessecador, sob pressão reduzida, não superior a

2,7 KPa (aproximadamente 20 mm de Hg), pesadas novamente e retornadas à estufa. O processo foi concluído quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 5 mg, calculando a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.

2.3.2 Destilação azeotrópica

A partir do material seco à sombra, foram pesados 5 g e submergidos em 75 mL de ciclohexano num balão de vidro, equipado com um coletor Dean & Stark. A coluna do coletor foi preenchida completamente com ciclohexano e o condensador conectado ao sistema de refrigeração. A temperatura de aproximadamente 100°C foi controlada com o auxílio de um termostato e, após o início da ebulição, a destilação foi mantida por 3 horas. Após resfriamento do sistema, o volume de água foi medido (FARMACOPÉIA...,1988).

2.4 Análises químicas dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*

As análises dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais Adolpho Ducke (LAD) do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia gasosa/espectrometria de massas Shimadzu QP-2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm de espessura de filme). Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL/min⁻¹, obtido com uma pressão de 57 KPa. A programação de temperatura do forno teve início em 60°C, aumentando até 240°C, por uma rampa de temperatura de 3°C/min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C. Foi injetado 1µl de uma solução de 2 µl de óleo em 1 ml de hexano, sem divisão de fluxo. O detector de massas foi operado por impacto de

elétrons (70 eV), utilizando o modo de varredura, realizado de 40 a 400 u.m.a. e a interface foi mantida em 200°C. As porcentagens relativas dos constituintes químicos foram calculadas a partir das áreas dos sinais cromatográficos. Os índices de retenção (IR) foram calculados pela equação de Van den Dool e Kratz (1963), utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (C8 a C30) nas mesmas condições cromatográficas. A identificação dos constituintes foi realizada pela comparação dos espectros de massas e índices de retenção com os existentes na biblioteca NIST-05 e na literatura (ADAMS, 2007).

2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi realizado em esquema fatorial 3X4, em blocos casualizados e três métodos: T (teor de óleo essencial obtido a partir do material seco à sombra), T-1 (teor de óleo essencial calculado com base na amostra livre de umidade pelo método gravimétrico) e T-2 (teor de óleo essencial calculado com base da amostra livre de umidade pelo método volumétrico) e quatro tempos de extração (1, 2, 3 e 4 horas de hidrodestilação), sendo os blocos representados pelos cinco espécimes e as unidades experimentais pelos diferentes órgãos, com quatro repetições. Os valores dos teores de óleo calculados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e análise de regressão, utilizando o software Sisvar versão 4.3 (FERREIRA, 2000).

A partir dos constituintes voláteis e seus respectivos teores, se efetuou a análise de agrupamento pelo método de ligação completa, com auxílio do programa computacional de estatística multivariada, MINITAB 14 (BASSAD; MIAZAKI; ANDRADE, 1990). Trata-se de um programa convenientemente usado para avaliar a similaridade entre os compostos químicos e que, no presente estudo, foi empregado entre os diferentes órgãos e espécimes. Os

dendrogramas foram obtidos pela técnica de agrupamento hierárquico, numa escala que vai de 1,0 (alta similaridade) a 0 (zero) (nenhuma similaridade) (BRUNS; FRAIG, 1985; MOITA NETO; MOITA, 1998). Os níveis de similaridade são apresentados em percentagem e, quanto mais próximos de 100%, maior a similaridade. No presente trabalho, acima de 80% foi considerada alta similaridade. Os óleos nessa faixa foram considerados de um mesmo tipo, exceto para sementes. Devido ao baixo teor de óleo extraído, apenas quatro espécimes foram analisados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos em g/100g, foram avaliados os teores médios dos óleos essenciais em diferentes partes da planta, em cinco espécimes. Devido ao fato de os valores serem discrepantes entre os diferentes órgãos, as análises de variância foram realizadas separadamente para cada órgão. Na folha, a média geral foi de 0,37 %; no caule, foi de 0,07% e, no pericarpo, de 2,05%. Os constituintes químicos dos óleos essenciais foram identificados em cada órgão, nos cinco espécimes, com seus respectivos teores, com exceção da semente, cujo espécime 4 não apresentou quantidade suficiente de óleo essencial para análise.

3.1 Avaliação do teor de óleo essencial nos diferentes órgãos de *Copaifera langsdorffii*

O teor de óleo essencial foi avaliado nas folhas, caules e pericarpos, com suas respectivas análises de variância. Foram apresentados os diferentes teores obtidos em cada tempo de extração e de acordo com o método de determinação da umidade empregado para calcular e expressar esses teores em porcentagem.

3.1.1 Avaliação do teor de óleo essencial das folhas de *Copaifera langsdorffii*

Os teores médios de óleo essencial das folhas foram estatisticamente diferentes entre os espécimes e tempos de extração, variando de 0,27% (média entre os diferentes métodos em 1 hora de extração) a 0,60% (média entre os diferentes métodos em 4 horas de extração), conforme Tabela 1, corroborando com resultados já descritos na literatura para outras espécies (EHLERT et al., 2006; PRINS; LEMOS; FREITAS, 2006).

O teor máximo de óleo essencial foi atingido em quatro horas de hidrodestilação. Possivelmente, o maior tempo de hidrodestilação das folhas

permitiu o rompimento das estruturas celulares secretoras de óleo que se localizam em posição central no mesofilo foliar, com conseqüente liberação e volatilização do conteúdo secretor.

Os teores médios de óleo essencial da folha, obtidos das amostras livres de umidade pelo método gravimétrico e destilação azeotrópica, não foram estatisticamente significativos. Obtiveram-se 0,29% e 0,28%, respectivamente, em 1 hora de extração e 0,63% e 0,62%, respectivamente, em 4 horas de extração. Essa pequena variação é, possivelmente, resultado das diferenças residuais no grau de umidade que permaneceu em cada amostra (Tabela 11).

Tabela 11 Teor médio (%) do óleo essencial extraído das folhas de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii* em diferentes tempos de hidrodestilação e em diferentes métodos

| MÉTODOS | TEMPOS (h) | ESPÉCIMES | | | | | CV (%) |
|---------|---------------|-----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| T | 1 | 0,256 b | 0,394 a | 0,082 c | 0,272 b | 0,263 b | 12,57 |
| T-1 | 1 | 0,282 b | 0,471 a | 0,090 c | 0,303 b | 0,289 b | 12,51 |
| T-2 | 1 | 0,293 b | 0,464 a | 0,084 c | 0,302 b | 0,280 b | 12,64 |
| T | 2 | 0,206 c | 0,384 a | 0,133 c | 0,260 b | 0,127 c | 22,38 |
| T-1 | 2 | 0,227 c | 0,459 a | 0,146 c | 0,290 b | 0,139 c | 22,39 |
| T-2 | 2 | 0,263 c | 0,452 a | 0,135 c | 0,288 b | 0,135 c | 22,53 |
| T | 3 | 0,459 a | 0,285 b | 0,206 b | 0,415 a | 0,406 a | 15,48 |
| T-1 | 3 | 0,506 a | 0,340 c | 0,227 c | 0,463 b | 0,446 b | 15,39 |
| T-2 | 3 | 0,526 a | 0,338 c | 0,210 c | 0,461 b | 0,431 b | 15,26 |
| T | 4 | 0,651 a | 0,569 a | 0,310 b | 0,654 a | 0,604 a | 9,83 |
| T-1 | 4 | 0,717 a | 0,679 a | 0,342 b | 0,730 a | 0,664 a | 9,97 |
| T-2 | 4 | 0,746 a | 0,669 a | 0,317 b | 0,726 a | 0,643 a | 9,94 |

Média seguida da mesma letra na linha não difere estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; CV = coeficiente de variação; T = teor de óleo; T-1 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida pelo método gravimétrico; T-2 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida por destilação azeotrópica.

Com base no maior teor médio de óleo essencial (0,60%) obtido em quatro horas de extração, nos diferentes espécimes e métodos, pode-se estimar um rendimento de óleo essencial em torno de 6,0 kg/t de folhas secas. Esse valor supera os valores encontrados por Gramosa e Silveira (2005) para a mesma espécie, em ocorrência no nordeste brasileiro e Amorim (2003), na região

sudeste, que obtiveram, em média, 0,04% de teor de óleo. Vale ressaltar que os autores acima não fazem referência ao tempo de extração do óleo essencial.

3.1.2 Avaliação do teor de óleo essencial dos caules de *Copaifera langsdorffii*

A extração de óleo essencial no caule foi obtida a partir dos ramos apicais e, de maneira geral, apresentou baixo teor em relação à folha. As diferenças no teor médio de óleo essencial foram significativas entre os tempos de extração. Os teores médios de óleo essencial nos tempos avaliados foram: 0,04% (média entre os diferentes métodos em 1 hora de extração) e 0,11% (média entre os diferentes métodos em 4 horas de extração). A partir dos valores calculados pelo método gravimétrico e destilação azeotrópica, obteve-se teor semelhante entre os mesmos, 0,05% e 0,04%, respectivamente, em 1 hora de extração e 0,12% e 0,11%, respectivamente, em 4 horas de extração (Tabela 12).

Tais informações confirmam os resultados de Pimentel et al. (2006) que, embora tenham trabalhado com espécies diferentes, também não evidenciaram diferenças significativas nos teores de óleo, entre os métodos gravimétrico e azeotrópico.

De acordo com Gramosa e Silveira (2005), teor de óleo obtido no caule de 0,008%, em um espécime do nordeste brasileiro, foi equivalente a aproximadamente 20% do teor de óleo essencial obtido para 25 g de material seco à sombra em uma hora de extração, no presente trabalho. Embora não seja possível comparar com outras procedências pela falta de dados disponíveis na literatura consultada, os dados acima sugerem a procedência como um importante fator na variação do teor de óleo essencial para a espécie em estudo.

Tabela 12 Teor médio (%) do óleo essencial extraído dos caules de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*, em diferentes tempos de hidrodestilação e em diferentes métodos

| MÉTODOS | TEMPOS (h) | ESPÉCIMES | | | | | CV (%) |
|---------|---------------|-----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| T | 1 | 0,030 c | 0,027 c | 0,016 c | 0,045 b | 0,069 a | 25,25 |
| T-1 | 1 | 0,037 c | 0,036 c | 0,019 c | 0,052 b | 0,080 a | 24,81 |
| T-2 | 1 | 0,035 c | 0,030 c | 0,018 c | 0,054 b | 0,082 a | 25,47 |
| T | 2 | 0,038 b | 0,081 b | 0,063 b | 0,066 b | 0,107 a | 32,96 |
| T-1 | 2 | 0,046 b | 0,108 b | 0,075 b | 0,074 b | 0,126 a | 33,37 |
| T-2 | 2 | 0,044 b | 0,090 b | 0,071 b | 0,079 b | 0,127 a | 33,07 |
| T | 3 | 0,040 b | 0,049 b | 0,037 b | 0,032 b | 0,128 a | 16,32 |
| T-1 | 3 | 0,049 c | 0,065 b | 0,044 c | 0,038 c | 0,150 a | 16,77 |
| T-2 | 3 | 0,046 b | 0,055 b | 0,042 b | 0,039 b | 0,152 a | 16,13 |
| T | 4 | 0,135 a | 0,116 a | 0,059 b | 0,040 b | 0,130 a | 18,24 |
| T-1 | 4 | 0,166 a | 0,154 a | 0,071 b | 0,046 b | 0,152 a | 18,94 |
| T-2 | 4 | 0,157 a | 0,129 a | 0,067 b | 0,048 b | 0,154 a | 17,94 |

Média seguida da mesma letra na linha não difere estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV = coeficiente de variação; T = teor de óleo; T-1 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida pelo método gravimétrico; T-2 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida por destilação azeotrópica.

O teor máximo de óleo foi atingido em quatro horas de extração, cuja média de óleo essencial no caule, calculada com base nos diferentes espécimes e métodos em quatro horas de extração, atingiu 0,11% de óleo essencial, o que daria um baixo rendimento com relação à folha, em torno de 1,1 kg/t de biomassa seca.

3.1.3 Avaliação do teor de óleo essencial dos pericarpos de *Copaifera langsdorffii*

Dentre os órgãos avaliados, o pericarpo foi o que apresentou o maior teor de óleo essencial. Foram evidenciadas diferenças significativas entre os espécimes e os tempos de extração. O teor médio de óleo nos diferentes tempos avaliados foram 1,79% (média entre os diferentes métodos em 1 hora de extração) e 2,33% (média entre os diferentes métodos em 4 horas de extração) (Tabela 13).

Os teores médios obtidos no presente trabalho em 25 g de biomassa seca, durante quatro horas de extração de 2,33%, superam os teores informados por Pereira et al. (2008), cuja massa de óleo, de 3,53%, foi alcançada em três extrações sucessivas de três horas, a partir de 92,90 g de pericarpos provenientes de Alfenas, MG. Valor ainda menor foi registrado por Gramosa e Silveira (2005), que encontraram, para o pericarpo de *Copaiifera langsdorffii* do nordeste brasileiro, teor de 0,7%. Essa comparação ratifica a constatação de que diferentes procedências podem, de fato, influenciar a variação do rendimento de óleo essencial da mesma espécie.

Tabela 13 Teor médio (%) do óleo essencial extraído dos pericarpos de cinco espécimes de *Copaiifera langsdorffii*, em diferentes tempos de hidrodestilação e em diferentes métodos

| MÉTODOS | TEMPOS (h) | ESPÉCIMES | | | | | CV (%) |
|---------|---------------|-----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| T | 1 | 0,988 c | 0,889 c | 2,685 a | 1,993 b | 1,856 b | 4,45 |
| T-1 | 1 | 1,116 c | 0,969 c | 3,036 a | 2,169 b | 2,110 b | 4,43 |
| T-2 | 1 | 1,122 b | 0,945 a | 2,917 e | 2,166 d | 1,932 c | 4,41 |
| T | 2 | 0,692 d | 1,553 c | 3,470 a | 1,780 c | 2,310 b | 13,01 |
| T-1 | 2 | 0,783 d | 1,693 c | 3,923 a | 1,937 c | 2,626 b | 12,87 |
| T-2 | 2 | 0,786 d | 1,651 c | 3,770 a | 1,934 c | 2,405 b | 13,04 |
| T | 3 | 1,230 d | 0,888 d | 2,947 a | 1,715 c | 2,231 b | 18,72 |
| T-1 | 3 | 1,390 d | 0,969 d | 3,332 a | 1,866 c | 2,537 b | 18,36 |
| T-2 | 3 | 1,397 d | 0,945 d | 3,202 a | 1,864 c | 2,241 b | 18,58 |
| T | 4 | 1,644 c | 1,413 c | 3,189 a | 2,050 c | 2,628 b | 16,58 |
| T-1 | 4 | 1,858 c | 1,541 c | 3,606 a | 2,231 c | 2,988 b | 16,67 |
| T-2 | 4 | 1,868 c | 1,503 c | 3,465 a | 2,228 c | 2,737 b | 16,67 |

Média seguida da mesma letra na linha não difere estatisticamente, pelo teste de Tuckey, a 5% de probabilidade; CV = coeficiente de variação; T = teor de óleo; T-1 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida pelo método gravimétrico; T-2 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida por destilação azeotrópica.

O teor máximo de óleo essencial foi atingido em quatro horas de extração. Com base nesse teor médio entre os espécimes e os métodos, pode-se estimar um rendimento de 24,03 kg de óleo por tonelada de biomassa seca. Trata-se de um alto teor, porém, sua sustentabilidade com relação ao fornecimento de óleo fica comprometida pela dependência da fase de

reprodução, que é tardia nessa espécie e pela irregularidade dessa fase que, na maioria dos espécimes, são supra-anuais (PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002).

3.1.4 Avaliação do teor dos óleos essenciais nos diferentes órgãos e espécimes de *Copaifera langsdorffii*

Avaliando os teores médios de óleo essencial entre os diferentes tempos de extração e nos diferentes métodos, as análises estatísticas não revelaram interações significativas entre os mesmos. Logo, trata-se de variáveis independentes, cujos testes de média foram realizados separadamente para cada variável. Dessa forma, avaliando os diferentes órgãos nos diferentes espécimes, o maior teor médio de óleo essencial foi obtido no pericarpo, seguido das folhas e caules (Tabela 14).

Tabela 14 Teor médio (%) do óleo essencial obtido nas folhas, caules e pericarpos de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*, em cada tempo de extração, comparando T, T-1 e T-2

| Órgãos/métodos | | Teor médio (%)/tempo (h) | | | | CV (%) |
|------------------|------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| FOLHA | T | 0,25 b | 0,22 b | 0,35 b | 0,56 a | 23,18 |
| FOLHA | T-1 | 0,29 b | 0,25 b | 0,40 b | 0,63 a | 22,91 |
| FOLHA | T-2 | 0,28 b | 0,25 b | 0,39 b | 0,62 a | 22,83 |
| CAULE | T | 0,04 b | 0,07 b | 0,06 b | 0,10 a | 37,67 |
| CAULE | T-1 | 0,04 b | 0,09 b | 0,07 b | 0,12 a | 38,54 |
| CAULE | T-2 | 0,04 b | 0,08 b | 0,07 b | 0,11 a | 37,53 |
| PERICARPO | T | 1,68 b | 1,96 b | 1,80 b | 2,18 b | 14,03 |
| PERICARPO | T-1 | 1,88 b | 2,19 b | 2,02 b | 2,44 a | 14,04 |
| PERICARPO | T-2 | 1,82 b | 2,11 b | 1,93 b | 2,36 b | 14,22 |

Média seguida da mesma letra na linha e na coluna, para cada órgão estudado, não difere estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; CV = coeficiente de variação; T = teor de óleo; T-1 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida pelo método gravimétrico; T-2 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida por destilação azeotrópica.

De acordo com os dados da Tabela 14, verifica-se que, com exceção do pericarpo, não houve, no mesmo órgão, diferença significativa entre os diferentes métodos de determinação da umidade, embora possa ser observado, nesses órgãos, um pequeno acréscimo nos teores, quando calculados pelo método gravimétrico. Todavia, a aplicação tanto do método gravimétrico quanto do método azeotrópico pode ocorrer para a espécie em estudo sem influenciar significativamente nos resultados.

Entre os diferentes tempos de extração, observa-se semelhança entre os teores médios obtidos durante uma, duas e três horas de hidrodestilação. Somente em quatro horas de hidrodestilação são obtidos, em cada órgão avaliado, teores médios de óleo essencial significativamente diferentes.

Nos órgãos avaliados, foi observado que o teor de óleo essencial apresentou diferença significativa apenas em quatro horas de extração. Tomando por base o pericarpo, verifica-se, entre os diferentes métodos, teor médio em uma hora de extração de 1,79% e, em quatro horas, de 2,33%. Isso correspondeu em torno de 30% a mais. Porém, devem ser consideradas as três horas a mais de extração para extrair apenas 30% a mais de óleo essencial.

Considerando os teores obtidos proporcionalmente entre os diferentes tempos, nos diferentes órgãos e espécimes avaliados, constata-se que, na folha e no pericarpo, foram obtidos os maiores teores em uma hora de extração, enquanto, para o caule, o maior teor proporcional foi obtido em duas horas de extração.

Quando avaliado o teor médio de óleo essencial obtido nos diferentes tempos de extração, comparando-se os diferentes espécimes e os diferentes órgãos, observa-se que foram observadas significativas variações entre os espécimes e ausência de variação entre os diferentes métodos de determinação da umidade (Tabela 15).

Os teores de óleo obtido nos diferentes tempos de hidrodestilação apresentaram diferenças significativas entre os espécimes, especialmente quanto ao pericarpo, no qual os maiores teores foram obtidos no espécime 3. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas nos teores médios de óleo essencial entre os métodos de determinação de umidade, em cada órgão analisado.

Tabela 15 Teor médio (%) do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* obtido de quatro tempos de extração em cada espécime, comparando T, T-1 e T-2

| Órgãos/Métodos | | Teor médio (%) / Tempo (h) | | | | CV (%) |
|------------------|------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| FOLHA | T | 0,39 a | 0,41 a | 0,18 b | 0,40 a | 0,35 b |
| FOLHA | T-1 | 0,43 a | 0,49 a | 0,20 b | 0,45 a | 0,38 b |
| FOLHA | T-2 | 0,46 a | 0,48 a | 0,19 b | 0,44 a | 0,37 b |
| CAULE | T | 0,06 b | 0,07 b | 0,04 b | 0,05 b | 0,11 a |
| CAULE | T-1 | 0,07 b | 0,09 b | 0,05 b | 0,05 b | 0,13 a |
| CAULE | T-2 | 0,07 b | 0,08 b | 0,05 b | 0,06 b | 0,13 a |
| PERICARPO | T | 1,14 c | 1,19 c | 3,07 a | 1,88 b | 2,26 b |
| PERICARPO | T-1 | 1,29 c | 1,29 c | 3,47 a | 2,05 b | 2,57 b |
| PERICARPO | T-2 | 1,29 c | 1,26 c | 3,34 a | 2,05 b | 2,33 b |

Média seguida da mesma letra na linha e na coluna para cada órgão estudado não difere estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; CV = coeficiente de variação; T = teor de óleo; T-1 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida pelo método gravimétrico; T-2 = teor de óleo com base na amostra livre de umidade, obtida por destilação azeotrópica.

A partir das diferenças observadas entre os espécimes, pode-se afirmar que os teores médios de óleo essencial não são diretamente proporcionais à idade da planta, verificados a partir do nível de crescimento desses espécimes, assim como também não são devido a fatores climáticos ou fenológicos. Possivelmente, outros fatores, como estado nutricional, absorção de luz, arquitetura da copa, ou fatores genotípicos, de acordo com Martins et al. (1997) e ambientais, de acordo com Langenheim et al. (1990), Taiz et al. (1998) e Zoghbi et al. (2007), podem ter influenciado sobre a variação do teor de óleo essencial nessa espécie.

3.2 Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*

No presente trabalho, a presença de alguns constituintes voláteis dos óleos essenciais provenientes de diferentes partes da planta mostrou semelhanças e também diferenças com relação aos já citados na literatura.

A partir da composição química dos óleos essenciais obtidos de amostras secas dos pericarpos, folhas e caules de cinco espécimes e de amostras das sementes de quatro espécimes nativas do campus da UFLA, foram identificados 52 sesquiterpenos um diterpeno e um fenilpropanoide (Tabela 6), dos quais 27 constituintes não haviam sido descritos para *Copaifera langsdorffii* (AMORIM, 2003; GRAMOSA; SILVEIRA, 2005; LANGENHEIM, 1981; PEREIRA et al., 2008; SILVA et al. 2006).

Entre os 54 constituintes identificados no presente estudo, somente o α -cadinol e o epóxido de humuleno II foram encontrados em todos os órgãos e em todos os espécimes analisados. Embora em baixos teores, sua presença constante indica correlação entre os espécimes e os diferentes órgãos e amostras avaliadas.

Apesar de algumas exceções, α -copaeno, em teor mais elevado, foi encontrado nos óleos dos pericarpos, β -cariofileno e germacreno D, nos pericarpos, folhas e caules; espatulenol nos pericarpos e sementes, óxido de cariofileno nas folhas, caules e sementes (Tabela 6).

Dentre os constituintes similares já identificados por outros autores para a espécie em estudo, pode-se destacar, entre os majoritários, cariofileno, elemeno, muuroleno, cadineno, germacreno e caureno (GRAMOSA; SILVEIRA, 2005) para toda a planta; cariofileno, germacreno, óxido de cariofileno e *iso*-espatulenol (PEREIRA et al., 2008) para o pericarpo e espatulenol, α -copaeno, aromadendreno (AMORIM, 2003), para as folhas (Tabela 16).

Tabela 16 Principais constituintes identificados nos óleos essenciais dos pericarpos, folhas, caules e sementes de espécimes de *Copaifera langsdorffii*

| Constituintes | IR | Pericarpo | | | | | Folha | | | | | Caule | | | | | Semente | | | |
|------------------------|------|-----------|-----|------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|---------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 5 |
| δ-elemeno | 1341 | - | - | 2,2 | 7,4 | 3,0 | - | - | 3,4 | - | - | - | 1,5 | 1,5 | - | 2,5 | - | - | - | - |
| α-cubebeno | 1353 | 2,5 | - | 3,4 | 0,5 | 0,4 | - | - | 0,8 | - | - | - | 0,5 | 0,8 | - | 0,2 | - | - | - | - |
| ciclossativeno | 1370 | 0,5 | 0,7 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-copaeno | 1380 | 14,1 | 9,8 | 13,0 | 6,9 | 3,6 | 6,7 | 4,9 | 5,5 | 4,2 | 1,6 | - | 2,3 | 3,4 | 1,4 | 1,0 | - | - | 4,6 | - |
| β-cubebeno | 1394 | 11,1 | 7,0 | 9,0 | 6,1 | 4,8 | 5,0 | 4,7 | 7,9 | 3,1 | 2,4 | - | 2,2 | 2,5 | 1,3 | 1,7 | - | - | 4,6 | - |
| Cipereno | 1405 | 0,6 | 1,1 | 0,7 | 0,5 | 2,2 | - | - | 1,3 | - | - | - | 6,7 | 0,5 | - | 0,4 | - | - | - | - |
| β-cariofileno | 1424 | 2,6 | 9,6 | 7,9 | 10,1 | 5,5 | 5,6 | 13,4 | 11,9 | 12,7 | 15,3 | 3,0 | 13,6 | 9,0 | 11,8 | 11,9 | 1,7 | - | - | - |
| β-copaeno | 1434 | 0,5 | - | 0,6 | - | 0,6 | 0,7 | - | 1,6 | 0,5 | 0,9 | - | 1,2 | 0,7 | - | 1,6 | - | - | - | - |
| γ-elemeno | 1437 | - | 2,1 | - | 3,5 | - | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | 1,2 | - | - | - | - | - |
| trans-α-bergamoteno | 1439 | - | - | 1,2 | - | - | - | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cumarina | 1442 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8,8 | 4,0 | 11,9 |
| aromadendreno | 1444 | - | - | - | - | - | 0,9 | - | 0,5 | 0,3 | 0,6 | - | - | 0,5 | - | - | - | - | - | - |
| 6,9-guaiadieno | 1448 | - | - | 0,8 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| cis-muurolo-3,5-dieno | 1449 | - | - | - | - | - | - | - | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-humuleno | 1459 | 0,8 | - | 1,7 | 1,9 | - | 1,7 | 2,9 | 3,1 | 3,5 | 3,9 | - | 3,5 | 2,3 | 3,2 | 3,0 | - | - | - | - |
| allo-aromaden-dreno | 1466 | 0,8 | 0,4 | 0,8 | - | 1,2 | 0,6 | 0,6 | - | - | 0,7 | - | - | - | 0,3 | - | - | - | - | - |
| cis-cadina-1(6),4dieno | 1468 | - | - | - | - | - | - | - | 0,9 | - | - | - | - | - | - | 0,7 | - | - | - | - |
| γ-gurjuneno | 1480 | - | - | - | - | - | - | - | 0,8 | - | - | 1,4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| germacreno D | 1486 | 3,1 | 7,7 | 8,1 | 9,1 | 8,8 | - | 4,6 | 15,8 | 4,1 | 8,4 | - | 9,4 | 10,1 | 11,7 | 19,1 | - | - | - | - |
| cis-β-guaieno | 1497 | - | 0,9 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| epi-cubebol | 1498 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 3,2 | - |
| Viridifloreno | 1499 | 1,7 | - | - | - | - | - | 3,4 | - | 2,9 | - | - | - | 7,0 | - | - | 1,0 | - | - | - |
| biciclogermacreno | 1502 | - | 1,8 | 6,1 | 5,1 | - | - | - | 11,1 | - | 4,7 | - | 4,6 | - | 3,8 | 8,0 | - | - | - | - |
| α-muurolo | 1505 | 1,7 | - | - | - | - | 3,8 | 1,2 | - | - | - | 2,0 | - | - | - | - | - | - | 1,4 | - |
| (E,E)- α-farneseno | 1509 | - | - | - | - | - | - | - | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| δ-amorfenol | 1511 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 | - | - | 0,3 | - | - | - | - |
| γ-cadineno | 1519 | 1,9 | 1,8 | 2,0 | 1,1 | 3,6 | 1,7 | 2,0 | 1,4 | 1,2 | 1,5 | 2,4 | 1,1 | 2,2 | 1,4 | 1,3 | - | 3,4 | 4,3 | - |
| δ-cadineno | 1527 | 2,9 | 2,2 | 4,7 | 1,2 | 1,6 | 2,1 | 2,9 | 5,8 | 2,2 | 1,9 | - | 3,7 | 5,2 | 4,0 | 2,7 | - | - | 1,3 | - |
| trans-cadina-1,4-dieno | 1536 | - | - | 0,2 | - | - | - | - | 0,4 | - | - | - | 0,2 | 0,5 | - | - | - | - | - | - |
| α-cadineno | 1541 | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | 0,5 | - | - | - | - |
| α-copaen-11-ol | 1544 | 2,6 | 1,7 | - | - | - | 2,8 | 3,1 | 0,6 | - | - | 2,9 | 1,5 | 0,8 | 0,7 | - | 0,9 | - | 1,6 | - |
| α-calacoreno | 1546 | - | - | 1,2 | - | - | - | - | - | 1,3 | 2,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| elemol | 1551 | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | 0,6 | - | - | - | - |
| germacreno B | 1561 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)-nerolidol | 1563 | - | - | - | - | - | 1,5 | - | 0,8 | 1,1 | 0,8 | - | - | 0,8 | 1,0 | 0,3 | - | - | - | - |
| espatulenol | 1580 | 19,1 | 7,3 | 15,0 | - | - | - | 12,7 | - | - | - | 16,2 | - | 7,1 | 3,6 | - | 31,5 | 24,3 | 24,9 | 36,9 |
| óxido de cariofileno | 1585 | - | 6,4 | - | 7,1 | 17,0 | 26,0 | 15,1 | 2,9 | 18,1 | 18,0 | 14,7 | 11,9 | 7,8 | 7,4 | 9,9 | 2,3 | 21,9 | 21,4 | 13,3 |
| viridiflorol | 1593 | - | - | - | - | - | 2,7 | 1,5 | 1,3 | 1,8 | 1,9 | - | - | 2,2 | - | 2,0 | - | - | - | - |

“Continua...”

Tabela 16 “Cont.”

| Constituintes | IR | Pericarpo | | | | | Folha | | | | | Caule | | | | | Semente | | | | |
|--|------|-----------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|---------|------|------|------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 5 | |
| salvial-4(14)-en-1-ona | 1594 | 2,3 | 2,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,7 | 1,7 | - |
| guaiol | 1598 | - | 0,5 | - | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | 2,4 | - | - | 3,7 | - | - | - | - | - |
| ledol | 1606 | 1,6 | - | 0,8 | - | - | 2,2 | - | 1,2 | - | - | 2,6 | - | 1,6 | 1,2 | 1,1 | - | - | 1,8 | - | |
| epóxido de humuleno II | 1611 | 1,6 | 2,5 | 1,1 | 1,9 | 1,9 | 2,6 | 3,9 | 0,8 | 1,9 | 1,7 | 4,1 | 2,4 | 2,0 | 1,9 | 1,3 | 1,8 | 8,3 | 3,4 | 3,2 | |
| junenol | 1621 | - | 1,5 | 0,6 | - | 1,1 | 0,9 | - | - | 4,4 | 1,3 | - | 0,9 | 0,4 | 0,9 | 1,0 | - | - | - | - | |
| iso-espatulenol | 1632 | 7,8 | 7,7 | 5,3 | 20,7 | 8,8 | 3,2 | 2,3 | 2,4 | - | 1,7 | 11,7 | 5,5 | 2,7 | 3,3 | 1,8 | 21,4 | 17,8 | 6,8 | 9,5 | |
| epi- α -muurolol | 1645 | - | 2,5 | 2,1 | - | 3,7 | 5,6 | 5,2 | 5,7 | 6,5 | 0,5 | 8,7 | 3,7 | 6,5 | - | 6,7 | 4,2 | - | 1,3 | 3,7 | |
| “ α -muurolol | 1651 | 6,0 | - | - | - | - | 2,6 | 3,0 | - | - | - | 2,6 | 1,4 | - | 7,0 | - | 3,5 | - | - | 1,5 | |
| α -cadinol | 1660 | 3,3 | 5,6 | 1,7 | 4,5 | 2,7 | 6,4 | 5,0 | 4,6 | 5,0 | 5,2 | 12,4 | 6,2 | 5,6 | 7,2 | 6,4 | 8,6 | 6,9 | 2,0 | 6,2 | |
| bulnesol | 1674 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 3,0 | - | - | - | - | - | - | - | |
| eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol | 1694 | 1,7 | 1,4 | 0,8 | 1,3 | 1,5 | 0,6 | - | - | 2,1 | - | 1,5 | 1,1 | 0,9 | 1,2 | 1,2 | 3,5 | 3,8 | - | - | |
| opoplanona | 1746 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,1 | - | - | - | 2,1 | - | - | |
| 14-hidroxi- α -muuroleno | 1786 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,8 | - | 0,2 | 0,3 | 0,5 | - | - | - | - | - | |
| (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-farnesoato de metila | 1789 | - | - | - | - | - | 4,1 | - | 0,4 | 2,5 | 6,6 | 2,7 | - | 0,4 | - | 5,2 | - | - | - | 3,5 | |
| 14-hidroxi- δ -cadineno | 1811 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 | 0,5 | 0,4 | - | - | - | - | |
| caureno | 2052 | - | - | - | - | 0,9 | - | - | - | 1,1 | - | - | 2,0 | - | 3,3 | 1,1 | 0,7 | - | - | 4,2 | |
| Monoterpenos | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Diterpenos | | - | - | - | - | 0,9 | - | - | - | 1,1 | - | - | 2,0 | - | 3,3 | 1,1 | 0,7 | - | - | 4,2 | |
| Fenilpropanoides | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8,8 | 4,0 | 11,9 | |
| Hidrocarbonetos sesquiterpênicos | | 44,8 | 45,1 | 63,9 | 37,8 | 35,3 | 29,2 | 40,6 | 73,7 | 36,0 | 44,0 | 17,9 | 44,7 | 45,7 | 40,1 | 54,9 | 2,7 | 3,4 | 16,2 | - | |
| Sesquiterpenos oxigenados | | 46,0 | 39,5 | 27,4 | 35,5 | 37,0 | 61,2 | 51,8 | 21,0 | 43,4 | 38,3 | 80,1 | 38,7 | 41,5 | 40,1 | 37,9 | 77,7 | 87,8 | 68,1 | 77,8 | |
| Sesquiterpenos totais | | 90,8 | 84,6 | 91,3 | 73,3 | 72,3 | 90,4 | 92,4 | 94,7 | 79,4 | 82,3 | 98,0 | 83,4 | 87,2 | 80,2 | 92,8 | 80,4 | 91,2 | 84,3 | 77,8 | |
| TOTAL | | 90,8 | 84,6 | 91,3 | 73,3 | 73,2 | 90,4 | 92,4 | 94,7 | 80,5 | 82,3 | 98,0 | 85,4 | 87,2 | 83,5 | 93,9 | 81,1 | 100 | 88,3 | 93,9 | |

IR (índice de retenção experimental). **1** (espécime com cerca de 8 m de altura e CAP – circunferência à altura do peito, de 74 cm). **2** (espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm). **3** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm). **4** (espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm). **5** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm). (-) constituinte não detectado.

Considerando apenas os constituintes majoritários com percentagem relativa ($\geq 5,0\%$), foram encontrados 18 constituintes químicos nos diferentes órgãos estudados: pericarpo, folha, caule, e semente. Os principais componentes foram δ -elemeno, α -copaeno, β -cubebeno, cipereno, β -cariofileno, cumarina, germacreno D, viridifloreto, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *iso*-espatulenol, *epi*- α -muurolol, α -muurolol, α -cadinol e (2*E*, 6*E*)-farnesoato de metila. A área relativa dos sinais (%) de cada órgão nos diferentes espécimes variou de 54,2% a 88,0% dos óleos analisados. Dentre os diterpenos, apenas o caureno foi identificado. Além de terpenoides, foi detectada, nos óleos das sementes, a presença de cumarina nos espécimes 2, 3, e 5 (Tabela 7).

Tabela 17 Constituintes químicos majoritários do óleo essencial extraído do pericarpo (P), folha (F), caule (C) e semente (S) de *Copaifera langsdorffii* em cinco espécimes e suas respectivas concentrações relativas

| Constituintes químicos | Espécimes/órgãos | | | | |
|------------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| δ -elemeno | - | - | 2,2 (P) | 7,4 (P) | 3,0 (P) |
| α -copaeno | 14,1 (P) | 9,8 (P) | 13,0 (P) | 6,9 (P) | 3,6 (P) |
| | 6,7 (F) | 4,9 (F) | 5,5 (F) | 4,2 (F) | 1,6 (F) |
| β -cubebeno | 11,1 (P) | 7,0 (P) | 9,0 (P) | 6,1 (P) | 4,8 (P) |
| | 5,0 (F) | 4,7 (F) | 7,9 (F) | 3,1 (F) | 2,4 (F) |
| cipereno | 6,7 (C) | 0,5 (C) | - | - | 0,4 (C) |
| | 2,6 (P) | 9,6 (P) | 7,9 (P) | 10,1 (P) | 5,5 (P) |
| β -cariofileno | 5,6 (F) | 13,4 (F) | 11,9 (F) | 12,7 (F) | 15,3 (F) |
| | 3,0 (C) | 13,6 (C) | 9,0 (C) | 11,8 (C) | 11,9 (C) |
| cumarina | - | 8,8 (S) | 4,0 (S) | - | 11,9 (S) |
| | 3,1 (P) | 7,7 (P) | 8,1 (P) | 9,1 (P) | 8,8 (P) |
| germacreno D | - | 4,6 (F) | 15,8 (F) | 4,1 (F) | 8,4 (F) |
| | - | 9,4 (C) | 10,1 (C) | 11,7 (C) | 19,1 (C) |
| viridifloreto | - | - | 7,0 (C) | - | - |
| | - | 1,8 (P) | 6,1 (P) | 5,1 (P) | - |
| biciclogermacreno | - | - | 11,1 (F) | - | 4,7 (F) |
| | - | 4,6 (C) | - | 3,8 (C) | 8,0 (C) |
| δ -cadineno | 2,1 (F) | 2,9 (F) | 5,8 (F) | 2,2 (F) | 1,9 (F) |
| | - | 3,7 (C) | 5,2 (C) | 4,0 (C) | 2,7 (C) |
| espatulenol | 19,1 (P) | 7,3 (P) | 15,0 (P) | - | - |
| | - | 12,7 (F) | - | - | - |
| | 16,2 (C) | - | 7,1 (C) | 3,6 (C) | - |
| | 31,5 (S) | 24,3 (S) | 24,9 (S) | - | 36,9 (S) |

“Continua...”

Tabela 17 “Cont.”

| Constituintes químicos | Espécimes/órgãos | | | | |
|--|------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | - | 6,4 (P) | - | 7,1 (P) | 17,0 (P) |
| óxido de cariofileno | 26,0 (F) | 15,1 (F) | 2,9 (F) | 18,1 (F) | 18,0 (F) |
| | 14,7 (C) | 11,9 (C) | 7,8 (C) | 7,4 (C) | 9,9 (C) |
| | 2,3 (S) | 21,9 (S) | 21,4 (S) | - | 13,3 (S) |
| epóxido de humuleno II | 11,8 (S) | 8,3 (S) | 3,4 (S) | - | 3,2 (S) |
| <i>iso</i> -espatulenol | 7,8 (P) | 7,7 (P) | 5,3 (P) | 20,7 (P) | 8,8 (P) |
| | 11,7 (C) | 5,5 (C) | 2,7 (C) | 3,3 (C) | 1,8 (C) |
| | 21,4 (S) | 17,8 (S) | 6,8 (S) | - | 9,5 (S) |
| epi- α -muurolol | 5,6 (F) | 5,2 (F) | 5,7 (F) | 6,5 (F) | 0,5 (F) |
| | 8,7 (C) | 3,7 (C) | 6,5 (C) | - | 6,7 (C) |
| α -muurolol | 6,0 (P) | - | - | - | - |
| | 2,6 (C) | 1,4 (C) | - | 7,0 (C) | - |
| α -cadinol | 3,3 (P) | 5,6 (P) | 1,7 (P) | 4,5 (P) | 2,7 (P) |
| | 6,4 (F) | 5,0 (F) | 4,6 (F) | 5,0 (F) | 5,2 (F) |
| | 12,4 (C) | 6,2 (C) | 5,6 (C) | 7,2 (C) | 6,4 (C) |
| | 8,6 (S) | 6,9 (S) | 2,0 (S) | - | 6,2 (S) |
| (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-farnesoato de metila | 4,1 (F) | - | 0,4 (F) | 2,5 (F) | 6,6 (F) |
| | 2,7 (C) | - | 0,4 (C) | - | 5,2 (C) |
| Total da área relativa (%) dos constituintes majoritários ($\geq 5,0$ %) | | | | | |
| Pericarpo | 67,1 | 62,9 | 68,3 | 77,0 | 54,2 |
| Folha | 61,5 | 68,5 | 71,6 | 58,4 | 64,6 |
| Caulo | 78,7 | 60,5 | 61,4 | 59,8 | 72,1 |
| Semente | 63,8 | 88,0 | 62,5 | - | 81,0 |

1. espécime com cerca de 8 m de altura e circunferência à altura do peito (CAP), de 74 cm. **2.** espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm. **3.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm. **4.** espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm. **5.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm. P. pericarpo. F. folha. C. caule. S. semente. (-) não detectado

Cascon e Gilbert (2000), analisando amostra de óleo-resina de *C. multijuga* Hayne, encontraram 8,8% de óxido de cariofileno, o que leva à suspeita de que um artefato oxidativo foi produzido durante o armazenamento do produto. Em amostra coletada com cuidado especial de armazenamento, constataram a ocorrência natural de óxido de cariofileno para *C. guianensis*, como produto do metabolismo secundário de *Copaifera* e não um artefato resultante do armazenamento.

Os dados obtidos não permitiram caracterizar um padrão de ocorrência dos compostos majoritários, porém, ficou evidente a presença de cumarina exclusiva nas sementes e a alta porcentagem de óxido de cariofileno, também

nesse órgão, evidenciando a ocorrência natural do mesmo em *C. langsdorffii* e não como produto de oxidação do β -cariofileno.

Este trabalho não só reforça a ocorrência natural do óxido de cariofileno nos óleos de *C. langsdorffii* como evidencia os órgãos de síntese e acúmulo do mesmo. Entretanto, o processo de oxidação também ocorre.

3.2.1 Cromatogramas parciais dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*

Os Gráficos de 1 a 19 representam os perfis cromatográficos parciais (20 a 45 minutos) dos óleos essenciais das folhas, caules e pericarpos, respectivamente, dos cinco espécimes, e sementes de quatro espécimes, com identificação dos constituintes que apresentaram porcentagens de área relativa ($\geq 5,0\%$).

Esses constituintes majoritários identificados nos óleos das folhas dos cinco espécimes foram α -copaeno, β -cubebeno, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, *epi*- α -muurolol, α -cadinol e (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila. As porcentagens de áreas relativas totais desses constituintes corresponderam a 61,5%, 68,5%, 71,6%, 58,4% e 64,6% do cromatograma total de íons, respectivamente, nos espécimes 1, 2, 3, 4 e 5 (Tabela 7).

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais das folhas de *C. langsdorffii* demonstraram diferenças químicas marcantes entre os espécimes. Os perfis cromatográficos dos espécimes 1, 2 e 4, representados pelos Gráficos 1, 2 e 4, respectivamente, apresentaram altas concentrações de α -copaeno e dos sesquiterpenos oxigenados espatulenol, óxido de cariofileno, *epi*- α -muurolol e α -cadinol. Já do espécime 3, representado pelo Gráfico 3, observa-se maior presença de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e o espécime 5, representado pelo Gráfico 5, uma composição mista de sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados.

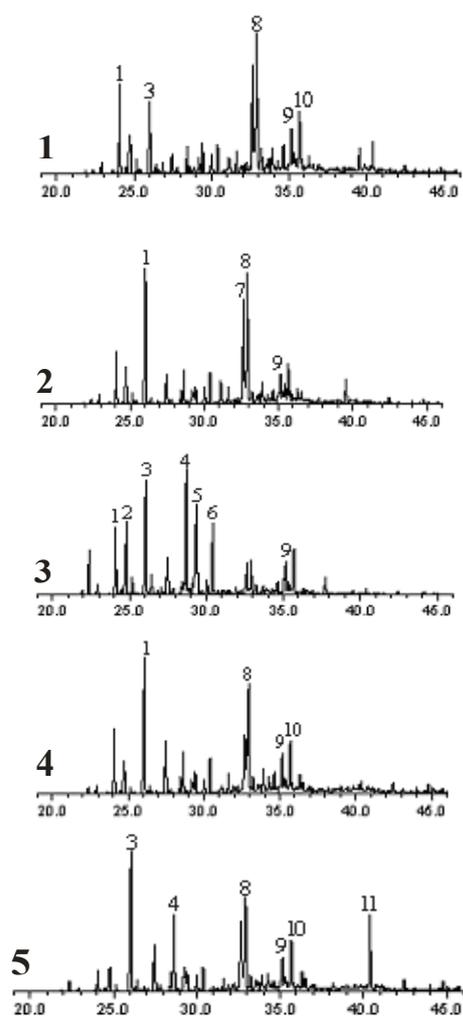


Gráfico 5 De 1 a 5. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais das folhas de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes de 1 a 5. Sinais: 1) α -copaeno; 2) β -cubebeno; 3) β -cariofileno; 4) germacreno D; 5) biciclogermacreno; 6) δ -cadineno; 7) espatulenol; 8) óxido de cariofileno; 9) *epi*- α -muurolol; 10) α -cadinol e 11) (*E, E*)-farnesoato de metila

Os constituintes majoritários com áreas relativas totais ($\geq 5\%$) dos óleos essenciais obtidos dos caules foram: cipereno, β -cariofileno, germacreno D, viridifloreno, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, *epi*- α -muurolol, *iso*-espatulenol, α -muurolol, α -cadinol e (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila. Conforme os resultados apresentados na Tabela 15, foram evidenciadas variações significativas nos teores desses constituintes entre os espécimes. As porcentagens de áreas relativas totais desses constituintes corresponderam a 70,0%, 56,8%, 54,9%, 59,8% e 65,4% do cronograma total de íons, nos espécimes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Tabela 17).

Resultados diferentes foram citados por Gramosa e Silveira (2005) para o óleo resina do caule de *C. langsdorffii*, do nordeste do Brasil, cujos componentes principais foram: γ -muuroleno (8,3 %), caureno (30,2 %) e óxido de cariofileno (31,0%). Dentre esses, apenas o óxido de cariofileno estava presente nas amostras de óleo do caule dos cinco espécimes, apresentando faixa de concentração entre 7,4% a 14,7%. Tal variação pode ser devido a diversos fatores, como genótipo, ontogenia ou o ambiente.

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais dos caules de *C. langsdorffii* também demonstraram diferenças químicas entre os espécimes. Os espécimes 2, 3, 4 e 5, representados pelos Gráficos 7, 8, 9 e 10, respectivamente, apresentam composição mista, com altas concentrações de hidrocarbonetos sesquiterpênicos β -cariofileno e germacreno D e dos sesquiterpenos oxigenados óxido de cariofileno e α -cadinol. Os dois últimos constituintes também ocorreram no espécime 1, representado pelo Gráfico 6, que se diferencia dos demais pela presença do hidrocarboneto sesquiterpênicos cipereno e do sesquiterpeno oxigenado espatulenol.

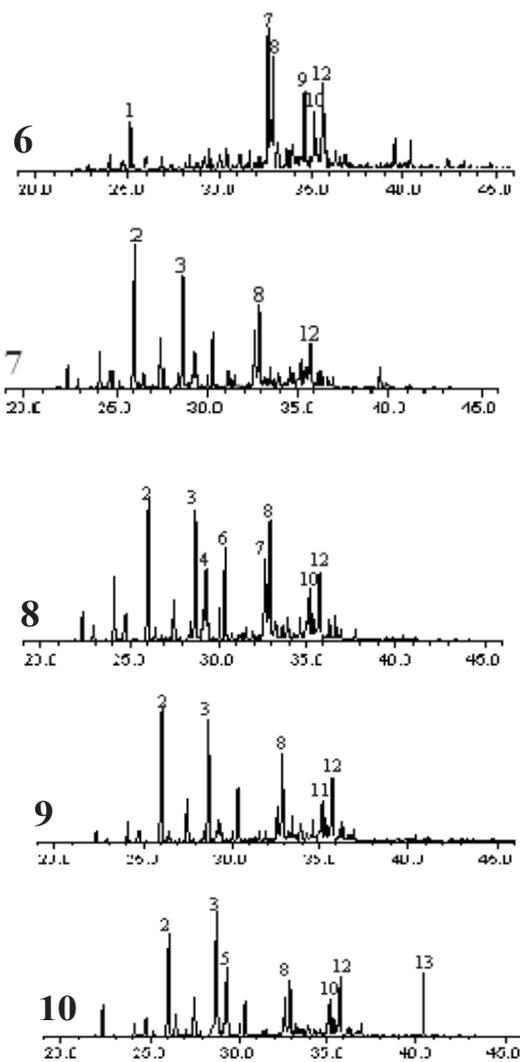


Gráfico 6 De 6 a 10. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais dos caules de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes de 1 a 5. Sinais: 1) cipereno; 2) β -cariofileno; 3) germacreno D; 4) viridifloreno; 5) bicilogermacreno; 6) δ -cadineno; 7) espatulenol; 8) óxido de cariofileno; 9) *iso*-espatulenol; 10) *epi*- α -muurolol; 11) α -muurolol; 12) α -cadinol e 13) e (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila

No pericarpo, foi observada alta variação nas porcentagens dos constituintes químicos entre os óleos dos diferentes espécimes; entre os majoritários com porcentagem $\geq 5\%$ foram encontrados δ -elemeno, α -copaeno, β -cubebeno, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno, *iso*-espatulenol, *epi*- α -muurolol, α -muurolol, α -cadinol e (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila. As porcentagens de áreas relativas totais desses constituintes corresponderam a 67,1%, 62,9%, 68,3%, 77,0% e 54,2% do cromatograma total de íons, nos espécimes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Tabela 7)

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais dos pericarpos de *C. langsdorffii* demonstraram diferenças químicas marcantes entre os espécimes. Os espécimes 1 e 2, representados pelos Gráficos 11 e 12, respectivamente, apresentam composição mista com altas concentrações de hidrocarbonetos sesquiterpênicos α -copaeno, β -cubebeno e β -cariofileno e dos sesquiterpenos oxigenados espatulenol, óxido de cariofileno e *iso*-espatulenol e α -cadinol. Nos espécimes 3, 4 e 5, representados pelos Gráficos 13, 14 e 15, respectivamente, verifica-se a predominância de hidrocarbonetos sesquiterpenos e menos sesquiterpenos oxigenados, apenas dois constituintes com área relativa ($\geq 5,0\%$).

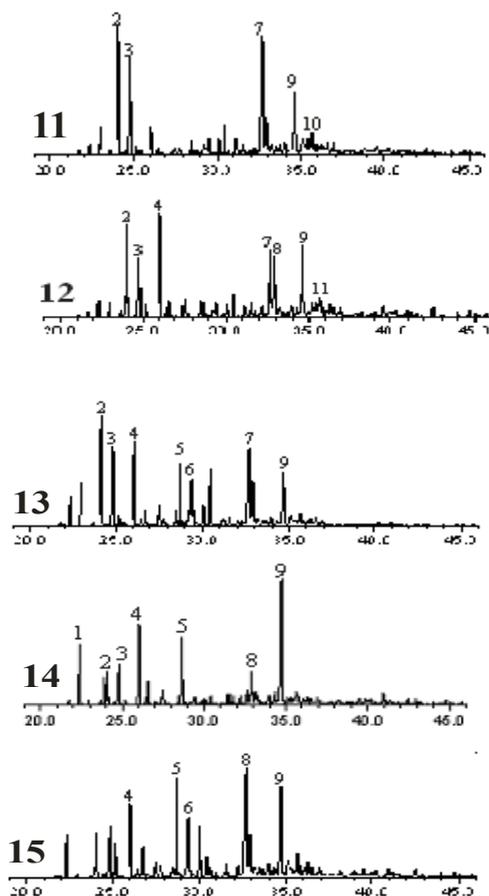


Gráfico 7 De 11 a 15. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais dos pericarpos de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes de 1 a 5. Sinais: 1) δ-elemeno; 2) α-copaeno; 3) β-cubebeno; 4) β-cariofileno; 5) germacreno D; 6) biciclogermacreno; 7) espatulenol; 8) óxido de cariofileno; 9) *iso*-spatulenol; 10) α-muurolol e 11) α-cadinol

Os constituintes majoritários dos óleos essenciais das sementes foram cumarina, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *iso*-spatulenol e α-cadinol. As porcentagens de áreas relativas totais desses constituintes corresponderam a 63,8%, 88,0%, 62,5% e 81,0% do cromatograma total de íons, nos espécimes 1, 2, 3 e 5, respectivamente (Tabela 17).

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais das sementes de *C. langsdorffii* demonstraram diferenças químicas entre os espécimes. Os espécimes 2 e 5 (Gráficos 17 e 19) apresentam alta concentração de cumarina. Um fato bastante curioso neste órgão é a ausência de hidrocarbonetos sesquiterpênicos com área relativa ($\geq 5,0\%$). Somente os sesquiterpenos oxigenados foram identificados nos quatro espécimes analisados, com predominância de espatulenol, óxido de cariofileno e *iso*-espatulenol. O espécime 3 (Gráfico 18) diferencia-se dos demais pela ausência de cumarina e de α -cadinol com área relativa igual ou superior a 5,0%.

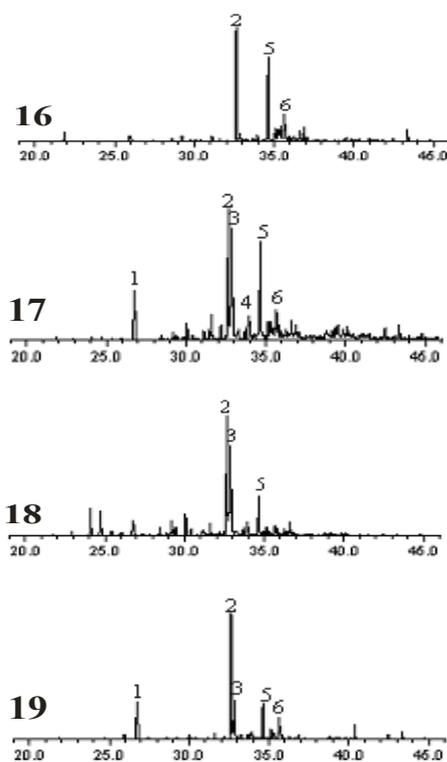


Gráfico 8 De 16 a 19. Perfis cromatográficos parciais dos óleos essenciais das sementes de *Copaifera langsdorffii* dos espécimes 1, 2, 3 e 5. Sinais 1) cumarina; 2) espatulenol; 3) óxido de cariofileno; 4) epóxido de humuleno II; 5) *iso*-espatulenol e 6) α -cadinol

3.2.2 Óleos essenciais das folhas de *Copaifera langsdorffii*

A partir dos constituintes químicos dos óleos essenciais identificados na folha, conforme Tabela 6, foram calculados os níveis de similaridades entre os espécimes, conforme dendrograma a seguir.

A aplicação da técnica de análise de agrupamento pelo método da ligação completa, com base nos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas dos cinco espécimes de *C. langsdorffii*, permitiu estabelecer dois tipos de óleos: o tipo A, caracterizado pelo espécime 2, com 85,40% de similaridade, cujos constituintes majoritários foram o óxido de cariofileno (15,1%), o β -cariofileno (13,4%) e o espatulenol (12,7%). O espécime 1 apresentou 87,54% de similaridade, com predominância de óxido de cariofileno (26,0%), β -cariofileno (5,6%) e ausência de espatulenol e os espécimes 4 e 5, com 93,83% de similaridade, cujos óleos essenciais foram caracterizados pela alta porcentagem de óxido de cariofileno (18,1% e 18,0%, respectivamente) e β -cariofileno (12,7% e 15,3%, respectivamente) e ausência de espatulenol. O tipo B, com 61,94% de similaridade, representado pelo espécime 3, caracterizado pela baixa concentração de óxido de cariofileno (2,9%) e pela presença de β -cariofileno (11,9%) e ausência de espatulenol (Gráfico 9 e Tabela 17).

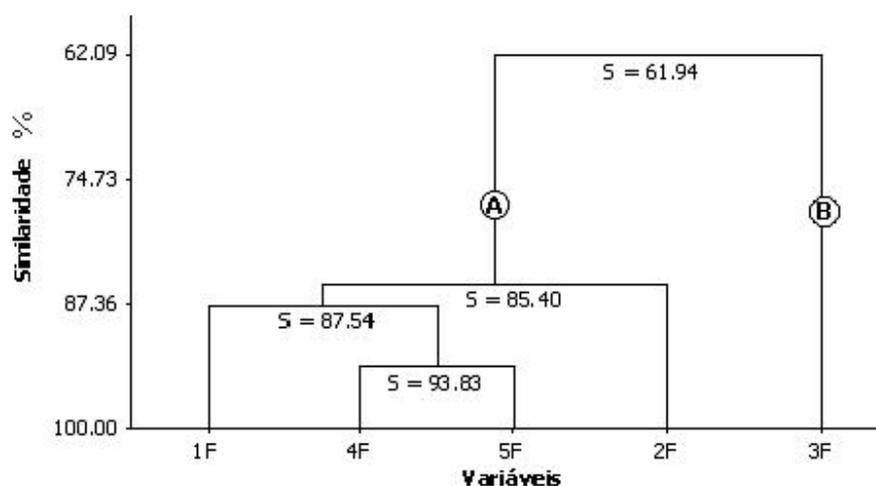


Gráfico 9 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais das folhas de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1.** espécime com cerca de 8 m de altura e circunferência à altura do peito (CAP), de 74 cm. **2.** espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm. **3.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm. **4.** espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm. **5.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm. **F.** folha. **A** e **B.** tipos de óleos

Dentre os óleos das diferentes partes da planta de *C. langsdorffii* estudados, a folha apresentou o maior teor de β -cariofileno, o qual, com exceção do espécime 1, que apresentou 5,6 %, nos demais espécimes, os teores desse constituinte variaram entre 11,9% e 15,3%, mantendo porcentagem similar entre os diferentes espécimes. Esse sesquiterpeno tem comprovada ação anti-inflamatória, bactericida, antitumoral e anticarcinogênica (BENVENUTTI, 2008; LEEWENBERG, 1987; LIMA et al., 2003; OHSAKI et al., 1994). Apresenta outras importantes ações biológicas, como inseticida (BETTARINI; BORGONOV, 1991; KANG et al., 1992; KUBO; MUROI, 1993; ZHENG; KENNEY; LAM, 1992;) é efetivo contra lepdópteros (LANHENHEIM et al., 1990) e seu óxido é efetivo contra fungos (LANHENHEIM, 1990).

Outros sesquiterpenos majoritários identificados nas folhas de *C. langsdorffii* também apresentam importantes ações biológicas, tais como α -humuleno, aroma marcante, explorado pelas indústrias de perfumes (HARBORNE; BAXTER, 1983) e α -copaeno efetivo na atração de moscas-de-frutas-do-mediterrâneo, praga que ataca flores e frutos na Europa (TAKEOKA et al., 1990).

3.2.3 Óleos essenciais dos caules de *Copaifera langsdorffii*

Os constituintes químicos dos óleos essenciais do caule dos cinco espécimes de *C. langsdorffii* permitiu estabelecer dois tipos de óleos: o tipo A, com 64,09% de similaridade, cujos constituintes de maior concentração no espécime 1 com relação aos demais espécimes foram espatulenol (16,2%), óxido de cariofileno (14,7%), *iso*-espatulenol (11,7%) e α -cadinol (12,4%) e o tipo B, com similaridade de 84,95%, representado pelo espécime 3, com baixos teores de espatulenol (7,1%), óxido de cariofileno (7,8%), *iso*-espatulenol (2,7%) α -cadinol (5,6%); pelo espécime 4, com 86,83% de similaridade, com baixos teores de espatulenol (3,6%), óxido de cariofileno (7,4%), *iso*-espatulenol (3,3%) e α -cadinol (7,2%) e pelos espécimes 2 e 5 com 92,17% de similaridade, cujos óleos foram caracterizados pela ausência de espatulenol e presença de óxido de cariofileno (11,9% e 9,9%, respectivamente), *iso*-espatulenol (5,5% e 3,3%, respectivamente) e α -cadinol (6,2% e 6,4%, respectivamente) (Gráfico 10 e Tabela 17).

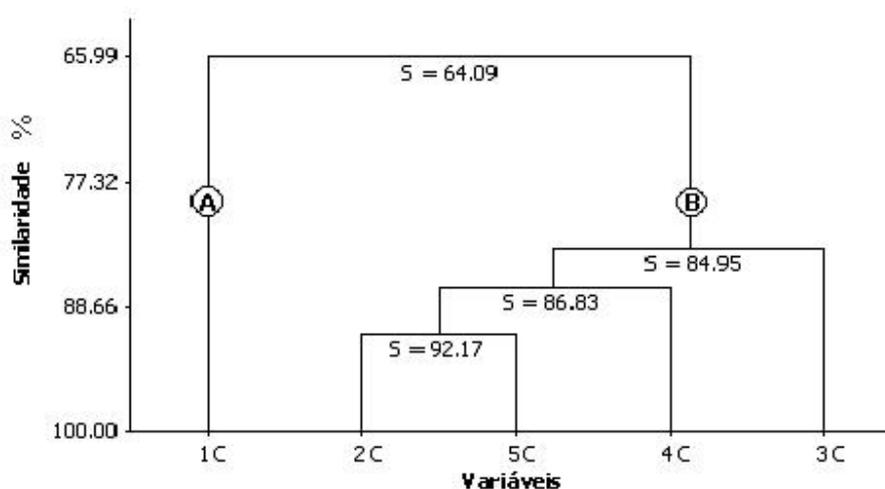


Gráfico 10 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais dos caules de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1.** espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm. **2.** espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm. **3.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm. **4.** espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm. **5.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm. **C.** caule. **A** e **B.** tipos de óleos

Dados encontrados na literatura demonstraram que alguns componentes voláteis do caule de *C. langsdorffii* são comuns a outras espécies do gênero. Craveiro et al. (1981) descreveram a composição do óleo essencial de *Copaifera* sp., no qual identificaram β -cariofileno, α -humuleno, β -bisaboleno, α -cubebeno, α -muuroleno, α -copaeno, *trans*- β -farneseno, δ -cadineno e α -bergamoteno. Dentre eles, o β -cariofileno e o δ -cadineno foram identificados entre os componentes majoritários dos óleos essenciais dos caules dos espécimes em estudo.

Na fração sesquiterpênica de espécies de *Copaifera* da Amazônia, *C. martii*, *C. reticulata* e *C. duckei* foram identificados entre os constituintes majoritários β -cariofileno, β -bisaboleno, α -copaeno e δ -cadineno (ZOGHBI;

LAMEIRA; OLIVEIRA, 2006), dos quais β -cariofileno, β -cubebeno, α -copaeno e δ -cadineno foram encontrados entre os componentes majoritários da espécie em estudo.

3.2.4 Óleos essenciais dos pericarpos de *Copaifera langsdorffii*

Os constituintes químicos dos óleos essenciais dos pericarpos dos cinco espécimes de *C. langsdorffii* permitiram estabelecer dois tipos de óleos: o tipo A, com 92,65% de similaridade, representado pelos espécimes 1 e 3, caracterizados pelo alto teor de espatulenol (19,1% e 15,0%, respectivamente), α -copaeno (14,1% e 13,0%, respectivamente) e β -cubebeno (11,1% e 9,0%, respectivamente) e o Tipo B, com 84,68% de similaridade, representado pelo espécime 5, caracterizado pela ausência de espatulenol, baixo teor de α -copaeno (3,6%) e β -cubebeno (4,8%) e pelos espécimes 2 e 4, com 86,62% de similaridade, cujos óleos foram caracterizados pelo baixo teor de espatulenol (7,3%) no espécime 2 e ausência de espatulenol no espécime 4, alto teor de α -copaeno (9,8% e 6,9%, respectivamente) e β -cubebeno (7,0% e 6,1%, respectivamente) (Gráfico 11 e Tabela 17).

A frutificação de *C. langsdorffii* em ciclos supra-anuais, com anos de intensa produção seguidos de outros sem produção, é um indicativo das possíveis variações climáticas, influência da luz, uma vez que enzimas, hormônios e outros compostos são produzidos, absorvidos ou reelaborados e interferem nos ciclos fisiológicos entre um período e outro de frutificação (MING, 1996; PEDRONI; SANCHEZ; SANTOS, 2002). Certamente, a irregularidade desses ciclos afeta, de certa forma, a produção de óleo essencial e influencia a variação da composição química do mesmo.

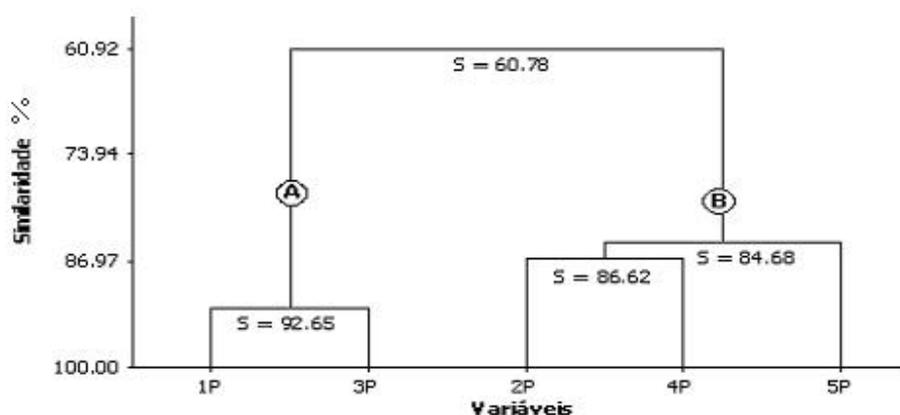


Gráfico 11 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais dos pericarpos de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1.** espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm. **2.** espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm. **3.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm. **4.** espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm. **5.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm. **P.** pericarpo. **A** e **B.** tipos de óleos

Na Tabela 6, são listados 36 constituintes do óleo essencial do pericarpo de *C. langsdorffii*, nos cinco espécimes. Dentre os já citados na literatura por Gramosa e Silveira (2005) e Pereira et al. (2008), 7 não foram encontrados entre os majoritários no presente trabalho, a saber β -selineno, β -elemeno, germacreno B, (Z) e (E)-cariofileno, óxido de humuleno e 1,5-epoxisalvial-4(14)-eno. Entretanto, comparando-se com os resultados dos autores anteriormente citados, treze constituintes voláteis do óleo essencial do pericarpo de *C. langsdorffii* aqui identificados não foram citados por eles. De acordo com a literatura consultada, essas variações residem não apenas na presença de determinados constituintes, mas nos diferentes teores dos mesmos e podem estar relacionados a variações genotípicas (MARTINS et al., 1997) e ambientais (TAIZ; ZEIGER, 2002), como diferentes quimiotipos ou adaptação às condições peculiares do ambiente onde foram coletados.

De acordo com Pereira et al. (2008), muitos dos constituintes identificados têm importância ecológica para a planta como o óxido de cariofileno e o α -copaeno, com ação dissuasora contra insetos, além de grande importância para indústria de perfume pelo aroma característico, produzido pelos isômeros do α -humuleno e do cariofileno (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

3.2.5 Óleos essenciais das sementes de *Copaifera langsdorffii*

Os constituintes químicos dos óleos essenciais obtidos das sementes de quatro espécimes de *C. langsdorffii* permitiram estabelecer dois tipos de óleos: o tipo A, com 84,76% de similaridade, representado pelo espécime 1, caracterizado pelo alto teor de espatulenol (31,5%) e *iso*-espatulenol (21,4%) e ausência de cumarina e o Tipo B, com 93,33% de similaridade, representado pelo espécime 5, com predominância de espatulenol (36,9%), alto teor de *iso*-espatulenol (8,8%) e predominância de cumarina (11,9%) e os espécimes 2 e 3, com 94,70% de similaridade, cujos óleos foram caracterizados pelo alto teor de espatulenol (24,3% e 24,9%, respectivamente), *iso*-espatulenol (17,8% e 6,8%, respectivamente) e cumarina (8,8% e 4,0%, respectivamente) (Gráfico 12 e Tabela 17).

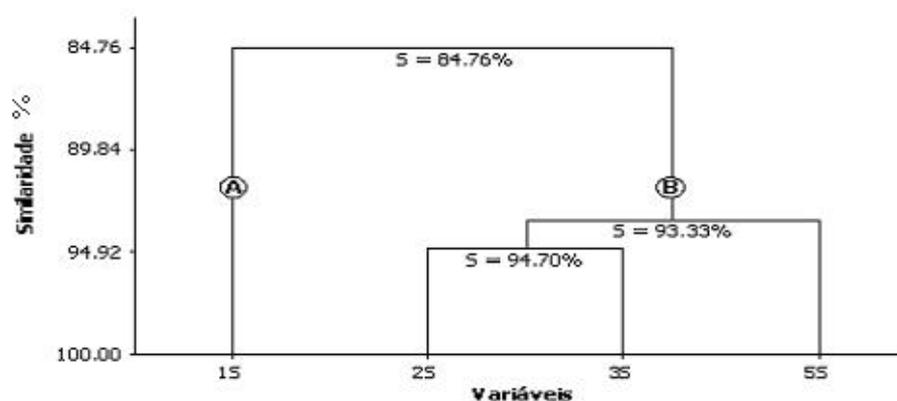


Gráfico 12 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais das sementes de quatro espécimes de *Copaifera langsdorffii*. **1.** espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm. **2.** espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm. **3.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm. **4.** espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm. **5.** espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm. **S.** semente. **A** e **B.** tipos de óleos

A cumarina, substância relacionada à dormência tegumentar das sementes do gênero *Copaifera* (VEIGA JÚNIOR et al., 2007), foi encontrada em *Copaifera langsdorffii* com teores médios de 8,2% entre os espécimes estudados.

3.2.6 Similaridades dos óleos essenciais entre os órgãos

Os constituintes químicos variaram entre os espécimes e os órgãos de um mesmo espécime. Nos dendrogramas a seguir, pode ser visualizada maior similaridade entre determinados órgãos de um mesmo espécime e dissimilaridades entre esses mesmos órgãos em outro espécime (Gráficos 24 a 28).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais do pericarpo, caule, semente e folha do espécime 1 de *C. langsdorffii* permitiram estabelecer três

tipos de óleos: o tipo A, com 72,58% de similaridade, representado pelo pericarpo caracterizado pelo alto teor de espatulenol (19,1%), α -copaeno (14,1%) e β -cubebeno (11,1%); o tipo B, com 87,90% de similaridade, representados pelos órgãos caule e semente, com alto teor de espatulenol (16,2% e 31,5%, respectivamente), ausência de α -copaeno e de β -cubebeno e o Tipo C, com 54,50% de similaridade, representado pela folha com ausência de espatulenol, alto teor de α -copaeno (6,7%) e β -cubebeno (5,0%) (Gráfico 13 e Tabela 16).

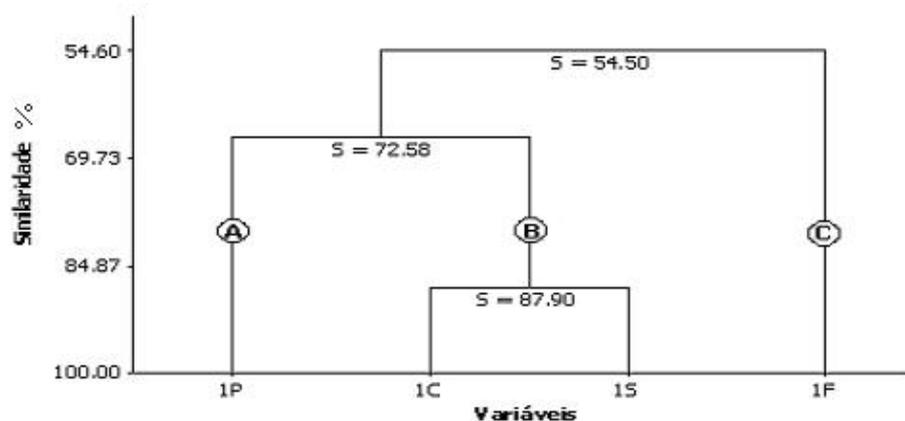


Gráfico 13 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de *Copaifera langsdorffii* do espécime 1. espécime com cerca de 8 m de altura e CAP de 74 cm. P. pericarpo. C. caule. S. semente e F. folha. A, B e C. tipos de óleos

No espécime 2, os constituintes químicos dos óleos essenciais do pericarpo, caule, semente e folha de *C. langsdorffii* permitiram estabelecer dois tipos de óleos. A similaridade no tipo A foi de 85,65%, representada pelo caule, com alto teor de β -cariofileno (13,6%), óxido de cariofileno (11,9%) e germacreno D (9,4%) e pelo pericarpo e folha, com 88,41% de similaridade, cujos óleos foram caracterizados pelo alto teor de β -cariofileno (9,6% e 13,4%,

respectivamente), óxido de cariofileno (6,4% e 15,1%, respectivamente) e germacreno D (7,7% e 4,6%, respectivamente) e no tipo B, com 66,89% de similaridade, representada pela semente, ausência de β -cariofileno, alto teor de óxido de cariofileno (21,9%) e ausência de germacreno D (Gráfico 14 e Tabela 16).

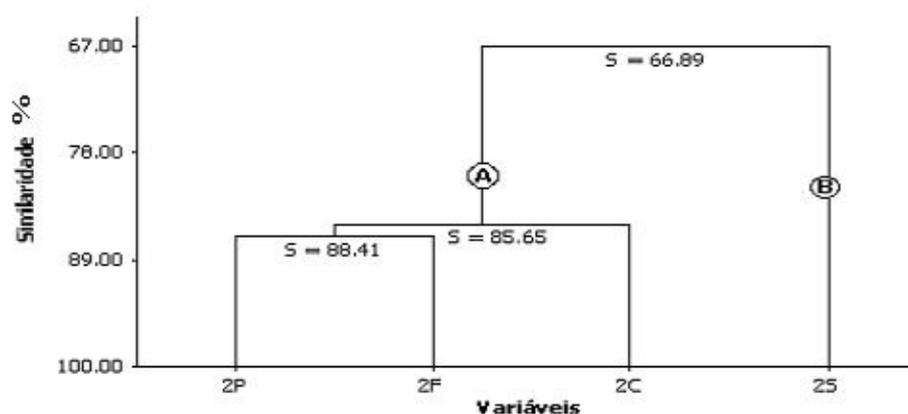


Gráfico 14 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de *Copaifera langsdorffii* do espécime 2. espécime com cerca de 15 m de altura e CAP de 262 cm. P. pericarpo. F. folha. C. caule e S. semente A e B. tipos de óleos

Os constituintes químicos dos óleos essenciais do pericarpo, caule, semente e folha do espécime 3 de *C. langsdorffii* permitiram estabelecer três tipos de óleos. A similaridade entre os tipos A e B foi de 77,06%, representada pelo pericarpo, caracterizado pelo alto teor de α -copaeno (13,0%), β -cubebeno (9,0%) e espatulenol (15,0%). O tipo B, com 82,84% de similaridade, representada pela folha e caule, com baixo teor α -copaeno (5,5% e 3,4%, respectivamente), β -cubebeno (7,9% e 2,5%, respectivamente) e espatulenol (ausência e 7,1%, respectivamente). O Tipo C apresentou a menor similaridade, 51,75%, com relação aos tipos A e B, representada pela semente, com baixo teor

de α -copaeno (4,6%), β -cubebeno (4,6%) e espatulenol (24,9%) (Gráfico 15 e Tabela 16).

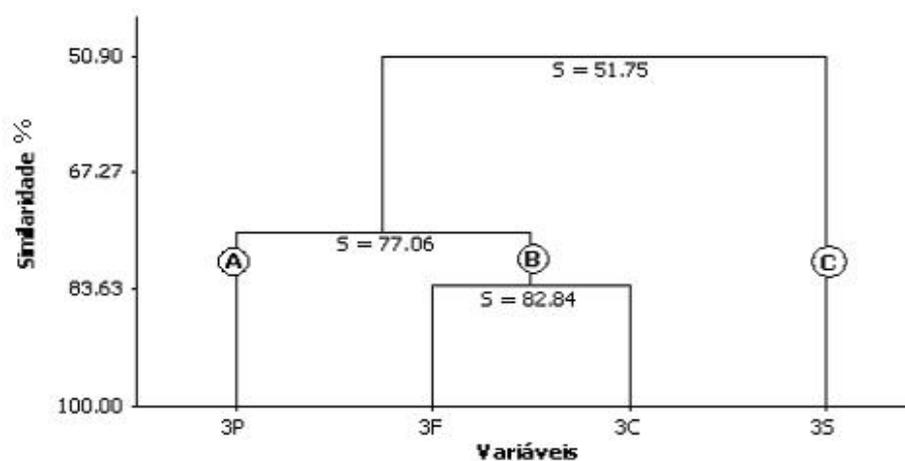


Gráfico 15 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de *Copaifera langsdorffii* do espécime 3. espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 237 cm. **P.** pericarpo. **F.** folha. **C.** caule e **S.** semente. **A** e **B.** tipos de óleos

No espécime 4 foram encontrados dois tipos de óleos. A similaridade entre o tipo A e o tipo B foi de 69,97%, representada pelo pericarpo, com alto teor de β -cariofileno (10,1%), germacreno D (9,1%) e *iso*-espatulenol (20,7%). O tipo B, com 80,37% de similaridade, representado pela folha e caule, com alto teor de β -cariofileno (11,9% e 9,0%, respectivamente), germacreno D (15,8% e 10,1%, respectivamente) e *iso*-espatulenol (ausência e 3,3%, respectivamente) (Gráfico 16 e Tabela 16).

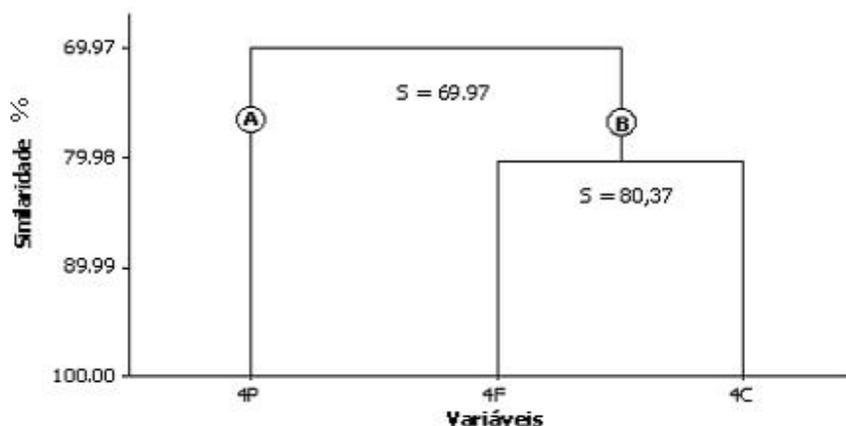


Gráfico 16 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de *Copaifera langsdorffii* do espécime 4 (espécime com cerca de 12 m de altura e CAP de 125 cm). P. pericarpo. F. folha e C. caule. A e B. tipos de óleos

Os constituintes químicos dos óleos essenciais dos diferentes órgãos do espécime 5 de *C. langsdorffii* permitiram estabelecer dois tipos de óleos. A similaridade (83,12%) entre os Tipos A e B foi representada pelo pericarpo, caracterizado pelo alto teor de germacreno D (8,8%), óxido de cariofileno (17,0%) e *iso*-espatulenol (8,8%); a folha e o caule, com 90,02% de similaridade, foram caracterizados pelo alto teor de germacreno D (8,4% e 19,1%, respectivamente), óxido de cariofileno (18,0% e 9,9%, respectivamente) e baixo teor de *iso*-espatulenol (1,7% e 1,8%, respectivamente) e o Tipo B, com 53,87% de similaridade, representado pela semente, com ausência de germacreno D, alto teor de óxido de cariofileno (13,3%) e *iso*-espatulenol (9,5%) (Gráfico 17 e Tabela 16).

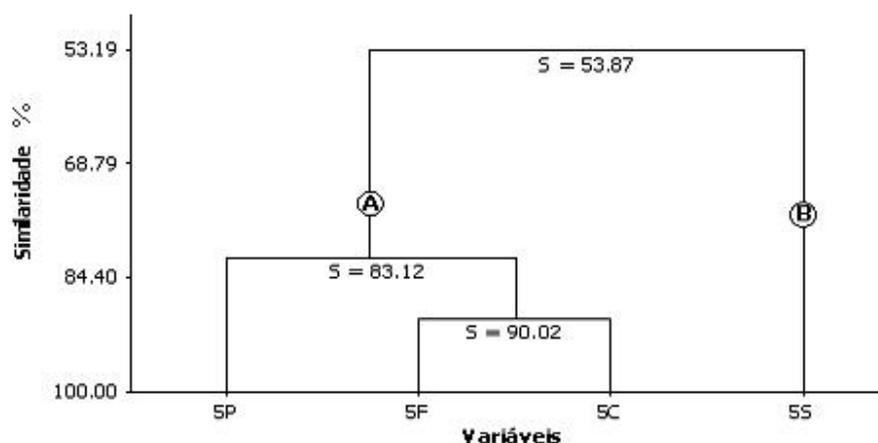


Gráfico 17 Dendrograma obtido pelo método de ligação completa para avaliação da similaridade química dos óleos essenciais entre os diferentes órgãos de *Copaifera langsdorffii* do espécime **5** (espécime com cerca de 16 m de altura e CAP de 280 cm). **P.** pericarpo. **F.** folha. **C.** caule e **S.** semente. **A** e **B.** tipos de óleos

O perfil químico dos óleos essenciais obtidos dos diferentes órgãos de cinco espécimes de *C. langsdorffii* apresentou variações com relação a outros estudos fitoquímicos, com ausência de determinados constituintes, como o γ -muuroleno, que foi identificado em espécime do nordeste por Gramosa e Silveira (2005), para as folhas, com 25,2%, bem como diferença no teor, como o β -cariofileno, cuja média nas folhas dos cinco espécimes no presente trabalho foi de 11,8%. No material proveniente da região nordeste, o β -cariofileno foi de 16,6%.

Tais diferenças também foram observadas com relação ao caule, para o qual Gramosa e Silveira (2005) identificaram como constituintes majoritários γ -muuroleno (8,3%), óxido de cariofileno (31,0%) e caureno (30,2%) na madeira do caule. No presente trabalho, outros constituintes foram identificados, como

germacreno D (12,7%) e β -cariofileno (9,8%). Todavia, foi semelhante quanto ao óxido de cariofileno, porém, com menor teor (11,1%).

No pericarpo da espécie em estudo, o teor médio do espatulenol foi de 13,8%, de óxido de cariofileno foi de 10,2% e o de α -copaeno foi de 9,4%. Estes resultados contrastam com os obtidos por Gramosa e Silveira (2005) e Pereira et al. (2008), que identificaram, dentre os constituintes majoritários destacados acima, somente o óxido de cariofileno, com 47,3% e 37,1%, respectivamente.

A grande variação intraespecífica da composição sesquiterpênica dos óleos de *Copaifera* tem sido descrita em outros estudos (CASCON; GILBERT, 2000; LAMEIRA et al., 2009; ZOGHBI et al., 2009). A magnitude desta variação foi evidenciada para o β -cariofileno (ZOGHBI et al., 2009) em óleos-resinas de *C. reticulata* (1,4% a 68,0%), ao serem analisados oito indivíduos nativos do Pará, nos municípios de Almerim, Curionópolis e Belterra, com variação de 1,4% a 19,5%) e quatro indivíduos nativos do Amapá, município de Mazagão (27,8% a 68,0%). Na espécie *C. duckei*, a variação de β -cariofileno foi de 13,1% a 14,8% na amostra A, durante 12 meses e de 25,1% a 50,2%, na amostra B, durante seis meses.

Os resultados do presente estudo reforçam as observações desses autores e acrescentam informações importantes para *C. langsdorffii*, principalmente para a variação intraespecífica de cinco espécimes da mesma área de coleta (19,6% a 37,1%) e entre os órgãos estudados (1,7%), na semente e (58,9%) na folha.

Foi observada grande similaridade dos constituintes dos óleos essenciais das folhas e dos caules de um mesmo espécime, especialmente para β -cariofileno, germacreno D, γ -cadineno, α -cadinol, óxido de cariofileno e epóxido de humuleno II, entre outros (Tabela 17 e Gráficos 25 a 28). Isto sugere, entre outras possibilidades, que o óleo produzido na folha e no caule é semelhante em sua biogênese e ou reforça a hipótese do transporte do óleo essencial da folha em

direção ao caule. Mais estudos nesse sentido são necessários para esclarecer tais questionamentos.

Os dendrogramas dos Gráficos 24 a 28 revelam a similaridade entre os diferentes órgãos avaliados, tendo a maior delas ocorrido entre a folha e o caule evidenciados nos espécimes 2, 3, 4 e 5.

4 CONCLUSÕES

O teor de óleo essencial apresentou diferenças significativas com relação ao tempo de extração. Quanto aos dois métodos de determinação de umidade, por gravimetria e destilação azeotrópica, podem ser empregados, sem restrições, um ou outro, sem alteração significativa dos resultados.

Para a obtenção de bom rendimento de óleo de *Copaifera langsdorffii*, a hidrodestilação das folhas e pericarpos deve ser efetuada durante 1 hora, enquanto o caule deve ser destilado em 2 horas. O teor de óleo foi maior no pericarpo, seguido das folhas e dos caules.

Os componentes majoritários dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* foram: α -copaeno, β -cubebeno, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, *epi*- α -muurolol, α -cadinol e (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila, nas folhas; cipereno, β -cariofileno, germacreno D, viridifloreno, biciclogermacreno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, *epi*- α -muurolol, α -muurolol, α -cadinol e (2*E*,6*E*)-farnesoato de metila nos caules; δ -elemeno, α -copaeno, β -cubebeno, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno, *iso*-espatulenol, α -muurolol e α -cadinol, nos pericarpos e cumarina, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, *iso*-espatulenol e α -cadinol, na semente.

A significativa variação intraespecífica dos componentes dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* e entre órgãos de um mesmo espécime deve ser decorrente, muito provavelmente, de fatores genéticos, haja vista que os espécimes encontravam-se sob a influência dos mesmos fatores bióticos e abióticos. Esses óleos essenciais foram caracterizados em dois tipos, para folhas, caules, pericarpos e sementes.

Houve grande variação na ocorrência dos sesquiterpenos. Possivelmente, categorias taxonômicas infraespecíficas estão envolvidas nessa variação. Porém, foram detectados alguns compostos que caracterizam bem os diferentes tipos de óleos, principalmente da semente pela presença de cumarina.

As composições químicas dos óleos essenciais das folhas e dos caules foram mais similares quando comparadas às dos pericarpos e das sementes de um mesmo indivíduo. Todavia, estudos com uma amostragem maior poderão esclarecer melhor essas tendências de similaridades da composição química entre os órgãos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/Quadrupole mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Publ Corp, 2007. 456 p. il.
- ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne: leguminosae, na Amazônia Central: produção de óleo-resina. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 75-89, 1982.
- ALMEIDA, B. S. de. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de placa dentária de escolares. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 49, n. 3, p. 133-138, jul./set. 2001.
- AMORIM, A. C. L. **Caracterização química da *Copaifera langsdorffii* Desfon. e avaliação de sua atividade fungitóxica**. 2003. 94 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- LANGENHEIM, J. H.; ARRHENIUS, S. P.; NASCIMENTO, J. C. Relationship of light intensity to leaf resin composition and yield in the tropical Leguminous genera *Hymenaea* and *Copaifera*. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 9, n. 1, p. 27-37, 1981.
- ARRIEL, E. F.; SILVA, A. F.; AMARAL, L. C. S. Avaliação da atividade do extrato de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) contra *Streptococcus mutans*. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA, 12., 2004, Goiânia; ENCONTRO CENTRO-OESTE DE QUÍMICA, 2., 2004, Goiânia, SEMANA DO QUÍMICO, 4., 2004, Goiânia; ENCONTRO CENTRO-OESTE DE DEBATES SOBRE O ENSINO DE QUÍMICA, 13., 2004, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2004.
- AZEVEDO, O. C. R.; WADT, L. H. O.; WADT, P. G. S. **Copaíba**: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: EMBRAPA, 2004. 28 p. (Documentos, 91).
- BARBOSA, R. A. **Avaliação do efeito microbiano *in vitro* e *in vivo* do extrato de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans***. 2001. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência com Ênfase em Saúde) - Universidade José Rosário de Vellano, Alfenas, 2001.

BASSAD, W. O.; MIAZAKI, E. B.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos. In: SIMPÓSIO BRASIL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICAS, 9., 1990, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 1990.

BENVENUTTI, P. **Obtenção, caracterização química e atividade antibacteriana de óleos voláteis de *Copaifera langsdorffii* Desf.** 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2008.

BETTARINI, F.; BORGONOV, G. E.; Antiparasitic Compounds from East African Plants: Isolation and Biological Activity of Anonaine, Matricarianol, Canthin-6-One and Caryophyllene Oxide. **Insect Science and its Application**, Novara, v. 14, n. 1, p. 93-99, 1991.

BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, p. 46-49, 2003.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 84-99, 1985.

CASCON, V.; GILBERT, R. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf. *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, Oxford, v. 7, n. 55, p. 773-778, 2000.

CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

EHLERT, P. A. D. et al. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 79-80, 2006.

FARMACOPÉIA brasileira: generalidades e métodos de análise. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2000.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 17, p. 130-132, Mar./Apr. 2005.

GUILHON, G. M. S. P. et al. Volatiles from aerial parts and rhizomes of *Kyllinga brevifolia* Rottb. growing in Amazon. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 20, p. 545-548, 2008.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary**: a handbook of bioactive compounds from plants. London: Taylor & Francis, 1983. 791 p.

KANG, R. et al. Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2328-2330, 1992.

KUBO, I.; MUROI, H. Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 7, p. 1102-1105, 1993.

LAMEIRA, O. A. et al. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the States of Pará, Brazil. **Journal Essential Oil Research**, Washington, v. 21, p. 105-107, 2009.

LANGENHEIM, J. H. Plant resins. **American Scientist**, Washington, v. 78, p. 16-24, 1990.

LANGENHEIM, J. H. Terpenoids in the Leguminosae. p. 627-655. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. **Advances in legume systematics**. Londres: Royal Botanic Gardens, 1981. v. 2.

LEEWENBERG, A. J. M. **Medicinal and poisonous plants of the tropics**. Pudoc: Wageningen, 1987.

LIMA, S. R. M. et al. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, Brisbane, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.

LIMA NETO, J. S. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1078-1080, 2008.

MAIA, J. G. S. et al. Estudos químicos de óleos essenciais: oleaginosas e látices da Amazônia. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 8, p. 705-706, 1978.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B. Óleos essenciais da Amazônia: inventário da flora aromática. In: LÊNIO, J. G. P.; CRISTIANE, M. L. C. **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém: UFPA, 1998. p. 127-146.

MARTINS, E. R. et al. Essential oil in the taxonomy of *Ocimum selloi* Benth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 29-32, 1997.

MING, L. C. **Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função de fases de desenvolvimento, calagem e adubações mineral e orgânica em *Ageratum coyzoides* L.** 1996. 65 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1996.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, jul./ago. 1998.

MOURÃO, A. P. et al. Estudo do óleo resina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) como fonte não convencional de energia, visando sua utilização em motores diesel. In: ENCONTROS DE PROFISSIONAIS DE QUÍMICA DA AMAZÔNIA, 1., 2., 1980, Belém. **Anais...** Belém, 1980. p. 103-112.

NASCIMENTO, M. E.; ZOGHBI, M. G. B.; SILVA, R. C. V. M. Aspectos anatômicos dos elementos secretores na folha de *Copaifera multijuga* Hayne (Leg. Caes.) e análise química do óleo-resina proveniente do tronco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais...**Varginha, 2006.

OHSAKI, A. et al. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *C. langsdorffii* Desf. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfon.) Leguminosae. Cesalpinioideae) em uma floresta semidecídua do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 183-194, 2002.

PEREIRA, F. J. et al. Isolamento. Composição química e atividade anti-inflamatória do óleo essencial do pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 3, p. 74-369, 2008.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, Mar./Apr. 2006.

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

RADÜNZ, L. L. et al. “Efeito da temperatura de secagem na quantidade e qualidade do óleo essencial de Alecrim Pimenta (*Lippia Sidoides* Cham)””. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 30., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2001.

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: EMBRAPA, 2004. (Documentos, 99).

SILVA, F. H. et al. Estudo do óleo essencial e extrato hidrometanólico de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinaceae) do cerrado e Mata Atlântica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2006.

SILVA, R. C. V. M. **Taxonomia das espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae) ocorrentes na Amazônia brasileira**. 2006. 258 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SIQUEIRA, G. C. L. et al. **Copaíba**: produtos potenciais da Amazônia. Brasília: SEBRAE, 1998. 28 p.

SOARES, J. G. et al. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 9, p. 65-59, 2003.

SOARES, S. B. **Análise do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desfon. e o estudo de sua potencialidade como biocombustível.** 2008. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** 3rd ed. New York: Springer Verlag, 2002. 642 p.

TAKEOKA, G. et al. Chromatography. **Journal of High Resolution**, New York, v. 13, p. 202-206, 1990.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-467, 1963.

VEIGA JÚNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 2, n. 112, p. 248-254, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, India, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the States of Pará and Amapá, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 21, p. 501-503, 2009.

ZOGHBI, M. G. B.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, E. C. P. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

ZOGHBI, M. G. B.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal variation of oleoresin and volatiles from *Copaifera martii* Hayne growing wild in the State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 19, n. 6, Nov./Dec. p. 504-506, 2007.

ZOGHBI, M. G. B.; SILVA, R. C. V. M.; TRIGO, J. R. Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 21, p. 403-404, 2009.