



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO DA SIMILARIDADE FITOQUÍMICA DE POPULAÇÕES
DE ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*) E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

MAÍRA MACIEL TOMAZZOLI

Curitiba

Dezembro/2017

RESUMO

Do ponto de vista econômico, o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) possui grande importância devido à produção de metabólitos secundários com aplicações nas indústrias farmacêutica e de cosméticos. A espécie é nativa do cerrado brasileiro, sendo encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, estendendo-se à Argentina, Paraguai, Uruguai, e Bolívia, sendo comum em cerrados, pastagens abandonadas, áreas em processo de sucessão, adaptando-se facilmente a habitats pobres em nutrientes. Técnicas analíticas cromatográficas são frequentemente utilizadas à investigação da composição química de espécies nativas com alto grau de dispersão. Com o auxílio de análises multivariadas é possível a identificações dos padrões de similaridade fitoquímica entre as amostras de interesse. A propagação vegetativa por estaquia é o método de reprodução mais utilizado na produção comercial de diversas culturas medicinais, frutíferas e ornamentais. Estudos sobre propagação vegetativa por estaquia de *B. dracunculifolia* ainda são insipientes, entretanto, para muitas espécies do gênero *Baccharis* este tipo de reprodução mostrou-se bastante efetivo, possibilitando a uniformidade de características economicamente importantes para a espécie. A produção comercial do alecrim-do-campo, visando o incremento do rendimento do óleo essencial e de compostos de interesse medicinal, através do manejo adequado, desde a produção de mudas, desenvolvimento a campo, até os procedimentos para extração dos metabólitos de interesse, tornam-se bastante desejáveis para todos os setores envolvidos. Nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho será avaliar a similaridade fitoquímica de populações de alecrim-do-campo, oriundos de quatro municípios paranaenses, e a produção de óleos essenciais e compostos fenólicos da espécie em condições de cultivo a campo.

1. INTRODUÇÃO

O alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) é um arbusto pertencente ao gênero *Baccharis*, da família Asteraceae, que possui cerca de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Devido à grande concentração de espécies do gênero *Baccharis* no Brasil, principalmente no cerrado, indica que esta região é um provável centro de origem do gênero.

Do ponto de vista econômico, *B. dracunculifolia* possui grande importância devidos aos seus metabólitos secundários, que possuem uma série de aplicações do ponto de vista medicinal, cosmético e ecológico. De importância medicinal, o composto Artepillin C, presente majoritariamente na espécie, corresponde a um fenilpropanoide prenilado (4- hidroxicinâmico 3,5-ácido diprenil) com alto valor no mercado (r\$ 1653,75/10mg), possuindo uma série de efeitos benéficos à saúde humana, entre eles o tratamento de tumores. Do ponto de vista ecológico, os metabólitos secundários presentes na planta auxiliam na interação da espécie com as abelhas da espécie *Apis mellifera* na coleta do material resinoso à produção de própolis. Na indústria cosmética o óleo essencial de *B. dracunculifolia* atualmente é exportado como matéria-prima para confecção de perfumes, sendo considerado uma essência exótica. Entre os constituintes químicos presentes no óleo, verificou-se como componentes majoritários os sesquiterpenos E-nerolidol e espatulenol, apresentando atividade antineoplásica, inibidor de crescimento de *Plasmodium falciparum* (agente causador da malária) e de *Leishmania amazonenses* (causador da leishmaniose tegumentar americana).

O mercado mundial de óleos essenciais movimenta cerca de US\$ 1,8 bilhões/ano, entretanto, a participação brasileira ainda é considerada pequena neste mercado (0,1%), concentrando-se basicamente sobre a produção de óleos cítricos, que consistem em subprodutos da produção do suco concentrado de laranja. O Brasil possui uma grande biodiversidade, porém, ainda pouco explorada com relação a composição química de sua flora, colocando o país em uma situação favorável para aumentar sua produtividade junto ao mercado de óleos essenciais. Muitas espécies nativas do Brasil vêm sendo utilizadas pelas indústrias farmacêutica e cosmética, ainda que em

pequena escala, para o desenvolvimento de fitoterápicos e óleos essenciais, respectivamente, revelando um grande potencial destas espécies.

A propagação vegetativa por estaquia é o método de reprodução mais utilizado na produção comercial de diversas culturas medicinais, frutíferas e ornamentais. Entre as vantagens deste tipo de propagação podemos citar a reprodução das características da planta matriz, uniformidade nas populações e facilidade de propagação. Entretanto, com relação a propagação da espécie *B. dracunculifolia*, a reprodução por semente surge como método predominante. Estudos sobre propagação vegetativa por estaquia da planta ainda são insipientes, apesar que para muitas espécies do gênero *Baccharis* estudos mais aprofundados sobre este tipo de reprodução mostrou-se bastante efetiva, potencializando o incremento da produção de biomassa com maior rapidez e uniformizando características de importância econômica para a espécie. Neste sentido, a obtenção de mudas de alecrim-do-campo via propagação vegetativa por estaquia torna-se também uma estratégia produtiva bastante interessante.

No desenvolvimento de produtos de origem vegetal, a pesquisa agrônômica visa colaborar sobre a qualidade e a base sustentável da matéria-prima, de forma a ampliar os benefícios destes produtos, bem como possibilitar aos agricultores um acréscimo na fonte de renda, diversificando a atividade agrícola. Neste contexto, a produção comercial do alecrim-do-campo visando o incremento do rendimento do óleo essencial e de compostos de interesse medicinal, através do manejo e de tratamentos culturais adequados, aliados a tecnologias de cultivo, desde a produção de mudas até os procedimentos para extração destes metabólitos de interesse, tornam-se bastante desejáveis para todos os setores envolvidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A *Baccharis dracunculifolia* é uma espécie da família Asteraceae, conhecida popularmente como vassourinha e alecrim-do-campo. Nativa do cerrado brasileiro (MENDONÇA et al., 2008), possui ocorrência natural nos campos rupestres da Serra do Cipó (GIULIETTI et al., 1987). Adicionalmente, a espécie também é encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, estendendo-se à Argentina, Paraguai, Uruguai, e Bolívia, sendo comum em cerrados, pastagens abandonadas, áreas em processo de sucessão, adaptando-se facilmente a habitats pobres em nutrientes (OLIVEIRA & BASTOS, 1998; JULIÃO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012).

A planta é um arbusto lenhoso, de 2-3 metros de altura, perene, dióica e com reprodução por sementes. Suas folhas são lanceoladas, membranáceas, com margens inteiras ou apresentando de 1 a 3 dentes. Suas flores apresentam capítulo multifloro e seus aquênios são glabros com cerca de 1,5mm de comprimento. As folhas possuem tricomas tectores e glandulares, que além de atuarem como barreira ao ataque de insetos predadores, auxiliam na interação da espécie com as abelhas, para a coleta do seu material resinoso (OLIVEIRA & BASTOS, 1998; BARROSO & BUENO, 2002; SFORCIN et al., 2012). A alta porcentagem e a rapidez na germinação dos aquênios de *B. dracunculifolia* ocorrem em condições de temperatura entre 15 a 20°C (em presença de luz), o que somado as suas características colonizadoras e invasoras, assim como a sua ocorrência natural em solos degradados, sugere a aptidão da espécie à recuperação de áreas degradadas (GOMES & FERNANDES, 2002).

A espécie *B. dracunculifolia* possui metabólitos secundários que auxiliam na interação da planta com as abelhas da espécie *Apis mellifera* na coleta do material resinoso à produção de própolis verde (NEGREIROS et al., 2009). A resina de *B. dracunculifolia* é caracterizada por apresentar fragmentos epidérmicos e tricomas glandulares que são transportados à colmeia para a elaboração da própolis. A cor verde daquela matéria-prima resulta do uso de tecidos foliares jovens contendo clorofila por parte das abelhas. Além disso, as

folhas jovens apresentam pêlos secretórios com óleos voláteis e aromáticos, conferindo um aroma típico à própolis verde. Ao longo do ano, a própolis de uma mesma região pode apresentar diferentes colorações, variando entre o amarelo-claro e o vermelho escuro, dependendo da sua origem botânica e época do ano (SALATINO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012).

Entre os constituintes químicos presentes em *B. dracunculifolia*, foram identificados os ácidos cumárico, ferrúlico, cinâmico, a crisina, o canferol, canferide, pinobacsina, acacetina e Artepillin C. Seus brotos foliares, folhas expandidas e não expandidas apresentam perfis químicos bastante similares, entretanto, com acentuada discrepância na parte quantitativa. De forma geral, os brotos foliares possuem quantidades superiores de fenólicos, em especial o Artepillin C, em comparação às folhas expandidas, as quais apresentam constituintes químicos em concentrações muito inferiores ou inexistentes (PARK et al., 2004). Estudos relacionados a produção de própolis a partir da resina de *B. dracunculifolia*, verificaram que as abelhas (*A. mellifera*) coletam as resinas presentes em brotos foliares, em folhas não expandidas, e raramente de folhas adultas daquela espécie (PARK et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* atualmente é exportado como matéria-prima para confecção de perfumes, sendo considerado uma essência exótica, que tem como componentes majoritários os sesquiterpenos E-nerolidol e espatulenol (QUEIROGA, 1989; SANTOS et al., 2012a). Entre demais compostos presentes no óleo essencial de *B. dracunculifolia* podemos citar o α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, E-pinocarveol, E-cariofileno, E-nerolidol, β -santaleno, β -oplopenona, β murolol, δ -cadineno, mirtenol, globulol, espatulenol, epi- α -cadinol, cubenol, oxido de cabreuva B e óxido de cariofileno (QUEIROGA, 1989; FERRACINI et al., 1995; SANTOS et al., 2012a). O sesquiterpeno E-nerolidol está presente em óleos vegetais de diversas plantas, sendo aprovado pela agência reguladora Food and Drug Administration (FDA) nos Estado Unidos, como um agente flavorizante em alimentos (ARRUDA et al., 2005). Adicionalmente, o composto espatulenol apresenta importantes atividades biológicas, entre elas propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica contra células do tipo KB (LIMBERGER et al., 2004).

A sazonalidade e o período fenológico de *B. dracunculifolia* possuem grande influência no acúmulo de metabólitos secundários no seu interior. Verificou-se que para a espécie, o período de crescimento vegetativo resultou no maior acúmulo de metabólitos secundários. Tanto os óleos essenciais como compostos fenólicos contidos na planta, obtiveram resultados qualitativos e quantitativos superiores entre os meses de dezembro a abril, coincidindo majoritariamente com a estação de verão (SOUZA et al., 2009b). Com relação ao rendimento do óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi verificado o seu maior rendimento durante os meses de fevereiro a abril (SOUZA et al. 2009a).

A produção de biomassa e metabólitos secundários em plantas medicinais, aromáticas e condimentares são influenciados por diversos fatores, entre eles o manejo fitotécnico. A produtividade e a qualidade de produção são maximizadas especialmente pela nutrição adequada das plantas, uma vez que o excesso ou a deficiência de nutrientes pode comprometer substancialmente a produção de substâncias ativas, assim como a produtividade agrícola. A baixa produção de ativos em plantas medicinais, pode tornar a sua comercialização inviável, em contrapartida, cultivos mal conduzidos também podem levar ao incremento de substâncias consideradas tóxicas, tornando o produto nocivo à saúde (SANTOS et al., 2012a).

Como exposto anteriormente, a propagação vegetativa por estaquia é o método de reprodução mais utilizado na produção comercial de diversas culturas medicinais, frutíferas e ornamentais, entre as vantagens deste tipo de propagação podemos citar a reprodução das características da planta matriz, uniformidade nas populações e facilidade de propagação (HARTMAN et al., 2002). Diversos fatores podem influenciar o sucesso da reprodução vegetativa, entre elas o grau de lignificação do ramo, posição da estaca, quantidade de reservas, diferenciação dos tecidos, tipo de substrato e suas características físico-químicas (HARTMAN et al., 1990). Com relação a propagação da espécie *B. dracunculifolia*, os estudos existentes sugerem a reprodução por semente como método predominante, entretanto, para outras espécies do gênero *Baccharis* (*B. trimera*, *B. articulata* e *B. stenocephala*) a propagação vegetativa por estaca mostrou-se bastante efetiva (BONA et al., 2005).

De acordo com a definição da ISO (International Standard Organization), os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis ou óleos etéreos, são produtos obtidos de distintas partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água ou da compressão de pericarpos de frutos cítricos, originando misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES, 2003). Os óleos essenciais são utilizados pela indústria de perfumaria, produtos de limpeza, indústria de alimentos, química e de medicamentos, o volume de produção e consumo desta matéria-prima é, em grande parte, devido à eficácia da indústria brasileira de cosméticos (SOUZA et al., 2010). O faturamento da Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, o qual enquadra-se os óleos essenciais, apresentou um crescimento considerável nos últimos 19 anos, tendo passado de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 43,2 bilhões em 2014 (ABIHPEC, 2015).

Tendo em vista uma pesquisa levantada em herbários localizados no estado do Paraná, a espécie *Baccharis dracunculifolia* teve a sua ocorrência catalogada em 79 municípios: Dois Vizinhos, Ibiporã, Campo Mourão (DVPR, 2015); Balsa Nova, Tuneiras do Oeste, Curitiba, Colombo, Piraquera, Quatro Barras, Pinhão, Cândói, Campo Magro, Mandirituba (EFC, 2015); Londrina, Guaraqueçaba, Sertanópolis, Apucarana, Califórnia, Tamarana, Castro, Tibagi, Arapongas, São Jerônimo da Serra, Campo Magro, Campo do Tenente, Roncador, Goio-erê, Engenheiro Beltrão (FUEL, 2015); Tuneiras do Oeste, Moreira Sales, Carambeí, Ventania, Santo Antônio do Sudoeste, Janiópolis, Mamborê, Lindianópolis, Roncador, Araruna, Prudentópolis, Jaguariaíva, Cianorte, Santa Izabel do Oeste, São Mateus do Sul, Ubiratã, Luiziana (HCF, 2015); Irati (HUCO, 2015); Nova Esperança, Maringá, Querência do Norte, Cianorte, São Pedro do Paraná, Cândói, Diamante do Norte (HUEM, 2015); Colombo, Balsa Nova, Jaguariaíva, General Carneiro, São Jerônimo da Serra (IRAI, 2015); Amaporã, Mangueirinha, Piraquara, Palmeira, São José dos Pinhais, Pato Branco, Ivaí, Guarapuava, Vila Alta, Pitanga, Antonina, Terra Rica, Rio Negro, Arapoti, Fazenda Rio Grande, Tibagi, Lapa, Foz do Iguaçu (MBM, 2015); Salto do Lontra (REAL, 2015); Laranjeiras do Sul, Guaraqueçaba, Telêmaco Borba, São Luiz do Purunã (UPCB, 2015).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a similaridade fitoquímica de populações de alecrim-do-campo e a produção de metabólitos secundários da espécie em condições de campo

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar populações de *B. dracunculifolia* com alto teor e qualidade de óleo essencial de indivíduos com dispersão em ambientes distintos.
- ✓ Avaliar a propagação vegetativa (estaquia) da espécie de *B. dracunculifolia*, com a utilização diferentes substratos e reguladores de crescimento;
- ✓ Avaliar o desenvolvimento de mudas de *B. dracunculifolia* obtidas de sementes em condições de campo sob diferentes níveis de adubação nitrogenada;
- ✓ Avaliar o efeito da adubação nitrogenada sobre o acúmulo de biomassa e composição fenólica e de óleos essenciais nos diferentes estádios fenológicos de *B. dracunculifolia*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de plantas matrizes de *B. dracunculifolia* a campo

A parte aérea de indivíduos de *B. dracunculifolia* serão coletadas a campo em São Luiz do Purunã, Palmeira, São José dos Pinhais e Piraquara. No total serão coletados 10 acessos de *B. dracunculifolia* (Tabela 1). Desses acessos, dois serão coletados em São Luiz do Purunã, dois em Palmeira, três em São José dos Pinhais e por fim três acessos em Piraquara. No município de Palmeira, o material vegetal será coletado na Reserva particular do patrimônio natural (RPPN) Butuquara. O material coletado será transportado para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (Universidade Federal do Paraná) onde será realizada a extração e a análise química dos óleos essenciais e dos extratos hidroalcóolicos da *Baccharis dracunculifolia*. Com base nos teores e na composição química do material, serão selecionadas plantas matrizes de um dos acessos destes municípios para a obtenção de mudas.

Tabela 1 – Locais de coleta de *B. dracunculifolia* no estado do Paraná e suas coordenadas geográficas.

Municípios	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
São Luiz do Purunã 1	25°28'40''	49°42'22''	1055
São Luiz do Purunã 2	25°28'13''	49°43'42''	1037
Palmeira 1	25°19'80''	49°48'35''	1027
Palmeira 2	25°28'18''	49°38'42''	1194
São José dos Pinhais 1	25°39'77''	49°08'80''	835
São José dos Pinhais 2	25°43'95''	49°05'75''	999
São José dos Pinhais 3	25°45'047''	49°01'91''	886
Piraquara 1	25°32'19''	49°04'35''	908
Piraquara 2	25°30'64''	49°02'06''	916
Piraquara 3	25°30'309''	49°00'548''	940

4.2 Extração e quantificação do óleo essencial

Para a extração do óleo essencial serão utilizadas amostras de 100 g de massa fresca de folhas da parte aérea útil, definida como o caule de até 2 milímetros de diâmetro, verde e com folhas, sendo esta considerada a parte da

planta produtora de óleo essencial. A extração será realizada por hidrodestilação em aparelho Clevenger por 2 horas e trinta minutos, utilizando-se 100 g de massa fresca em 1 litro de água destilada. Adicionalmente, serão pesadas 20g de folhas da parte aérea, em três repetições, para secagem em estufa (65°C) até atingir massa constante. Em seguida, as amostras serão novamente pesadas e o rendimento da extração atribuído à diferença de massas antes e após a secagem em estufa, sendo expresso em g/g. O óleo extraído será armazenado em freezer -20°C até o momento da análise.

As análises para a determinação da composição química dos constituintes majoritários do óleo essencial serão realizadas via técnica de cromatografia em fase gasosa (CG), de acordo com a metodologia descrita por Santos et al., (2012b). Para isto será utilizado cromatógrafo gasoso (Varian CP 3800), equipado com coluna capilar HP5 (5%-fenil-95%-metilsilicone, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) e detector FID (250°C). A temperatura do injetor será de 250°C, utilizando-se o gás hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹) na temperatura de 40°C e a quantidade de amostra injetada 1,0 µL. A temperatura inicial do forno será de 60°C, elevando-se a 240°C na razão de 3°C por minuto e split 1/20. Os componentes do óleo serão analisados por CG acoplado à espectrometria de massas (CG-EM) em sistema Agilent 5973N; coluna capilar HP5MS (5%-fenil-95%-metilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A identificação dos constituintes do óleo será realizada através de pesquisa na esctroteca (Wiley 6ª edição), comparando-se os índices de retenção calculados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

4.3 Preparação do extrato e determinação da composição fenólica

As amostras secas da parte aérea (500mg) serão adicionadas a 25 mL de solução etanol P.A 70% (v/v), maceradas com auxílio de graal e pistilo e incubadas, no escuro, por 24 horas. O extrato hidroalcoólico será filtrado em suporte de celulose, sob vácuo, completando-se o extrato para 25 mL, conforme metodologia previamente descrita (POPOVA et al., 2004). Os extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* serão analisados também por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os extratos hidroalcoólicos

(10 µl) das biomassas vegetais serão injetadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu RID-10A), equipado com uma coluna C18 de fase reversa (BioBasic-18, 150mm x 4,6mm Ø, 5µm) termostaticada a 40°C e detector de arranjo de diodos. As amostras serão eluídas com fluxo 0,8 ml/min, utilizando um gradiente linear de ácido fórmico 0,5% (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), a saber: (0-10 min) 15% B, (10-55 min) aumento gradativo para 70% B e (55-60 min) redução de B a 15%. Para a quantificação dos compostos de interesse, uma curva padrão externa de Artepillin C/ml será utilizada. A identificação dos compostos fenólicos será realizada através da comparação dos tempos de retenção das amostras de padrões autênticos de flavonoides e ácidos fenólicos, e.g., pinocembrina, quercetina, ácido *p*-cumárico, crisina e artepillin C.

4.4 Análises Multivariadas

Com o objetivo de identificar as similaridades e as discrepâncias dos 10 acessos de *Baccharis dracunculifolia* coletados em quatro municípios do estado Paraná, serão realizadas as análises multivariadas a partir dos cromatogramas gerados pelas análises cromatográficas (GC e CLAE). Os dados gerados serão exportados para o Excel® no formato de arquivo.csv e submetidos à análise estatística multivariada, via cálculo dos componentes principais (PCA) e análise hierárquica (HCA). Para isso, *scripts* escritos em linguagem R (v. 3.1.1) serão utilizadas, utilizando ferramentas definidas pelos pacotes Specmine (COSTA et al., 2015), Chemospec (HANSON, 2012) e HyperSpec (BELEITES, 2011). As análises de PCA e HCA podem ser úteis na extração de informações relevantes dos dados analisados, minimizando redundâncias e caracterizando a relação entre as variáveis estudadas, possibilitando dessa maneira a escolha do acesso de *B. dracunculifolia* mais promissor à confecção de mudas.

4.6 Produção de mudas por semente

Em seguida, serão produzidas mudas de *B. dracunculifolia* por semente, a partir das plantas matrizes selecionadas no campo quanto ao teor e composição de seus óleos essenciais e dos extratos hidroalcoólicos. Os aquênios de *B. dracunculifolia* serão coletados a campo, acondicionados em sacos de papel e secos à temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas. As sementes serão colocadas em tubetes cilindro-cônicos de polietileno com volume de 50 cm³, preenchidos com substrato comercial Carolina Soil®, com temperatura e irrigação controladas até o transplante das mudas para o campo, conforme metodologia previamente descrita (SANTOS et al., 2012a).

4.5 Propagação vegetativa (estaquia) de *B. dracunculifolia*

O estudo da estaquia de *B. dracunculifolia* será realizado em dois delineamentos distintos. O primeiro delineamento irá abordar a interação entre substrato e diferentes partes do ramo da planta. O segundo avaliará a propagação da estaca utilizando diferentes concentrações do regulador de crescimento vegetal AIB. Os experimentos serão conduzidos em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo – UFPR.

Delineamento 1: As estacas de *B. dracunculifolia* (15cm) serão retiradas de diferentes partes do ramo: basal, mediana e apical. As estacas serão plantadas em tubetes, utilizando três substratos: Plantmax®, solo e vermiculita, em casa-de-vegetação, com temperatura e irrigação controladas, até o enraizamento das estacas, conforme metodologia adaptada de Bona et al., (2005). O delineamento experimental será inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, o experimento consistirá em um fatorial 3x3, utilizando-se 15 estacas por parcela. Ao final do experimento serão avaliadas a taxa de sobrevivência (%), enraizamento (%), brotação (%), massa seca de raízes/estaca (mg) e número de raízes/estaca (mg).

Delineamento 2: Estacas de *B. dracunculifolia* (15 cm) serão retiradas da porção apical do ramo da planta, e submetidas aos tratamentos com quatro diferentes concentrações de AIB (líquido: 1.000 mg/L, 2.000 mg/L, 4.000 mg/L

e 8.000 mg/L) e testemunha (água e etanol P.A). O delineamento experimental será inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, utilizando-se 15 estacas por parcela. O plantio será realizado com substrato Plantmax® em tubetes, com temperatura e irrigação controladas, até o enraizamento das estacas, conforme metodologia adaptada de Bona et al., (2005). Serão avaliadas a taxa de sobrevivência (%), enraizamento (%), brotação (%), massa seca de raízes/estaca (mg) e número de raízes/estaca (mg).

4.7 Plantio a campo de mudas de *B. dracunculifolia*

O experimento será conduzido no Centro de Estações Experimentais do Canguiri (CEEx) - UFPR no município de Pinhais, Região Metropolitana de Curitiba (S 25°23'258"S, 49°07'713"O), com 919 m de altitude e clima úmido meso-térmico (MONTEIRO, 2009). Para a análise do solo será realizada uma amostragem conforme a recomendação da Comissão de Química e Fertilidade do Solo de RS e SC (2004), na profundidade de 0-20 cm. A amostra de solo será analisada no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Solos da Universidade Federal do Paraná, de acordo com a metodologia descrita por Pavan et al., (1992). No plantio a campo serão utilizadas mudas de *B. dracunculifolia* obtidas por propagação via sementes. De acordo com protocolo adaptado de Santos et al., (2012a), o plantio será realizado 60 dias após a semeadura, em covas, no espaçamento 1,0 x 1,0 m, entre plantas e linhas. A adubação utilizada neste experimento será nitrogenada (uréia), nas doses 0, 10, 20, 40 e 80 kg de N/ha⁻¹. A adubação será misturada com a terra retirada para a abertura da cova e colocada novamente na cova de plantio. O delineamento experimental será em blocos completos casualizados (BCC) e quatro repetições. Para o experimento cada parcela será constituída de 16 mudas, sendo que destas, 6 plantas serão consideradas úteis para as análises e as outras 10 plantas constituirão a bordadura da parcela. No total serão plantadas 256 mudas de *B. dracunculifolia* e destas 96 plantas serão consideradas úteis. O espaçamento entre as parcelas e entre os blocos será de 2m e a área total do experimento de 352 m². A área de cultivo será conduzida dentro dos critérios de boas práticas agrícolas, sendo mantida limpa de invasoras.

4.8 Análise da composição fenólica e de óleos essenciais ao longo dos estádios fenológicos de *B. dracunculifolia*

Ao longo dos estádios fenológicos de *B. dracunculifolia* serão realizadas coletas para as análises fitoquímicas de seu material vegetativo. As amostras coletadas serão analisadas quanto aos seus perfis de composição fenólica e de óleos essenciais via técnicas cromatográficas, como, cromatografia gasosa (vide item 4.2) e cromatografia líquida de alta eficiência (vide item 4.3).

4.9 Análises estatísticas

Os dados das variáveis acima referidas serão submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma e de duas vias e quando necessário seguido de teste “post hoc” de Tukey ($P < 0,05$) com suporte dos programas GraphPad Prism 5 e GraphPad InStat 3.06. Todas as análises serão realizadas em triplicata ($n=3$).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABIHPEC - **Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria** (2015). Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2015-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-11ago2015.pdf>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [2] ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4th ed. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL. 2007.
- [3] AMARAL, A. S.; RADUNZ, L. L.; MOSSI, A. J.; SANTI, A.; ROSA, N. M. F. F.; FEITEN, F. Rendimento de matéria seca e de óleo essencial de *Baccharis trimera* com adubação química e orgânica. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.9, n.1, p. 20-28, 2010.
- [4] ALPHA LABORATORIES - **Artepillin C propolis Brazilian green honey bee antioxidant immunomodulator anticancer anti inflammatory Wako** (2015). Disponível em: <<http://www.alphalabs.co.uk/016-19131>>. Acesso em: 04 maio de 2016.
- [5] ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.5, p.1679-1687, 2005.
- [6] BARROSO, G.M.; O.L. BUENO. Plantas Compostas- Subtribo: Baccharidinae. **Flora Ilustrada Catarinense**, 2002. 304 p.
- [7] BELEITES, C. **Import and Export of Spectra Files**, p.1–20, 2011.
- [8] BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. 1. ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.
- [9] BONA, C. M. D.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.223-226, 2005.
- [10] COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de Adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 1 ed. Porto Alegre, SBCS. Núcleo Regional Sul, 2004, 400p.

- [11] COSTA, C.; MARASCHIN, M. ROCHA, M. **Specmine: Metabolomics and Spectral Data Analysis and Mining**. R package version 1.0, 2015.
- [12] **DVPR - Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos**. <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=DVPR>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [13] **EFC - Herbário Escola de Florestas Curitiba**. <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=EFC>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [14] FERRACINI, V.; PARAIBA, L. C.; LEITÃO FILHO, A. G.; DA SILVA, L. R.; NASCIMENTO, E; MARSAIOL, A. J. Essencial oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v.7, p.355-367, 1995.
- [15] **FUEL - Herbário da Universidade Estadual de Londrina**. <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=FUEL>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [16] GIULIETTI, A. M.; MENEZES, N.L.; PIRANI, J.R.; MEGURO, M.; WANDERLEY, M.G.L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. **Boletim de Botânica**, v.9, p.1 - 151, 1987.
- [17] GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, V.16, N.4, P-421-427, 2002.
- [18] HARTMAN, H. T.; KESTER, D. E.; JR, F. T. D.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. Englewood Cliffs : Prentice-Hall. 1990. 647p.
- [19] HARTMAN, H. T.; KESTER, D. E.; JR, F. T. D.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles e practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.
- [20] HANSON, B. A. **ChemoSpec: An R Package for Chemometric Analysis of Spectroscopic Data and Chromatograms (Package Version 2.0-2)**, p.1–41, 2014.

- [21] **HCF - Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão.** <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=HCF>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [22] **HUCO - Herbário da Universidade Estadual do Centro-Oeste.** <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=HUCO>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [23] **HUEM - Herbário UEM.** <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=HUEM>> . Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [24] **IRAI - Herbário do Parque da Ciência Newton Freire Maia.** <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=IRAI>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [25] JULIÃO, G.R.; FERNANDES, G.W.; NEGREIROS, D.; BEDÊ, L.; ARAÚJO, R.C. Insetos galhadores associados a duas espécies de plantas invasoras de áreas urbanas e peri - urbanas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.49, p.97 - 106, 2005.
- [26] LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M. HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.27, n.6, p.916-919, 2004.
- [27] **MBM - Herbário do Museu Botânico Municipal.** <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=MBM>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [28] MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA, M.C.; REZENDE, A.R.; FIGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E., FAGG, C.W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12356 espécies. 2. Ed. **Cerrado: Ecologia e Flora – Embrapa Informação Tecnológica**, 2008. p.423 - 1279.
- [29] MONTEIRO, R. **Desenvolvimento de Menta e produção de óleo essencial sob diferentes condições de manejo.** 2009, 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2009.

- [30] NEGREIROS, D.; ESTEVES, D.; FERNANDES, G. W.; VICHATO, M.; OKI, Y.; ROSA, B. M. D. **Desenvolvimento de plântulas de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) em um gradiente nutricional.** Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço (MG), 2009
- [31] OLIVEIRA, V.D.C.; BASTOS, E.M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* Dc. (Asteraceae) visando à identificação da origem botânica da própolis. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, p.431-439, 1998.
- [32] PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1100-1103, 2004.
- [33] PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F.; ZEMPULSKI, H. C.; MIYAZAWA, M.; ZOCOLER, D. C. **Manual de análise química de solo e controle de qualidade.** IAPAR, Londrina, 1992. (IAPAR. Circular 76).
- [34] POPOVA, M; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETROV, V.; DAMYANOVA, B. N.; SABATINI, G.; MARCAZZAN, L.; BOGDANOV, D. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar- type propolis. **Phytochemical Analysis**, v.5, p.235-240, 2004.
- [35] QUEIROGA, C.L. **Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.** 1989. 193p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1989.
- [36] **REAL - Coleção Biológica Realeza.** <<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=REAL>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.
- [37] SALATINO, A. TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.33–38, 2005.
- [38] SANTOS, R.F.; ISOBE, M.T.C.; LALLA, J.G.; HABER, L. L.; MARQUES, M.O.M.; MING, L.C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da

adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.224-234, 2012a.

[39] SANTOS, V. M. C. S. **Estudos agronômicos de menta para a produção de óleo essencial e de mentol**. 2012, 163f. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012b.

[40] SFORCIN, J. M.; SOUSA, J. P. B.; FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; BÚFALO, M. C.; TONUCCI, L. R. S. **Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2012. 100p.

[41] SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, M. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2000. 821p.

[42] SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S. D.; MARTINS, E. R. Óleos essenciais: Aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.10, 2010.

[43] SOUZA, J. P. B. LEITE, M. F.; JORGE, R. F.; RESENDE, D. O. FILHO, A. A.S.; FURTADO, N. A. J. C.; SOARES, A. E. E.; SPADARO, A. C. C.; MAGALHÃES, P. M; BASTOS, J. K. Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, p. 1-8, 2009a.

[44] SOUZA, J. P .B.; , FILHO, A. A. S.; FURADO, N. A. J. C.; LEITE, M. F.; QUEIROGA, C. L. Seasonal variation of the (E)-nerolidol and other volatile compounds within ten different cultivated populations of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 308–314, 2009b.

[45] SPECIESLINK – **speciesLink** (2015). Disponível em: <<http://www.splink.org.br/index?lang=pt>>. Acesso em: 20 outubro de 2015.

[46] TEIXEIRA, E. W. NEGRI, G.; MEIRA, R. M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. v.2, p.85-92, 2005.

[47] **UPCB - Herbário do Departamento de Botânica.** <
<http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=UPCB>>. Acesso em: 18 outubro de 2015.

