

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS**

**Ecofisiologia, morfo- anatomia e atividade antifúngica de *Protium altsonii* Sandwith**

**(Burseraceae): um estudo da semente até a fase adulta**

**Luciedi de Cássia Leoncio Tostes**

**Manaus, Amazonas**

**Outubro, 2015**

**LUCIEDI DE CÁSSIA LEONCIO TOSTES**

**Ecofisiologia, morfo- anatomia e atividade antifúngica de *Protium altsonii* Sandwith  
(Burseraceae): um estudo da semente até a fase adulta**

Orientador: José Francisco de Carvalho Gonçalves, Dr.

Co-Orientador: Alberdan da Silva Santos, Dr.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA para obtenção do título de doutora em Ciências de Florestas Tropicais.

Manaus, Amazonas

Outubro, 2015

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Nxxx Tostes, Luciedi De Cássia Leoncio

Ecofisiologia, morfo-anatomia e atividade antifúngica de *Protium Altsonii* Sandwith (Burseraceae): Um estudo da semente até a fase Adulta / Luciedi De Cássia Leôncio Tostes. ---Manaus: [s.n], 2015.

Xv, 161f. il (algumas color)

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2015.

Orientadores: José Francisco de Carvalho Gonçalves , Alberdan da Silva Santos.

Área de concentração: Morfologia Vegetal, Fisiologia Vegetal, Bioquímica Vegetal.

1. RDS Iratapuru 2. Óleo. 3. Breu branco 5. Moléculas bioativas. 6. Conservação. I. Título.

CDD xxxxxxxxx

**Sinopse:**

O objetivo desse estudo foi investigar mecanismos adaptativos e a autoecologia de *Protium altsonii*, a partir da morfoanatomia, ecofisiológicos e bioquímica, com vistas no desempenho funcional e produção de moléculas bioativas da espécie.

## DEDICO E AGRADEÇO

A meus pais Edgard Tostes e Lucília Tostes;

*São, e sempre serão importantes no meu destino e em minhas conquistas.*

A meu companheiro Marcelo Carim

*Pelo apoio e dedicação.*

A meus filhos queridos do coração Felipe Veiga, Marcelo Segundo, Juliana Carim, Daniel Carim;

*Pelo apoio, amor e compreensão.*

A meus irmãos Ediluci Tostes, Edgard Júnior e Othelo Neto;

*Pelo apoio, amor e compreensão.*

A meus sobrinhos Leonardo, Carol, Kalil, Matheus e aos dois pequenos que chegaram Lucília e Lucas.

*Pela fofura e ternura.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus Mentores espirituais que sempre estiveram comigo em todos os meus momentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de doutorado;

Ao meu orientador Dr. José Francisco pela orientação, confiança, respeito, amizade, oportunidade e contribuição à minha formação profissional e pessoal desde o início de meus estudos na Pós-Graduação do INPA;

Ao Dr. Alberdan Silva Santos pela orientação, confiança, respeito, amizade;

Ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA pelo apoio logístico;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amapá pela contribuição financeira durante a execução do projeto;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais (PPG-CFT) pela oportunidade de desenvolver o trabalho de doutorado;

Aos amigos Dr. Admilson Torres pelas diversas discussões da tese; Dr. Mauricio Abdon pela amizade e análises estatísticas; ao Dr. Salustiano Neto pela ajuda nas discussões;

Ao amigo José Renan Guimarães por toda ajuda durante as coletas e formatação da tese;

A minha aluna de PIBIC Danielle Monteiro Vasconcelos pela ajuda carinhosa na formatação da tese;

A Universidade Federal do Pará-UFPa, por meio do Labisisbio para a Marcia, Andréa, Suellen, Silvana, Laisa, André, Marcela, Hugo, o meu muito obrigada;

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímicas Vegetal do INPA em especial a Dra Larissa, minha amiga Aurora Maria, Ana Maria, Sabrina, Karen Costa, Vinicius, Gleisson;

Ao amigo Dr. Diego Souza pela ajuda nas análises antifúngicas;

A Embrapa- Amapá pela realização das análises dos macronutrientes;

A Embrapa- Manaus pela realização das análises dos macros e micronutrientes foliares;

Ao Museu Paraense Emilio Goeldi- MPEG por toda assistência à parte morfologia da tese, em especial a Dr. Alba Lins pelas discussões durante a tese;

A minha família que sempre incetivou todas as minhas conquistas;

Aos amigos de Manaus André Luis, Juliana, Marta;

A minhas amigas Cristina Veiga e Maria Antonia Veiga pelo incentivo, amor, respeito e por sempre me ajudarem da melhor forma possível;

A amiga Natalina Veiga e Simone Veiga pelo respeito e por toda assistência sempre;

Ao Dr. Ulysses Santos Junior pela amizade, convivência e imprescindível ajuda e discussões durante o preparo desta tese;

Às secretárias do PPG-CFT Ana e a Valdecira por todo apoio prestado durante minhas atividades no doutorado;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais pelos ensinamentos transmitidos;

A Comunidade RDS Iratapuru por toda a colaboração durante esse trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Botânica, IEPA, em especial a Socorro Flexa pela ajuda na confecção das exsiccatas;

Aos funcionários do IEPA, INPA, EMBRAPA, MPEG e UFPa que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

*“Quero dias diferentes, pessoas que me acrescentem, quero vida e muita alegria ao meu redor, quero luzes coloridas e brilhantes, quero paz, quero amor, quero a liberdade de saber quem eu sou”.*

## RESUMO

A floresta amazônica apresenta uma grande diversidade vegetal, e consequentemente, molecular, que poderá ser entendida como fonte de estudos para geração de produtos de interesse científica e tecnológico. *Protium altsonii* Sandwith é nativa da Amazônia. Tem também representantes de importância econômica no estado do Amapá, denominados de “breu branco”, que exsuda uma resina branca, volátil, de odor almiscarado usado pela comunidade de São Francisco (RDS). A maioria das pesquisas sobre *Protium* restringem-se a descrição de seus compostos químicos, bastante utilizados pela indústria. Estudos ecofisiológicos e morfológicos são escassos e, por este motivo, ainda não se tem informações precisas a respeito do status de conservação dessas espécies. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar *P. altsonii*, mediante o estudo de aspectos eco e morfofisiológicos, visando contribuir para o conhecimento da autoecologia da espécie, além, do aproveitamento e o controle de produção de moléculas bioativas com potencial farmacológico e/ou industrial. Foram coletados frutos na Reserva Iratapuru- Jarí, onde foram descritos morfológicamente e anatomicamente, além da morfoanatomia das folhas jovens e maduras e do tronco. Foram também germinados e acompanhados até a fase de plântulas. Foi determinado o crescimento e ganho de biomassa, teores de macro e micronutrientes foliares, teores de cloroplastídios fluorescência da clorofila e anatomia quantitativa foliar. Também foram identificados os constituintes químicos dos óleos essenciais por cromatografia e realizado a prospecção fitoquímica dos extratos e óleo, além dos testes antifúngicos. Os frutos são globosos a ovoides, com ápice levemente agudo e estipitado curto, apresentam um e, mais raramente, dois pirênios por frutos. As sementes são exalbuminosas, com dormência tegumentar, imaturidade embrionária e presença de substâncias fenólicas. Apresentam baixo percentual germinativo. Em corte transversal, na região abaxial, a semente madura de *P. altsonii* é formada por revestimento do envoltório seminal com células colapsadas e com parênquima cotiledonar carnoso com cavidades secretoras e presença de óleo. Para o crescimento em altura e diâmetro do coleto, os maiores valores foram observados nas plantas submetidas a um nível intermediário de irradiância e os menores valores nas plantas submetidas à baixa irradiância. Os teores foliares de nitrogênio variaram de 14,5 a 15,9 g kg<sup>-1</sup> entre os tratamentos, com os maiores valores observados nas plantas de sombra, comparado com os demais tratamentos. Quanto às variáveis de fluorescência da clorofila *a* verificou-se que as plantas quando submetidas a maior irradiância elas exibiram diminuição da eficiência no uso da energia, no tratamento intermediário e pleno sol, como indicativo de fotoinibição crônica. Contudo, com a emissão de novas folhas adaptadas ao novo ambiente de irradiância, e após maduras, o que ocorreu dois meses depois do início do experimento, as plantas exibiram recuperação da sua eficiência fotoquímica com características anatómicas e fisiológicas mais adequadas as novas condições. Os óleos essenciais da resina de nove amostras de *P. altsonii* conduziram a identificação de 86 compostos químicos, representando 98 - 100 % dos constituintes dos óleos essenciais. Os monoterpenos foram predominantes em todas as amostras, embora o conteúdo de sesquiterpenos em algumas amostras tenha sido em torno de 38,05 %. Além disso, diferenças importantes na variação da composição química e nas quantidades dos constituintes de acordo com o período registrado. Portanto, a presença de diversas substâncias químicas, atrelada ao a variabilidade do perfil químico estabelecido para cada tipo de coleta. A avaliação do efeito fungitóxico foi aplicado às amostras dos óleos resina de *P. altsonii* e se observou que os óleos 1 (perfil PA), 2 (PB) e 5 (PE) apresentaram a melhor atividade fungitóxica frente aos fungos filamentosos *A. ninger* e *F. oxysporum* com formação de halos de inibição acima de 1,0 cm, alguns correspondendo a quase 50% de atividade a mais que o controle positivo (nitrato de miconazol). *P. altsonii* é uma potencial fonte de agentes antifúngicos. Esse estudo permitiu uma integração entre diferentes áreas do

conhecimento, agregando resultados importantes para Burseraceae e o gênero *Protium*. Os resultados obtidos nessa tese através da morfologia, ecofisiologia, fitoquímica e atividade antifúngica permitem dizer que *P. altsonii* é uma espécie que apresenta uma grande plasticidade fenotípica em áreas de florestas e um potencial enorme para fins industriais.

**Palavras-chaves:** Anatomia, Burseraceae, Breu branco, Fungos, Fotossíntese, Variabilidade química.

## ABSTRACT

The Amazon forest presents a great vegetable and, therefore, molecular diversity, which can be understood as a source of studies for the generation of products of scientific and technological interest. *Protium altsonii* Sandwith is native from Amazon. There are also representatives of economic importance in the state of Amapá, called as “white pitch”, which exudes a white resin, volatile, with a musky scent, used by the community of San Francisco (RDS). Most of the researches on *Protium* restrict to the description of its chemicals compounds, widely used by the industry. Ecophysiological and morphological studies are spare and, for that reason, there is no accurate information regarding the conservation status of these species yet. In this way, the aim of this study was investigating *P. altsonii* throughout the study of ecophysiological and morphological aspects, aiming to contribute for the knowledge of the autoecology of the specie and, in addition, the better use and control of the production of bioactive molecules with a pharmacological and/or industrial potential. There were collected fruits in the Iratapuru-Jari Reserve, where they were morphologically and anatomically described, besides the morphoanatomy of young and ripe leafs and the trunk. They were also germinated and monitored until the stage of seedling. There were determined the growth and the gain of biomass, the concentration of foliar macronutrients and micronutrients, chloroplasts content, chlorophyll fluorescence and foliar quantitative anatomy. Likewise, there were identified the chemical components of the essential oils by chromatography and conducted the phytochemical prospection of the extracts and oil, in addition to the antifungal tests. The fruits are globose to ovoid, with slightly acute apex and short stipitate, showing one and, more rarely, two stones per fruit. The seeds are non-albumenized, with tegumentary dormancy, embryonic immaturity and the presence of phenolic substances. They present low germinative percentage. In transversal cut in the abaxial region, the ripe seed of *P. altsonii* is formed by coating of seminal wrap with collapsed cells and fleshy cotyledonary parenchyma with secreting cavities and presence of oil. For the growth in height and diameter of the root crown, the highest values were observed in plants submitted to an intermediary level of irradiance, and the lowest values in plants submitted to low irradiance. The nitrogen foliar content varied from 14,5 a 15,9 g kg<sup>-1</sup> between treatments, with the highest values observed in shadow plants, comparing to other treatments. Regarding the fluorescence variables of chlorophyll *a*, it was verified that when plants were submitted to a higher irradiance, they presented a decrease in the energy use efficiency, in the intermediary treatment and full sun, as an indicative of chronic photoinhibition. However, with the emission of new leaves adapted to the new environment of irradiance, and after ripe – what happened two months after the beginning of the experiment –, the plants exhibited recovery of their photochemical efficiency with anatomic and physiological features more suitable to the new conditions. The essential resin oils of nine *P. altsonii* samples led to the identification of 86 chemical compounds, representing 98-100% of essential oils components. The monoterpenes were prevailing in all samples, although the content of sesquiterpenes in some samples was around 38,05%. Besides, there are some important differences in the variation of chemical composition and the quantities of components according to the period registered. Therefore, the presence of various chemical substances, coupled with the variability of the chemical profile established for each type of collection. The evaluation of the fungitoxi effect was applied to the resin oil samples of *P. altsonii* and it was observed that oils 1 (PA profile), 2 (PB) and 5 (PE) presented a better fungitoxic activity on filamentous fungus *A. ninger* and *F. oxysporum*, with the formation of zones of inhibition over 1,0cm, some corresponding to almost 50% more activity than the positive control (miconazole nitrate). *P. altsonii* is a potential source of antifungal agents. This study allowed the integration of different areas of knowledge adding important results

for Burseraceae and the *Protium* gender. The results obtained in this thesis through morphology, ecophysiology, phytochemistry and antifungal activity enable to affirm that *P. altsonii* is a specie which shows a great phenotypic plasticity in forest areas and a large potential for industrial purposes.

Key-words: Anatomy, Burseraceae, White pitch, Fungal, Photosynthesis, Chemical Variability.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
Bursraceae Kunth.....	17
<i>Protium</i> spp.....	19
Estudos morfológicos.....	20
Química e Farmacologia de <i>Protium</i> .....	20
JUSTIFICATIVA.....	26
HIPOTESIS .....	27
OBJETIVOS.....	27
Objetivo geral.....	27
Objetivos específicos.....	27
CAPÍTULO I. Estudo morfoanatomico de <i>Protium altsonii</i> Sandwith.....	29
Resumo.....	30
Introdução.....	32
Material e métodos.....	32
Resultados.....	38
Discussão.....	52
Conclusão.....	45
Referências.....	58
CAPÍTULO II. Efeitos do ambiente lumínico sobre a morfofisiologia foliar de plantas jovens de <i>Protium altsonii</i> Sandwith.....	65
Resumo.....	66
Introdução.....	68
Material e métodos.....	70

Resultados.....	74
Discussão.....	79
Conclusão.....	85
Referências.....	86
CAPÍTULO III. Variabilidade de metabólitos secundários e atividade antifúngica do óleo de âmbar resina emitida por <i>Protium altsonii</i> Sandwith (Burseraceae).....	92
Resumo.....	93
Introdução.....	95
Material e métodos.....	96
Resultados.....	104
Discussão.....	119
Conclusão.....	123
Referências.....	124
CONCLUSÃO GERAL.....	129
REFERENCIAS GERAIS.....	129

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO II

Tabela 1. Área foliar específica (AFE), taxas de crescimento em altura (TC-a), diâmetro do coleto (TC-d), massa seca foliar (TCMSF), massa seca caulinar (TCMSC), massa seca radicular (TCMSR) e total (TCMST) de plantas jovens de <i>Protium altsonii</i> submetidas a três níveis de irradiância.....	75
Tabela 2. Teores foliares de macro e micronutrientes de plantas jovens de <i>Protium altsonii</i> submetidas a três níveis de irradiância.....	76
Tabela 3. Teores de pigmentos cloroplastídicos de plantas jovens de <i>Protium altsonii</i> submetidas a três níveis de irradiância. Clorofila a (Chl a), Clorofila b (Chl b), Clorofila total (ChlTot), carotenoides (Cx+c) e razões Clorofila a / Clorofila b (Chl a / Chl b) e Clorofila total / Carotenóides (ChlTot/Cx+c).....	76
Tabela 4. Variáveis do teste JIP referentes à análise do comportamento do aparato fotoquímico de plantas jovens de <i>Protium altsonii</i> submetidas a três níveis de irradiância. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (FV/FM); Banda K (Kband); Fase I-P (IPphase); Efetividade do processo de transferência de elétrons na redução dos aceptores finais do PSI (Yro); Indica; Índice de desempenho na base ABS (PIABS); Índice de desempenho total (PItotal).....	78
Tabela 5. Variáveis anatômicas de folhas de plantas jovens de <i>Protium altsonii</i> submetidas a três níveis de irradiância. Espessura do mesófilo (EM); espessura do parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL), espessura da epiderme superior (EES) e inferior (EEI), Densidade estomática; comprimento (CCG) e largura (LCG) da célula guarda; comprimento (CPE) e largura (LPE) do poro estomático.....	79

### CAPITULO III

Tabela 1. Porcentagens e rendimento dos constituintes químicos de <i>Protium altsonii</i> Sandwith.....	107
---	-----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A - E – Características morfológicas da árvore de <i>Protium</i> spp A: Indivíduo com sapopemas tabulares e exsudando uma resina branca com odor agradável. B: Injúria mecânica na madeira, exsudando gotículas de óleo (seta). C: Injúria através da larva do inseto da família Curculionidae; D: Caule com injúria no tronco em razão da coleta de amostra da madeira. E: Corte paralelo ao tronco, resina ainda não exsudada (seta). F: Resina já exsudada no tronco (seta).....	18
Figura 2. Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.....	22

### CAPITULO I

Figura 1. Estudos morfológicos de <i>Protium altsonii</i> Sandwith A: Ramo de inflorescência; B: Detalhe das flores miúdas e amarelas; C: Ramo de infrutescência; D: Semente com cicatriz funicular (seta); E: Epicarpo reticulado (seta); F: Frutos ovoides e imaturos; G: Detalhe do endocarpo; H: Detalhe de resto de mesocarpo no pirenio; I: Detalhe dos cotilédones contortuplicados (setas) .....	39
--	----

- Figura 2. Estádios sucessivos da germinação até o desenvolvimento de plântula de *Protium altsonii* Sandwith. A: Semente com ruptura do tegumento (tg) e protrusão do eixo hipocótilo-radicular (hpr); B: Desenvolvimento da raiz primária (rp); C: Formação do epicótilo (e) e os primeiros eófilos (ef), pêlos absorventes (pab); D: Elongação do epicótilo (e), formação dos folíolos (fo), crescimento das raízes secundárias (rs); plântula criptocodiledonar com 12 meses..... 41
- Figura 3. Estádios sucessivos do desenvolvimento de plantas jovens de *Protium altsonii* Sandwith. A: Plantas com 24 meses em casa de vegetação; B: Folhas compostas, imparipinadas; C: Arquitetura foliar; D: Crescimento das raízes; E: Folhas em diferentes estádios de desenvolvimento..... 44
- Figura 4. Folhas adultas de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Ramo com cinco pares de folíolos **B.** Pulvínulo inconspícuo (seta vermelha) e lenticelas (seta branca) **C.** Folhas compostas, imparipinadas **D.** Folíolo elíptico com ápice acuminado..... 45
- Figura 5. Estudos anatômicos da semente de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Corte transversal, evidenciando o envoltório seminal, células parenquimáticas dos cotilédones cheios de conteúdo de mucilagem e compostos fenólicos **B.** Detalhe na seta da camada de endosperma reduzido e células com óleo (estrela) **C.** Corte transversal da cavidade secretora com células epiteliais, e gotículas de óleo (estrela) **D.** Corte transversal da região adaxial, separando os dois cotilédones (seta), presença de cumarina..... 47
- Figura 6. Anatomia de folhas jovens de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Corte transversal da nervura central **B.** Detalhe dos diferentes tricomas na epiderme adaxial (ep ad) e diversos canais secretores **C.** Detalhe da epiderme abaxial com substâncias fenólicas (seta vermelha), colênquima (col) e faixas de esclerênquima (seta preta) **D.** Detalhe do parênquima paliçádico (pp), lacunoso (pl) com canais (c) e estômatos (e) na epiderme abaxial..... 48
- Figura 7. Anatomia de folhas adultas de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Corte transversal da nervura central **B.** Detalhe do parênquima paliçádico com meatos (pp), lacunoso (pl) **C.** Detalhe do canal secretor e colênquima (col) **D.** Estômatos (e) na epiderme abaxial..... 50
- Figura 8. Características anatômicas gerais da madeira de *Protium altsonii* Sandwith. **A.** Vista geral do corte transversal, com numerosos vasos solitários e múltiplos (seta). Não há evidência de camada de crescimento **B.** Detalhe de uma região corte transversal, parênquima axial difuso (seta azul), células do raio apresentado conteúdo lipídico (setas pretas) **C.** Detalhe do corte longitudinal radial, os raios formados por células procumbentes envoltas por camadas de células quadradas ou eretas com conteúdo lipídico e cristais prismáticos (setas) **D.** Corte longitudinal tangencial, com raios unisseriados e bisseriados, detalhe na seta de células prismáticas **E.** Detalhe do corte longitudinal tangencial, com canal intercelular simples, no detalhe secreção de óleo **F.** Corte longitudinal da casca, com canais secretores (setas) com conteúdo lipídico..... 51
- CAPITULO II**
- Figura 1. Comportamento do aparato fotoquímico de plantas jovens de *Protium altsonii* submetidas a três níveis de irradiância. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (FV/FM); Índice de desempenho na base ABS (PIABS); Índice de desempenho total (PItotal). As setas indicam diferença entre os tratamentos. Média±Desvio Padrão..... 78

### CAPITULO III

- Fig. 1. Análise de agrupamento hierárquico dos diferentes perfis químicos de *P. altsonii*. PA: ↑ precipitação, + de frutos, resina branca. PB: ↑ precipitação, s/fruto, resina seca. PC: ↓ precipitação, queda foliar, mistura de resinas. PD: ↓ precipitação, s/flor, resina branca. PE: ↓ precipitação, c/flor, resina branca. PF: ↑ precipitação, s/flor, mistura de resinas. PG: ↑ precipitação, + de frutos, mistura de resinas. PH: ↑ precipitação, s/flor, resina oxidada. PI: ↓ precipitação, s/flor, resina oxidada..... 110
- Fig. 2. Projeções de variáveis dos diferentes perfis químicos de *P. altsonii*. PA: ↑ precipitação, + de frutos, resina branca. PB: ↑ precipitação, s/fruto, resina seca. PC: ↓ precipitação, queda foliar, mistura de resinas. PD: ↓ precipitação, s/flor, resina branca. PE: ↓ precipitação, c/flor, resina branca. PF: ↑ precipitação, s/flor, mistura de resinas. PG: ↑ precipitação, + de frutos, mistura de resinas. PH: ↑ precipitação, s/flor, resina oxidada. PI: ↓ precipitação, s/flor, resina oxidada. PC1: 69,80 %; PC2: 14,1 %..... 110
- Fig. 3. Ordenação dos dois primeiros eixos do CCA mostrando a distribuição dos macro e micronutrientes do solo e os constituintes químicos do óleo essencial dos nove perfis coletados. O eixo 1 representa 47,56 % da relação óleo e nutrientes do solo. Eixo 2: 29,44 %..... 111
- Fig. 4. Cromatografia em camada delgada em alta resolução dos extratos de *P altsonni*. A) Placa revelada com ácido sulfúrico concentrado para visualizar a presença de constituintes de óleos essenciais característica de cor amarela e vermelha em todos os perfis químicos. B) Placa visualizada em 365nm, após revelação com ácido sulfúrico 10% em etanol para detecção de alcalóides. As manchas amarelo fluorescente indicam a presença de alcaloides. C) Presença de diferentes compostos químicos. D) Após revelação com KOH. As manchas fluorescentes intensas caracterizam a possibilidade da presença das classes de cumarinas..... 113
- Fig. 5. Efeito inibitório dos óleos de *P altsonii* em nove concentrações (0,0; 0,097; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 mg/ml) sobre o crescimento vegetativo de fungos *Penicillium chrysogenum* (•▲•), *Aspergillus flavus* (—●—) e *Fusarium oxysporium* (■□•). As curvas de inibição foram expressas através de regressão não linear dos valores do logaritmo das diferentes concentrações versus percentual de inibição normalizado usando o Programa GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., California, USA)..... 116

## INTRODUÇÃO GERAL

A Floresta Amazônica Brasileira é rica em sua diversidade vegetal, e há necessidade de mais estudos científicos e tecnológicos para aumentar o conhecimento sobre sua potencialidade de uso (Carvalho et al., 2009). As espécies arbóreas nativas da Amazônia são de grande importância para o setor econômico, tanto madeireiro quanto não madeireiro (Carvalho et al., 2009). Espécies da família Lauraceae, Cyperaceae, Rutaceae já apresentam pesquisas avançadas sobre suas biomoléculas e suas atividades biológicas, além de sua utilização no mercado nacional e internacional (Vieira, 2004).

*Protium* sp., também conhecido popularmente como “breu ou almecegueira”, pertence à família botânica Burseraceae e, a utilização dessas plantas quase sempre está relacionada ao uso da resina, com odor marcante e que se solidifica no tronco da planta, muito utilizada pela população local para iluminação e calafetar embarcações, além do uso no preparo da tinta ou verniz preto (Maia et al., 2000; Bandeira et al., 2002). As folhas são usadas por serem aromáticas e, em algumas espécies, os frutos são comestíveis. Além disso, partes das plantas (cascas, folhas e frutos) são utilizadas na medicina popular como tônico, expectorante, cicatrizante e no tratamento de ulcerações e inflamações (Melo et al., 2011).

*Protium altsonii* Sandwith é nativa da Amazônia, ocorrendo nos Estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima; nordeste no Maranhão e centro-oeste no Mato Grosso (Daly, 2015). Tem também representantes de importância econômica no estado do Amapá, denominados de “breu branco”, que exsuda uma resina branca, volátil, de odor almiscarado, aplicada para usos tradicionais como calefação de embarcações, repelente, além de abastecer a empresa Natura Inovação Tecnológica com 80 toneladas/ano de pedras de bréus, o que representa um importante insumo para a indústria de perfumaria, bem como fonte de renda para a comunidade de São Francisco (RDS), Amapá-AP (Tostes et al., *in press*).

A espécie *P. altsonii* é confundida com outras espécies da própria família e com outros gêneros de Burseraceae como *Tetragastris* Gaertn. e *Trattinnickia*, Willd. onde todos são chamados de “breus amazônicos”, com características vegetativas semelhantes, marcada por diversas sinonímias, e pelo uso de caracteres taxonômicos pouco relevantes, já que todas as espécies do gênero exsudam resinas de seus troncos. Com isso, a exploração da resina desses breus apresentam algumas características originais em seu manejo que vão definir, em última instância, as possibilidades de suas aplicações industriais e, portanto, estabelecer o seu padrão de qualidade para o mercado. A principal delas se refere à eventual mistura das resinas das diversas espécies encontradas na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru-

RDS, no estado do Amapá, ou, ainda, de espécimes de idades e locais distintos. Fato ocorrido pela dificuldade de se proceder à diferenciação morfológica e taxonômica, entre as espécies, comprometendo a qualidade e atividade química das substâncias essenciais encontrada em seu óleo- resina (Tostes et al., *in press*).

A maioria das pesquisas sobre *Protium* restringem-se a descrição de seus compostos químicos, bastante utilizados pela indústria (Zoghbi et al., 1981, 1993; Susunaga, 1996; Maia et al., 2000; Almeida et al., 2002; Bandeira et al., 2002; Zoghbi et al., 2002; Case et al., 2003, Machado et al., 2003; Citó et al., 2006; Pontes et al., 2007; Pontes et al., 2010; Marques et al., 2010; Lima et al., 2014). Apesar destes estudos químicos e farmacológicos, poucas espécies estão disponíveis no mercado industrial. E os trabalhos que existem sobre essa família são muitos dissipados. Segundo informações da empresa Natura (informação pessoal), em 2001, iniciou-se pesquisas em comunidades e mercados do Brasil, a fim de se buscar aromas inovadores e diferentes. Sendo encontrado esse aroma nos “breus amazônicos”, de odor perfumado e fresco obtido de diferentes tipos de *Protium*, onde seu óleo essencial é usado como matéria prima para a produção de diferentes produtos cosméticos.

Estudos ecofisiológicos e morfológicos ainda são bastante fragmentados e, por este motivo, ainda não se tem informações precisas á respeito do status de identificação, conservação e plantio dessas espécies (Léon Hernandez, 2002; Ferraz et al., 2004; Marengo et al., 2007; Melo et al., 2007; Fernandes e Scudeller, 2011; Santos et al., 2012). A compreensão das estratégias ecofisiológicas de uma determinada espécie, de ocorrência natural em ambientes contrastantes, pode indicar a existência de mecanismos distintos de sobrevivência, como também sua plasticidade morfofisiológica para colonizar estes ambientes diferentes (Fernandes et al., 2014).

A partir de estudos interdisciplinares envolvendo *P. altsonii* espera-se que recursos naturais de potencial pouco explorado, como o dessa espécie, possa contribuir para agregar produtos e processos de importância para as indústrias de base tecnológica, agroquímica e de cosméticos. Assim, com informações sobre as características ecofisiológicas, morfo-anatômicas e a atividade química e biológica de *Protium altsonii* Sandwith, podem consolidar e até mesmo ampliar as potencialidades desta espécie com vista no uso, conservação e manejo da mesma.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Descrição geral

O nome Burseraceae é baseado no tipo *Bursera* Jacq. ex L., homenagem feita por Linneu ao botânico Joaquim Burser (Paula e Alves, 1997). São plantas angiospérmicas (Divisão Magnoliophyta), pertencem à ordem Sapindales (Souza e Lorenzi, 2008). A família compreende aproximadamente 700 espécies e 21 gêneros distribuídos em três tribos: Protieae (quatro gêneros), Bowellieae (oito gêneros) e Canarieae (nove gêneros) (Daly, 2015). Suas espécies são encontradas nas regiões tropical e subtropical da América do Sul, em parte da Europa, Ásia e Oceania (Daly et al., 2011). Desde os primeiros inventários florestais, espécies de Burseraceae têm sido reconhecidas como altamente importante na Amazônia (Black, 1950; Daly, 1987).

No Brasil, ocorrem 100 espécies distribuídas nos gêneros *Protium* Burm. f., *Bursera* Jacq. ex L., *Tetragastris* Gaertn., *Crepidospermum* Hook. f., *Dacryodes* Vahl e *Trattinnickia* Willd (Joly, 1983; Barroso, 1984), sendo 20 endêmicas, ocorrendo nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Contudo, a maioria das espécies é nativa da região Amazônica (Souza e Lorenzi, 2008; Daly, 2015). Na América Tropical, existem oito gêneros e aproximadamente 295 espécies. São poucos os estudos taxonômicos desenvolvidos sobre a família, os mais abrangentes são os de Engler (1874, 1883) para a Flora Brasiliensis, que separou as espécies com base no grau de concrecimento dos pirênios. Para as espécies do leste da Amazônia, o conhecimento taxonômico de representantes de *Protium* foi elaborado por Daly e Fine (2011), reconhecendo 28 espécies. Outro importante trabalho na Amazônia Central foi desenvolvido por Ribeiro et al., (1999), em floresta de terra firme da Reserva Ducke. Este último estudo levou em consideração caracteres vegetativos e de fácil reconhecimento, compreendendo 42 espécies, fornecendo hoje meios de identificação até então indisponíveis.

A história taxonômica das Burseraceae é muito confusa, marcada por diversas sinonímias e pelo uso de caracteres taxonômicos pouco relevantes ou estáveis. Desde a primeira descrição de *Protium*, uma espécie denominada *Amyris protium* em 1767 por Linnaeus, e que no ano seguinte foi descrita novamente por Burmann como *Protium javanicum*, o gênero já apresentou diversas denominações, incluindo espécies que, achava-se pertencer a outros gêneros. Em diversos casos, há menos diferenças entre *Protium* e algumas

espécies de outros gêneros de Burseraceae que entre algumas espécies deste mesmo gênero (Daly, 1987).

Os representantes dessa família são conhecidos por breu, almécega e goma-limão e são caracterizados por exsudar resina oleosa rica em óleos essenciais e triterpenos, que se encontram armazenada em diferentes partes da planta (Weeks et al., 2005; Rüdiger et al., 2007). Burseraceae quase sempre tem traços de látex branco resinoso tanto em seus ramos, como dispersos em formas de gotículas em talhos feitos na casca. Os ferimentos nos troncos são caracterizados pelo esbranquiçamento, devido à rápida secagem da resina aromática. A resina é secretada naturalmente, ou por meio de injúrias, pelo tronco da árvore e, quando em contato com o ar cristaliza (Plowden, 2001). Alguns estudos ecológicos demonstram que insetos xilófagos, como os *Curculionidae*, são responsáveis pela perfuração da casca e exsudação da resina, podendo essas ser também de origem mecânica (Fig. 1), (Langenhein, 1969; Plowden, 2001).



**Figura 1.** Características morfológicas da árvore de *Protium* spp; **A:** Indivíduo com sapopemas tabulares e exsudando uma resina branca com odor perfumado; **B:** Injúria mecânica na madeira, exsudando gotículas de óleo (seta); **C:** Injúria promovida pela larva do inseto da família Curculionidae; **D:** Caule com injúria no tronco em razão da coleta de amostra da madeira; **E:** Corte paralelo ao tronco, resina ainda não exsudada (seta); **F:** Resina já exsudada no tronco (seta).

As espécies dessa família, de modo geral, apresentam indivíduos de porte pequeno (2 a 5 metros). Contudo, alguns cujos exemplares podem atingir o dossel da floresta (30 a 50 metros), tais como *Tetragastris* spp. e *Protium* spp. (Ribeiro et al., 1999). As folhas são alternas ou raramente opostas, compostas e imparipinadas. As flores são pequenas e unissexuadas, de cor creme, amarela, verde ou vermelha. Os frutos são drupas ou mais raramente cápsulas (Souza e Lorenzi, 2008). Geralmente, florescem no final do período de seca e, em sua grande maioria, são indicadoras de vegetação relativamente intacta, uma vez que poucas espécies ocorrem no crescimento secundário (Daly, 2015).

Na América do Sul, estima-se que mais de 80% das espécies de Burseraceae encontradas na Região Amazônica pertencem a *Protium*, o maior e mais heterogêneo da tribo Protieae, com cerca de 150 espécies, entre arbustos e arbóreas distribuídas em todo o Brasil, e em diferentes domínios fitogeográficos (Daly, 2015). A tribo Protieae é considerada a mais primitiva com pirênios livres entre si e maior desenvolvimento nos trópicos da América.

Além disso, é um gênero que constantemente aparece entre as espécies de maior importância ecológica em levantamentos florísticos, e em diversos estudos regionais esse grupo representa 20% das espécies com DAP maior que 10 cm em uma área de um hectare (Diniz e Scudeller, 2005). No entanto, a sua taxonomia, conforme já mencionado, é pouco consistente e por isso sua identificação no campo é complexa, pois suas flores são pequenas e pouco visíveis, tornando apenas os caracteres vegetativos diagnósticos.

Nem sempre é possível encontrar plantas em estágio reprodutivo, principalmente porque a maioria das plantas apresenta ciclo anual ou supra anual de reprodução, que em geral é de duração curta. Além disso, o ciclo reprodutivo na maioria das vezes não coincide com a possibilidade de coleta da planta. Na impossibilidade de coleta de material fértil para determinação é necessário recorrer aos métodos alternativos de identificação propostos pela taxonomia. Outros dados podem ser analisados, como a arquitetura foliar, anatomia de órgãos ou células vegetais e, recentemente, métodos moleculares têm sido mais usados para identificação e filogenia dos diversos indivíduos (Fernandez e Scudeller, 2011).

O óleo essencial de algumas espécies de *Protium* apresentam misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos e pertencer às mais diversas classes de compostos com diferentes atividades biológicas já registradas (Oliveira et al., 2004; Otuki et al., 2005; Aragão et al., 2006; Pontes et al., 2007; Soldi et al., 2008; Holanda Pinto et al., 2008). Seu óleo é empregado na indústria cosmética de perfumes, na fabricação de sabonetes e aromatizantes de ambiente, sendo os seus produtos comercializados em vários países (Ferraz

e Costa, 2004). *Protium* no Brasil é o mais importante, apresentando-se com múltiplas utilizações, inclusive na produção de papel (Paula e Alves, 1997).

### Aspectos morfológicos

As informações sobre as características da germinação de espécies florestais representam a base da silvicultura e do manejo sustentado. Isso porque, os estudos morfológicos de sementes permitem a determinação das espécies existentes nos bancos de sementes do solo e a identificação de espécies florestais na fase jovem, contribuindo para a compreensão da regeneração natural e sucessão em ecossistemas florestais (Silva e Costa, 2014; Alves et al., 2013). Praticamente não existem estudos sobre morfologia de sementes, frutos, pirênios e plântulas de *Protium* e os trabalhos que existem são pouco conclusivos. Os trabalhos realizados sobre o desenvolvimento pós-seminal da família Burseraceae foram realizados por Duke (1969), ao descrever cerca de duzentas espécies florestais do Canal do Panamá, e por Ricardi (1996), que aborda a morfologia dos cotilédones de plântulas da família Burseraceae presentes na Venezuela.

A morfologia dos frutos e sementes de três espécies de *Protium* que ocorrem na Amazônia Central foi comparada quanto à morfologia das plântulas com as características dos indivíduos adultos, demonstrando que os padrões de germinação e a morfologia das plântulas constituem ferramentas úteis para a sistemática de Burseraceae (Ferraz et al. 2004). Também na Amazônia Central, nove espécies de *Protium* foram investigadas, estudando a morfologia desde a germinação até a formação de plântulas, a caracterização de frutos e sementes, além de avaliar a utilidade destes caracteres na sistemática do grupo (Melo et al., 2007).

Ainda em relação à identificação correta das espécies de *Protium* foram realizados estudos biométricos de frutos e sementes. Os resultados biométricos apresentaram possíveis variações que revelam heterogeneidade genética desta espécie observada por meio do tamanho e peso dos frutos e das sementes (Nobre e Quirino, 2011).

O estágio de plântula é uma importante fase do ciclo vegetal, pois fornece informações relevantes que podem ser utilizadas em estudos taxonômicos e ecológicos. Estudos que enfocam a descrição morfológica revelam caracteres que, muitas vezes tendem a desaparecer ao longo do crescimento e desenvolvimento vegetal, mas que podem ser relevantes para a diferenciação dos táxons (Cosmo et al., 2010). Por meio dos caracteres filogenéticos, ecológicos e chave de identificação, a morfologia de plântulas de *P. heptaphyllum* foi investigada e constatou a existência de variação nas características foliares (tais como: forma

dos eofilos, consistência e filotaxia) tanto entre as espécies analisadas quanto no próprio indivíduo (em relação ao indivíduo adulto), permitindo, desta forma, sua identificação a nível específico na comunidade vegetal (Alves et al., 2013).

Alguns trabalhos relacionados à anatomia foram realizados e características anatômicas da madeira de sete espécies de *Protium* da Venezuela foram registradas (León Hernández, 2002). Neste trabalho, onde as espécies apresentam características anatômicas similares com os estudos do lenho e folha de Fernandez e Scudeller (2011), além da identificação por meio de chave taxonômica, a descrição morfológica reprodutiva e vegetativa de *P. spruceanum* (Benth.) Engl. foram discutidas em conjunto com as implicações ecológicas que podem explicar a alta diversidade genética da espécie na paisagem local (Vieira et al., 2010).

#### Aspectos ecofisiológicos

O conhecimento das respostas das espécies florestais quanto ao estresse ambiental pode ser de fundamental importância para a compreensão da distribuição local das espécies, bem como auxiliando na melhor forma de exploração sustentável, na escolha de sistemas de plantios adequados e na implementação de programas de conservação de diversas espécies de interesse econômico e ecológico (Morais et al., 2003).

Plantas jovens de *P. heptaphyllum* foram submetidas ao alagamento do solo em dois ambientes de luz, avaliando trocas gasosas foliares e seu crescimento. A espécie apresenta boa adaptabilidade às condições de alagamento, verificando assim que esta espécie pode ser indicada para recuperação de áreas degradadas, com inundação periódica, áreas de baixio e margens de represas (Santos et al., 2012).

A fotoinibição é um estado de estresse fisiológico que ocorre em todos os organismos fotossintetizadores que liberam oxigênio quando expostos à luz. O efeito da irradiação na fotoinibição da fotossíntese em *P. opacum* Swart foi investigado, e a espécie experimenta apenas fotoinibição dinâmica, o que significa que ao alvorecer não há na folha nenhum efeito fotoinibitório acumulado do dia anterior (Marenco et al., 2007). Desempenho fotossintético e disponibilidade hídrica em *P. icicariba* (DC.) Marchand. também foi investigado, onde a espécie apresentou comportamento mais conservativo de acordo com o esperado para espécies dominantes em ambientes improdutivos (Lignani, 2008).

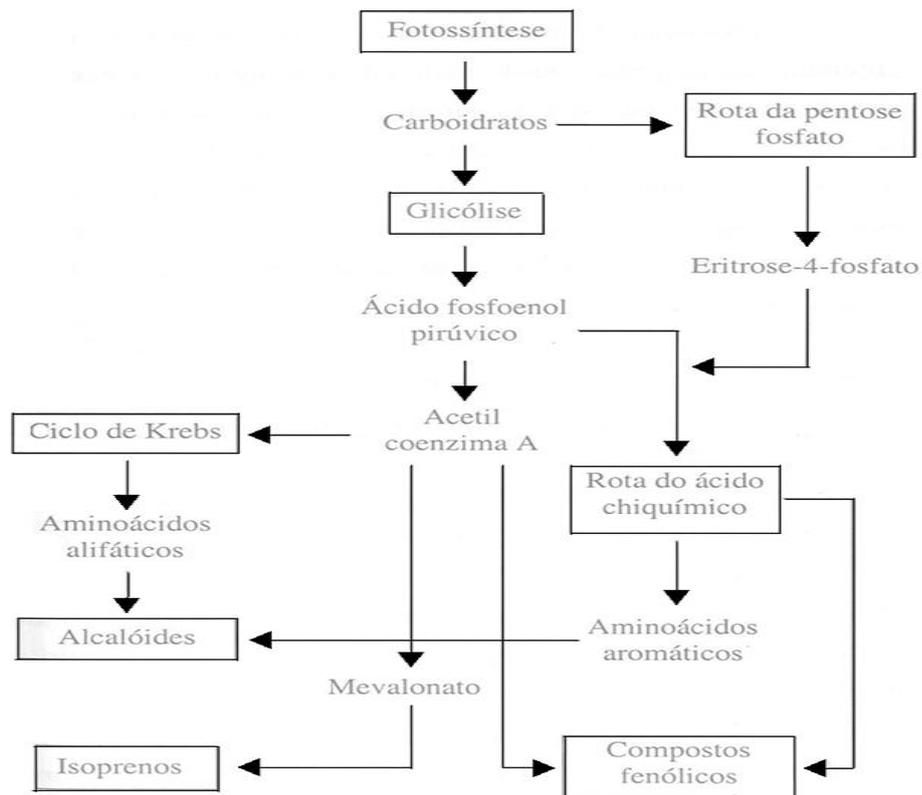
O efeito da secagem e diferentes temperaturas na germinação de sementes de *P. widgrenii* Engler. foi registrado, onde as sementes apresentaram comportamento típico

recalcitrante, pois tiveram seu porcentual de germinação e IVG reduzidos com a dessecação (Seiffert et al., 2005).

#### Aspectos químicos e Farmacológicos de espécies de *Protium*

Os vegetais produzem uma diversidade de substâncias, produtos do metabolismo primário e secundário, alguns responsáveis pela coloração e aroma de flores e frutos, outras vinculadas à interação ecológica. O conhecimento dos constituintes químicos de diversas partes da planta favorece o seu uso sustentável e contribui para sua conservação. As fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de importância medicinal e comercial (Silva, 2008).

A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo, ocorrendo estreita relação entre essas rotas e aquelas responsáveis pela síntese de metabólitos primários. Essas rotas são interconectadas, e as rotas que sintetizam metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras nas principais rotas de síntese de metabólitos secundários. Há três principais precursores dos metabólitos secundários: ácido chiquímico (compostos aromáticos), acetato (ácidos graxos, polifenóis, isoprenos e prostaglandinas) e aminoácidos (alcalóides) (Fig. 2) (Castro et al., 2004).



**Figura 2.** Fluxograma resumido do metabolismo secundário das plantas para formação compostos dos óleos essenciais (Castro *et al.*, 2004).

Os óleos essenciais são misturas secundárias complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e que contribuem para a fragrância ou essência das plantas que os produzem. Os óleos essenciais constituem grande variedade de substâncias, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeído, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre (Simões *et al.*, 2002).

A presença de substâncias químicas em uma determinada espécie pode estar relacionada à sazonalidade, variando em resposta a fatores bióticos e abióticos, principalmente, aqueles ligados ao clima que podem influenciar na qualidade e quantidade do óleo essencial (Simões *et al.*, 2000). Alterações nos fatores abióticos podem também afetar os processos fisiológicos e metabólicos das plantas, com destaque para o crescimento celular, síntese de proteínas, síntese e transporte de fotoassimilados, transporte de nutrientes e desempenho fotossintético, limitando o crescimento e o acúmulo de biomassa (Osmond, 1983; Graciano *et al.*, 2006; Yokota *et al.*, 2006). Os nutrientes minerais, em particular, atuam no crescimento, na morfologia, na anatomia e particularmente na composição química da

planta sendo então fatores importantes na tolerância das plantas às pragas e as doenças (Yokota et al., 2006).

Nas espécies de *Protium*, essa relação parece existir, podendo a concentração das substâncias variar em função da temperatura, radiação solar e precipitação pluviométrica, nutrientes, dentre outros, o que ocorre devido a grande diversidade de ambientes onde essas árvores se encontram (Machado et al., 2003). Esses óleos podem ser obtidos de diferentes partes da planta, como das sementes, frutos, caules, folhas e ramos. É preciso salientar, ainda, que diferenças quantitativas e qualitativas na composição química desses óleos essenciais são encontradas quando se trabalha com óleos extraídos de diferentes partes de uma mesma planta (Siani et al., 1999; Bandeira et al., 2002; Zoghbi e Andrade, 2002).

Análises químicas de diferentes tecidos vegetais provenientes de *Protium* demonstram a predominância de compostos da classe dos terpenos. Quanto ao seu potencial biológico, estudos tem revelado que sua atividade biológica deve-se, principalmente, à presença de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, que podem ser encontrados, predominantemente, no óleo essencial (Bandeira et al., 2001; Bandeira et al., 2006; Lima et al., 2006; Rudiger et al., 2007; Silva et al., 2009).

Os primeiros estudos químicos sobre *Protium* referem-se à identificação dos constituintes químicos do extrato etéreo (terpenos,  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, fitoesteróides estigmasterol e  $\beta$ - sitosterol) e etanólico (ácido 3,3'-di-O-metilelágico) da casca da madeira de *P. paniculatum*, ao passo que a primeira identificação de lignanas (fitoestrógenos) foi descrita em *P. tenuifolium* (Engler). (Zoghbi et al., 1981; Zoghbi et al., 1993; Siqueira et al., 1995).

A literatura registra somente duas cumarinas de *Protium*, sendo essas, escopoletina e propapicina (Bandeira et al., 2002; Zoghbi et al., 1981). As cumarinas possuem diversas propriedades farmacológicas como antiinflamatória, espasmolítica, broncodilatadora, e atua também contra o desenvolvimento de tumores, entre outras (Osório et al., 2004). A escopoletina, uma cumarina com atividade farmacológica comprovada, atua na regulação da pressão arterial e possui atividade bactericida contra várias espécies, incluindo *Escherichia coli* (Arisawa et al., 1983). Estudos fitoquímicos demonstraram que o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* é constituído, principalmente, de monoterpenos e fenilpropanóides, já os constituintes majoritários do óleo essencial das folhas de *P. strumosum*, *P. grandifolium* Engler., *P. llewelynii* J.F. Macbr. e *P. hebetatum* Daly. são os sesquiterpenos (Siani et al., 1999). Dentre as espécies de *Protium*, *P. heptaphyllum* é a mais estudada, onde a partir da resina, misturas binárias de triterpenos são isoladas e caracterizadas, sendo o constituinte majoritário a mistura  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas (Maia et al., 2000; Susunaga et al., 2001; Vieira Júnior et

al., 2005; Aragão et al., 2006; Holanda et al., 2008; Soldi et al., 2008). A mistura  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas apresenta atividade antialérgica que pode estar relacionada à ação dessa mistura estabilizando a membrana celular de mastócitos (Oliveira et al., 2004b). Outro efeito utilizando essa mistura é contra a lesão hepática tóxica induzida por acetaminofeno, onde se sugere a diminuição do estresse oxidativo e a formação de metabólitos tóxicos como provável mecanismo de hematoproteção (Oliveira et al., 2005).

Dos frutos verdes foi isolada catequina, com atividade de inibição da acetilcolinesterase, e dos frutos maduros e das folhas isolados quercetina, glicosídeos e flavonóide. A partir do caule isolaram escopoletina, relatando pela primeira vez outro tipo de cumarina na espécie (Bandeira et al., 2002). A presença de cumarinas e cleomiscosina foi registrada na casca e nas folhas de *P. heptaphyllum* (Almeida et al., 2002). Já na resina foi comprovada a atividade anti-inflamatória e demonstraram quadro de atividade de gastroproteção em modelos utilizando etanol/HCL com indutores de úlceras gástricas em ratos, atribuído essas atividades a substâncias com alto poder antioxidante. E ainda, revelou a presença de triterpenos pentacíclicos responsáveis pelas atividades avaliadas (Oliveira et al., 2004a).

Diferentes constituintes voláteis presentes no óleo essencial de frutos e folhas de *P. heptaphyllum* por CG/EM obtidos por diferentes técnicas de extração foi identificado (Citó et al., 2006). Sendo registrado o efeito acaricida do óleo essencial do fruto contra a repelência do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), onde o componente majoritário foi o  $\alpha$ - terpineno (Pontes et al., 2007).

O extrato etéreo da resina de *P. klenii* Cuatrec. mostrou a presença do triterpeno breína, isolada como o principal componente (Otuki et al., 2001), sendo avaliada a atividade antinociceptiva, com resultados promissores. Nessa mesma espécie foi avaliada a atividade antiinflamatória tópica do extrato etéreo da resina. Tanto o extrato como a  $\alpha$  amirina como constituinte majoritário apresentou atividade (Otuki et al., 2005). O mesmo grupo isolou e identificou três novos triterpenos a partir da resina da mesma espécie com atividade antinociceptiva, sendo comprovada pelo teste de formalina (Lima et al., 2005).

A partir do extrato etéreo da resina de *P. unifoliolatum* Engler. foi isolado e identificado 5- Methoxipropacina (Magalhães et al., 2006). A análise da composição química dos óleos essenciais das partes vegetativas de *P. decandrum* (Aubl.) Marchand .O CG/EM mostrou que sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais de galhos, folhas e resinas. Entretanto, o óleo das hastes desta espécie, a maior porcentagem é de monoterpenos (Lima et al., 2006). Ainda em relação a essa espécie foi realizado estudo de

identificação do óleo essencial da resina com predominância de terpenóides (Carvalho et al., 2010).

Outro estudo importante foi realizado com *P. bahianum* Daly, no qual foi analisada a resina fresca e envelhecida, onde a resina envelhecida apresenta em sua constituição majoritária sesquiterpenos e a fresca somente monoterpênicos. A resina envelhecida apresentou atividade acaricida induzido à repelência a *Tetranychus urticae* (Pontes et al., 2007; Pontes et al., 2010).

Estudo foi realizado um da variação sazonal na composição de óleos essenciais das folhas, dos ramos finos e da resina de *P. spruceanum* (Benth.) Engler., no qual verificou-se que durante a maturação dos frutos, nos meses de verão, o teor de monoterpênicos no óleo essencial das folhas é menor. Esta variação pode estar relacionada à taxa de biossíntese, a diminuição do metabolismo ou a volatilização (Machado et al., 2003).

Aspectos morfológicos e químicos de *P. spruceanum* foram estudados também com a finalidade de contribuir para o conhecimento da flora aromática e verificar os aspectos químicos do óleo essencial de *P. icicariba* (Siani et al., 2004; Lima et al., 2014).

As análises qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais obtidos da resina de *P. heptaphyllum* (Aubl.) Marchand subsp. *ulei* (Swat) Daly e *P. heptaphyllum* (Aubl.) Marchand subsp. *heptaphyllum* foram realizadas utilizando CG/EM e CG/DIC (Marques et al., 2010). Os terpenoides  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, os esteroides, campesterol, estigmasterol e sitosterol e a cumarina escopoletina foram isolados a partir do caule de *P. hebetatum* (Costa et al., 2012).

Apesar destes estudos químicos e farmacológicos com algumas espécies de *Protium*, apenas poucas espécies estão disponíveis no mercado de cosméticos. Segundo informações da empresa Natura, em 2001, iniciou pesquisas em comunidades e mercados do Brasil, a fim de buscar aromas inovadores e diferentes.

Diante do que foi aqui considerado, confirma-se que a flora aromática da região amazônica apresenta-se como uma fonte potencial renovável, apropriada à produção de essências aromáticas e como alternativa econômica para o desenvolvimento sustentável da região. As plantas são fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de cosméticos e fármacos. Várias pesquisas demonstram impressionante gama, em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. A utilização de plantas como fontes de produtos eficazes na prevenção, tratamento e controle de doenças são devidos, principalmente, à existência de metabólitos secundários associados aos mecanismos de sobrevivência e de defesa da própria planta. Estas evidências, muitas vezes, não se tornam mais consistentes pela

escassez de informações científicas sobre áreas de conhecimentos complementares com a silvicultura, a ecologia, a morfologia, a fisiologia e bioquímica e, esta ausência representa uma das razões para a falta de estratégias mais efetivas do uso sustentado dessas espécies.

Nesse estudo, os mecanismos adaptativos de *P. altsonii*, mediante o estudo de aspectos eco e morfofisiológicos, foram consistentemente investigados para verificar de forma sistemática a autoecologia da espécie com vista de projetos de restauração e recuperação de áreas degradadas, além, do aproveitamento e o controle de produção de moléculas bioativas com potencial farmacológico e/ou industrial. Para tanto, esta tese foi dividida em três capítulos, para efeito didático:

Capítulo I: Estudos morfoanatomicos de plantas *P. altsonii* Sandwith;

Capítulo II: Características ecofisiológicas em plantas jovens e adultas de *P. altsonii* Sandwith;

Capítulo III: Variabilidade química e atividade antifúngica dos metabólitos secundários do óleo de âmbar resina de *Protium altsonii*;

A partir de estudos interdisciplinares envolvendo *P. altsonii* espera-se que recursos naturais de potencial pouco explorado, como o dessa espécie, possam contribuir para agregar produtos e processos de importância para as indústrias de base tecnológica, agroquímica e de cosméticos. Foram elaboradas hipóteses que sustentam esses artigos:

## **HIPOTESES**

- 1) As respostas ecofisiológicas e morfo-anatômicas são diferenciadas quanto ao estágio de desenvolvimento e crescimento das plantas de *Protium altsonii* Sandwith;
- 2) As características anatômicas das folhas e madeira podem sofrer diferenças celulares em seu desenvolvimento durante seu crescimento;
- 3) Os fatores bióticos e abióticos podem modificar as repostas ecofisiológicas, a morfo-anatomia e a bioquímica das plantas;
- 4) O óleo-resina exsudado de *P. altsonii* apresenta atividade antifúngica;
- 5) As estruturas secretoras serão registradas durante o desenvolvimento e crescimento da planta;
- 6) A partir das avaliações da qualidade e quantidade obtidas no óleo-resina será possível mapear quais estruturas químicas estão presentes nas plantas de *breus*, além de identificar, quantificar e isolar espécies para diversas atividades farmacológicas registradas para esse gênero.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Investigar as características ecofisiológicas, morfo-anatômicas e a atividade antifúngica de *Protium altsonii* Sandwith, realizando um estudo da semente até a fase adulta.

### Objetivos específicos

- Descrever os caracteres morfológicos de frutos, sementes e plântulas, e contribuir com informações sobre a germinação de *P. altsonii* Sandwith até o crescimento inicial de plântulas;
- Caracterização morfo- anatômica das folhas jovens e adultas;
- Caracterização morfo- anatômica das estruturas secretoras presentes no tronco;
- Determinar os efeitos de ambiente de luz no crescimento, acúmulo de biomassa, e as respostas e estratégias da planta quanto à captação e utilização da energia luminosa de plantas jovens de *P. altsonii* sobdiferentes condições de irradiância;
- Identificação dos constituintes químicos encontrados no óleo-resina presentes no tronco;
- Analisar a atividade do óleo-resina nos ensaios de atividade antifúngica.

## Capítulo I

---

### Estudo morfoanatomico de *Protium altsonii* Sandwith

\*Capítulo transformado em artigo de acordo com normas da revista *Acta Botanica Brasilica*.

## Estudo morfoanatomico de plantas de *Protium altsonii* Sandwith

### RESUMO

*Protium* Burm.f. destaca-se pela diversidade de espécies na Amazônia, contudo, pouco se conhece a respeito da morfologia, anatomia e propagação sexuada dessas espécies. O presente trabalho teve como objetivo descrever os caracteres morfológicos de frutos, sementes e plântulas, além de caracterizar a anatomia de folhas e tronco de *P. altsonii* Sandwith. Os frutos, folhas e madeira foram coletados na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru- RDS, no município de Laranjal do Jari, Amapá. Foram realizados cortes transversais e longitudinais em micrótomo rotativo. Os frutos são globosos a ovoides, com ápice levemente agudo e estipitado curto, apresentam um e, mais raramente, dois pirênios por frutos. As sementes são exalbuminosas, com dormência tegumentar, imaturidade embrionária e presença de substâncias fenólicas. Adicionalmente, apresentam baixo percentual germinativo, sendo hipógea, criptocodiledonar, com sistema radicular axial. A semente madura de *P. altsonii*, em corte transversal, na região abaxial, é formada por revestimento do envoltório seminal com células colapsadas e com parênquima cotiledonar carnoso com cavidades secretoras e presença de óleo. Em sub-bosque, as folhas das plantas jovens com dois anos e seis meses são compostas, imparipenadas podem apresentar 6 até 11 pares de folíolos, com  $7,8 \pm 12,3 \times 3,0 \pm 5,4$  cm, pecíolo  $1,2 \pm 4,6$  cm de comprimento, levemente canaliculado, com lenticelas, cilíndrico, tricomas finos, simples, diminutos e eretos, esparsos; peciólulo delicado,  $0,7 \pm 1,7$  cm de comprimento, cilíndrico, com tricomas simples e eretos, esparsos. As folhas adultas são compostas, imparipenadas podem apresentar seis ou mais pares de folíolos por galho, com  $17,8 \pm 22,3 \times 10,0 \pm 21,1$  cm, pecíolo  $2,2 \pm 5,6$  cm de comprimento, cilíndrico, levemente canaliculado, com lenticelas, tricomas finos, simples, diminutos e eretos, densos a esparsos; peciólulo delicado,  $1,0 \pm 2,7$  cm de comprimento, cilíndrico, com tricomas simples e eretos, densos a esparsos, pulvínulo inconspícuo, às vezes evidente; folíolo  $10,5 \pm 4,6 \times 14,5 \pm 5,0$  cm, com 17 a 21 folíolos, elíptico, ápice acuminado, base assimétrica a aguda. Em corte transversal da nervura central na região do terço inferior das folhas jovens de sombra, as epidermes apresentam cutícula fina, parede anticlinal e periclinal com depósito de lignina e substâncias fenólicas, com células heterodiamétricas. O mesófilo da folha adulta, em corte transversal é dorsiventral, onde o parênquima paliçádico é formado por camada única de

células longas, largas com paredes espessas e presença de cloroplastos, entre suas células observam-se pequenos meatos; já o parênquima lacunoso apresenta diferentes formatos celulares com lacunas e canais nas nervuras secundárias e terciárias. Em corte transversal da madeira numerosos vasos solitários e múltiplos; pequenos a médios; elementos vasculares com placa de perfuração simples. Presença de vasos constituídos por elementos vasculares curtos. Fibras libriformes, septada finas, de muito curtas a curtas. Parênquima axial difuso (3 a 5 células por parênquima) e presença de conteúdo lipídico nas células do raio. A estrutura morfológica da espécie *Protium altsonii* é essencial para assegurar a sobrevivência das plântulas em campo. Suas características morfológicas do fruto, semente e foliares, além da sua anatomia permitem dizer que essa espécie apresenta estratégia ecologia como plasticidade fenotípica. A eficiência da germinação em campo dessas espécies pode ter sido em função da liberação da cumarina presente nos cotilédones, à medida que o solo é lavado pela chuva durante o período de maior precipitação. Já em condições controladas a presença de cumarina inibiu a germinação.

**Palavras-chave:** *Protium*, Anatomia, RDS Iratapuru, Burseraceae.

## Introdução

O conhecimento da morfologia de espécies nativas é de grande importância para o entendimento de sua autoecologia, bem como do seu comportamento e distribuição nos diferentes ecossistemas (Cosmo *et al.* 2010). A morfologia de frutos e sementes normalmente mostra pequena plasticidade fenotípica e é, portanto, de grande importância taxonômica (Silva & Costa 2014; Heneidak & Khalik 2015). Estudos morfológicos e anatômicos de sementes e plântulas são importantes para facilitar pesquisas sobre o banco de sementes do solo, bem como para auxiliar na identificação de espécies em estudos de regeneração natural de áreas degradadas e comunidades florestais em geral (Araújo Neto *et al.* 2002; Silva & Costa 2014; Alves *et al.* 2014).

*Protium* Burm.f. destaca-se pela diversidade de espécies, com muitas adaptadas aos mais variados terrenos e solos, tornando-as altamente importante, principalmente em ambientes heterogêneos. Geralmente, se torna um grupo de difícil identificação botânica no nível de espécies, sendo diversas delas frequentemente reclassificadas, uma vez que foram descritas com base em caracteres taxonômicos não confiáveis (Daly 1987, 1992; Daly & Fine 2011). Adicionalmente, as espécies pertencentes a este gênero apresentam ampla distribuição e grande histórico de uso, podendo ser encontradas em quase todo o estado do Amapá (registro HAMAB), sendo a Amazônia o centro primário de dispersão (Daly 1992; Daly 2015).

A espécie *P. altsonii* Sandwith tem representantes de importância econômica no estado do Amapá, denominados de “breu branco”, que exsuda uma resina branca, volátil, de odor almiscarado usado pela comunidade de São Francisco (RDS), através da Cooperativa mista de produtores e extrativistas do Rio Iratapuru- COMARU para calefação de embarcações, como

repelente, além de abastecer a empresa Natura Inovação Tecnológica com 80 toneladas de pedras de bréus/ano, o que representa um importante insumo para indústria de perfumaria e fonte de renda para a comunidade (Tostes *et al. in press*). *P. altsonii* é confundida com outras espécies do próprio gênero e com outras espécies de outros gêneros da família Burseraceae, como *Tetragastris* Gaertn. e *Trattinnickia*, Willd. onde todos são chamados de “breus amazônicos”, com características vegetativas semelhantes, marcada por diversas sinonímias e pelo uso de caracteres taxonômicos pouco relevantes, já que todas exsudam resinas de seus troncos (Daly 2015).

Estudos a respeito da morfologia do sistema vegetativo e reprodutivo de espécies de *Protium* ainda são escassos e incipientes (Melo *et al.* 2007). É importante salientar que a combinação de características da semente e da planta jovem, pode fornecer numerosos indícios para a identificação das espécies no campo ou em amostras de sementes (Silva *et al.* 2009; Cosmo *et al.* 2009).

As informações sobre as características da germinação de espécies florestais representam a base da silvicultura e do manejo sustentado. Isso porque, os estudos morfológicos de sementes permitem a determinação das espécies existentes nos bancos de sementes do solo e a identificação de espécies florestais na fase jovem, contribuindo para a compreensão da regeneração natural e sucessão em ecossistemas florestais (Silva & Costa 2014).

O presente trabalho teve como objetivo descrever os caracteres morfológicos de frutos, sementes, plântulas, folhas e tronco, e fornecer informações sobre a germinação de *P. altsonii* Sandwith até o crescimento inicial das plantas.

## **Material e métodos**

### *Área de estudo*

Os frutos foram coletados no período de janeiro a abril de 2012, na região da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru- RDS, no município de Laranjal do Jari (00° 20' 00'' a 00° 30' 00'' de latitude Sul e 52° 30' 00'' a 52° 34' 00'' de longitude Oeste de Greenwich). A área estudada da RDS foi o complexo Serra Anani/Manoel Preto, distante nove Km da vila de São Francisco em percurso fluvial e terrestre com altitudes entre 200 e 300 metros. A região está sob o domínio do Escudo Guianense, constituído por rochas cristalinas do Pré-Cambriano, e a borda norte da Bacia do Amazonas, composta por rochas sedimentares paleozóicas. O relevo apresenta-se dissecado, muitas vezes sob a forma de colinas. A floresta é densa de terra firme, com predomínio de latossolos arenosos a argilosos, bastante intemperizados. A rede hidrográfica é constituída pela bacia do Rio Iratapuru, afluente da margem esquerda do Rio Jari, que se caracteriza por ser um rio de planalto (Rabelo, 2008). O clima é tropical com temperatura média de 27,5 °C e índice pluviométrico médio de 2.158,8 mm (Sobrinho *et al.* 2012).

#### *Procedência do material*

Foram utilizadas cinco matrizes porta semente, onde 200 frutos de cada matriz (1000 frutos) foram coletados e, posteriormente, conduzidos ao Laboratório de Sementes (IEPA). Parcelas 5 m x 5 m foram instaladas nas cinco matrizes para o acompanhamento da germinação e desenvolvimento das sementes que caírem e germiarem até plântula, sendo registrado seu desenvolvimento. Foi realizado o acompanhamento da frutificação e floração de *P. altsonii* durante esse período de coleta.

Todos os indivíduos férteis coletados de *Protium* foram identificados pelo especialista em Burseraceae, Dr. Douglas Daly do New York Botanical Garden- USA e incorporados no Herbário HAMAB do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA, sobnúmero 510, 511, 512 e 513.

### *Estudos morfológicos*

Para descrever e ilustrar, morfológicamente, 1000 frutos e sementes foi utilizado. As observações morfométricas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímicas Vegetal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA, com lupa de mesa estereoscópica e a vista desarmada, anotando-se as medidas de comprimento, largura e espessura, com auxílio de um paquímetro digital, expressas em milímetros. Para a descrição dos frutos foram observados detalhes externos e internos do pericarpo, referentes à textura, consistência, cor, pilosidade, brilho, forma, número de sementes por fruto e deiscência.

Para as sementes foram realizados cortes transversais e longitudinais com auxílio de lâminas de bisturi em 100 unidades, visando analisar as seguintes variáveis: externas - dimensões, cor, textura, consistência, forma e posição do hilo e da micrópila; internas - presença ou ausência de endosperma, tipo, forma, cor, posição dos cotilédones, - eixo hipocótilo-radícula e disposição da plúmula em relação à semente. A coloração atribuída a qualquer descrição foi seguida pelo [Guia de Propágulos e Plântulas da Amazônia \(2004\)](#).

Após a morfometria dos frutos e sementes, as mesmas foram beneficiadas manualmente por maceração ou debulhamento até a completa remoção do mesocarpo.

### *Germinação*

Para o acompanhamento da germinação foram utilizadas 500 sementes e, após assepsia em hipoclorito de sódio a 20% da solução comercial durante 15 minutos, foram distribuídas em bandejas plásticas contendo vermiculita e cobertas com papel filtro umedecidas, sendo mantidas em câmara de germinação- marca Eletrolab, com lâmpadas fluorescentes de luz branca fria; fluxo luminoso de 70 PAR; fotoperíodo de 12:12 h e temperatura de 25 °C. A germinação foi separada por lote representando cada matriz porta semente.

Considerou-se germinação o período compreendido desde a emissão da radícula até a emergência do epicótilo. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para sacos de polietileno contendo terra, sendo mantida em casa de vegetação a sombra e regadas diariamente. Observações diárias foram efetuadas, registrando todo o desenvolvimento das plântulas.

As plântulas mais vigorosas em casa de vegetação foram utilizadas para a descrição morfológica. Considerou-se plântula a fase em que os eófilos (as primeiras estruturas laminares) apresentavam-se totalmente formados (Melo *et al.* 2007). Os elementos vegetativos descritos e ilustrados foram: forma, cor e superfície da raiz (principal e secundária), do coleto e do eófilo, sendo acrescentado a esse último à filotaxia, pecíolo e gemas. Após 12 meses de observação e descrição das plântulas em campo, 500 mudas (100 por porta semente) foram coletadas na RDS Iratapuru- AP e conduzidas ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do INPA para a realização dos estudos ecofisiológicos.

#### *Estudos morfo-anatômicos*

Utilizou-se 10 sementes maduras e sete indivíduos com folhas maduras e jovens (retirando um galho com cinco ramos com 10 folíolos) de *P. altsonii*, fixados durante 48 horas em F.A.A (70 %) e armazenados em álcool 70%, sendo desidratadas em série etanólica crescente até sua infiltração em historresina (Johansen 1940). Os cortes foram transversais e longitudinais em micrótomo rotativo, corados em azul de toluidina e safranina e montados em glicerina (Gerlach 1977) para observação e fotodocumentação.

Durante os testes germinativos foram retirados 10 sementes que não alcançaram esse processo para registros anatômicos.

Para coleta de madeira do tronco, a aproximadamente 1,5 m do solo foram usadas arco de serra para fazer dois cortes paralelos transversais ao tronco, e formão para quebrar a

madeira radialmente entre os dois cortes. Os cortes atingiram o cerne, pois é o tecido convencionalmente usado para os estudos anatômicos da madeira ([International Association of Wood Anatomists - IAWA Committee, 1989](#)).

Cada amostra de madeira recebeu a numeração da planta de que foi retirada. Das amostras obtiveram-se corpos de prova com aproximadamente 1,5 cm de lados polidos com navalha nos planos anatômicos usuais, o transversal e longitudinal radial e tangencial ([Hoadley 1990](#)). Estes corpos de prova foram saturados e submetidos à fervura, em uma solução de água e glicerina, a proporção de 1:1, por aproximadamente duas horas, para amolecimento. Posteriormente, foram obtidos cortes micrométricos com auxílio de um micrótomo de deslize, de 15 a 20 µm de espessura. Esses cortes foram divididos em dois grupos, um deles submetidos à clarificação e coloração e o outro, natural para observação de inclusões celulares e testes histoquímicos com a solução de Sudam IV ([Jensen 1962](#)).

Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio 5%; em seguida, foram imersos em série alcoólica: etanol 50%, coloração com safranina hidroalcoólica, etanol 70%, etanol absoluto, etanol acetato 1:1 e acetato. Após a coloração e desidratação, os cortes foram montados em lâmina e lamínula em resina permount ([Johansen 1940](#)). Observações e fotodocumetação foram realizadas em microscópio Leika acoplado a computador com câmera digital.

Para a verificação da natureza química das paredes e de outros componentes celulares, secções de material fresco foram cortadas à mão livre e tratadas com os seguintes corantes ou reagentes: Sudan IV para paredes cutinizadas e/ou suberizadas e lipídios em geral ([Jensen 1962](#)); solução aquosa de vermelho de rutênio a 0,02%, para substâncias pécnicas e mucilagem ([Jensen 1962](#)); reagente de lugol (iodeto de pótassio iodado) para amido ([Johansen 1940](#)); reagente de Dragendorff para alcaloides ([Svendsen & Verpoorte 1993](#)); solução saturada de ácido pícrico para proteínas ([Johansen 1940](#)); solução de cloreto férrico para

compostos fenólicos e cumarina (Jensen 1962) e reagente de Nadi para terpenoídes (David & Carde 1964).

As observações e fotografias foram feitas com auxílio de máquina digital e estereomicroscópio, para melhor visualização das estruturas e indumento. A terminologia empregada está de acordo com os trabalhos de Lawrence (1951); Duke (1969); Radford *et al.* (1974); Beltrati (1992); Oliveira (1993); Barroso *et al.* (1999) e Vidal & Vidal (2000). Todas as ilustrações foram realizadas por meio de observações em lupa estereoscópica e, posteriormente, colocadas em nanquim.

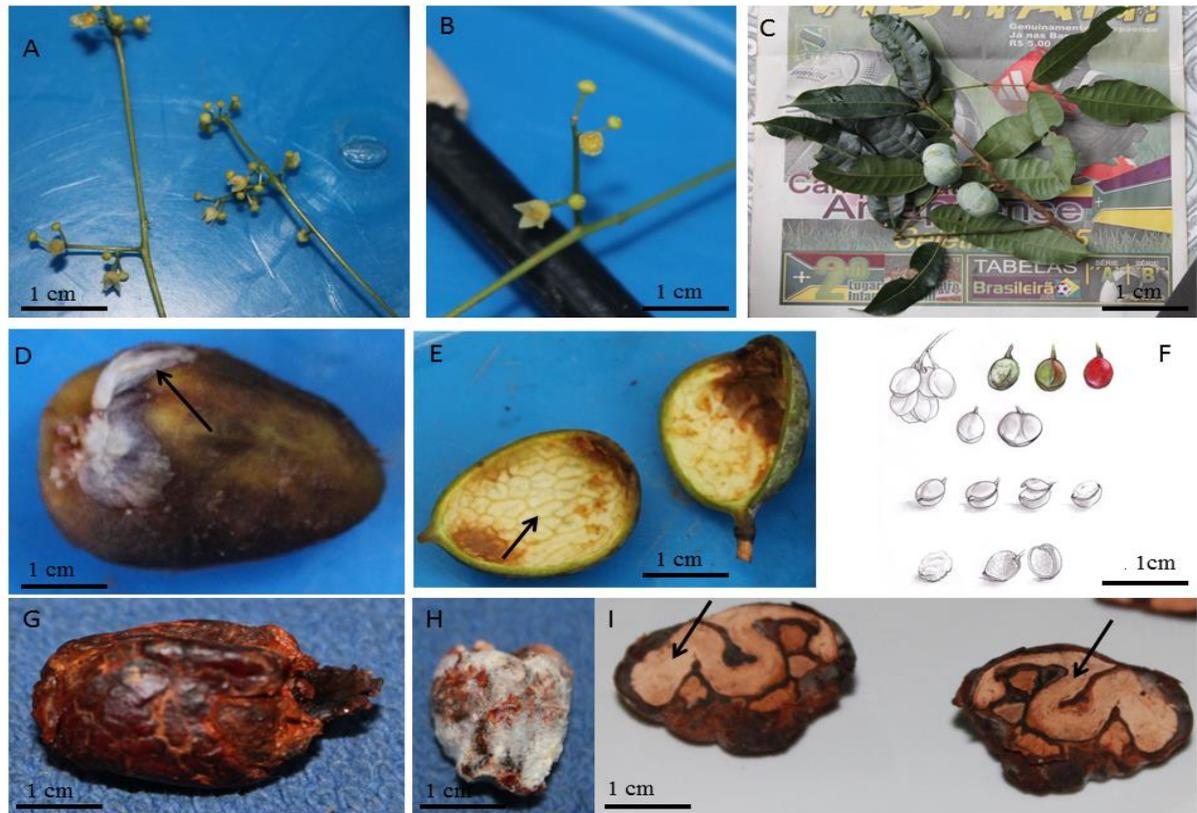
## Resultados

*P. altsonii* apresenta floração e frutificação supra anual em períodos de menor e maior precipitação, respectivamente. Suas flores são diminutas, delicadas e amarelas, formando inflorescência em panícula (Fig. 1A-B). Seus frutos são suculentos, perfumados e em forma de filotrímidio com epicarpo abrindo-se em valvas (Fig. 1C).

Quanto à morfologia, os frutos são globosos a ovóides, de tamanho médio com comprimento de  $2,3 \pm 2,9$  cm; largura de  $2,09 \pm 2,9$  cm; espessura de  $1,6 \pm 2,7$  cm, com ápice levemente agudo e estipitado curto e peso de  $2,1 \pm 8,2$  g, podendo apresentar um, ou mais raramente, dois pirênios por fruto (Fig. 1C).

Os frutos são deiscentes, apresentam coloração verde escuro tornando-se vermelho na maturidade e se desenvolvem como inflorescência axilar em panícula (Fig. 1A-F). Apresenta epicarpo levemente coriáceo, liso, normalmente com 2- 4 valvas, que são internamente brancas aveludadas e reticuladas com peso médio de  $0,6 \pm 3,8$  g (Fig. 1E-F). O endocarpo é marrom, lenhoso, resistente e indeiscente (Fig. 1G). O mesocarpo com pseudo-arilo branco é carnoso, macio, adocicado, pesa em média  $0,3 \pm 2,5$  g e, envolve completamente a superfície do pirênio (Fig. 1H). O pirênio é marrom- amarelado, com consistência firme, formato ovóide,

estreitando-se em um dos pólos, apresenta dimensões de  $1,9 \pm 2,4$  cm de comprimento;  $1,7 \pm 2,1$  cm de largura,  $1,3 \pm 1,7$  cm de espessura e com peso médio de  $0,7 \pm 2,3$  g. A região de ligação funicular é caracterizada por mancha branca, com consistência e textura distintas do restante do pirênio (Fig. 1D).



**Figura 1.** Estudos morfológicos de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Ramo de inflorescência **B.** Detalhe das flores miúdas e amarelas **C.** Ramo de infrutescência **D.** Semente com cicatriz funicular (seta) **E.** Epicarpo reticulado (seta) **F.** Frutos ovóides e imaturos **G.** Detalhe do endocarpo **H.** Detalhe de resquísio de mesocarpo no pirênio **I.** Detalhe dos cotilédones contortuplicados (setas).

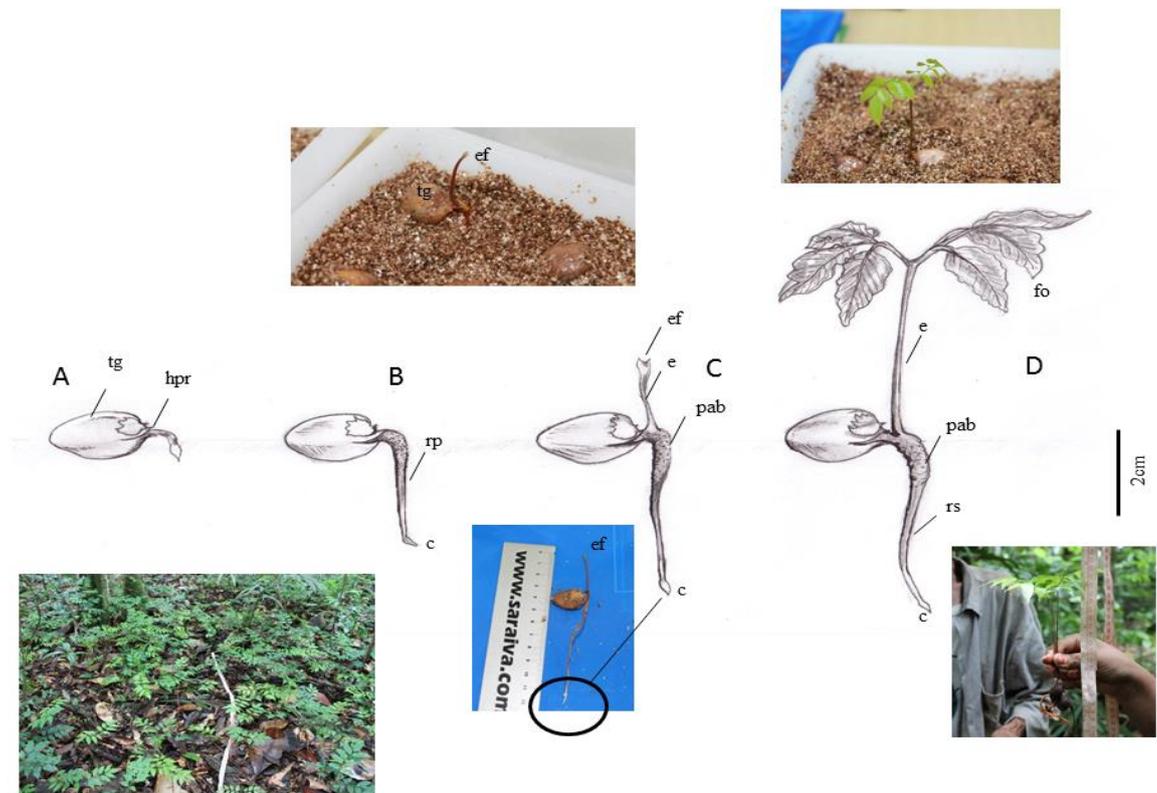
As sementes de *P. altsonii* são exalbuminosas, dormentes (provavelmente devido à resistência do endocarpo), com imaturidade embrionária, presença de substâncias fenólicas e, apresentam taxa de germinação muito baixa (2,4 %). Adicionalmente, das sementes que não germinaram (97,6%), 20% encontravam-se apenas com o tegumento e 77,6% somente com os

cotilédones. (12) germinaram e chegaram à fase de plântulas. É importante ressaltar que, as sementes observadas em campo apresentaram desenvolvimento similar às estudadas em laboratório. Contudo, a taxa de germinação é mais eficiente em campo, uma vez que, das 5000 sementes observadas em campo, 81,62 % germinaram. Outras sofreram ataque de herbívoros (7,26 %) ou simplesmente não germinaram (11,12 %).

*P. altsonii* apresenta estratégias ecológicas em campo, onde seus frutos amadurecem e suas sementes germinam no período de maior precipitação. Seu pseudo arilo é responsável em manter a semente hidratada até sua remoção por pássaros que se alimentam dessa massa succulenta e adocicada. Apesar de suas sementes serem recalcitrantes, a mesma consegue estabelecer essa estratégia conservativa no ambiente. Uma vez rompida, a emergência da parte aérea ocorre em três semanas e a formação de plântulas após quatro semanas. O epicótilo se alonga posteriormente à protusão da radícula e as duas primeiras folhas se expandem. Os folíolos e o caule, quando feridos, exalam um odor agradável de bálsamo, devido à exsudação de resina, característica marcante da família.

No que diz respeito à morfologia da germinação, pode-se inferir que é o tipo hipógea, criptocodiledonar, com emissão do eixo hipocótilo-radícula ocorrendo após o rompimento do ápice do pirênio, após 12 dias de semeadura. O eixo hipocótilo-radícula é do tipo hipógeo, cilíndrico, curto, evidente, verde escuro e com, aproximadamente, 3 cm de comprimento (Fig. 2A). A protusão da raiz primária ocorre em torno do 14 dias após a semeadura e é caracterizado por ser curta, cilíndrica, com pêlos absorventes diminutos, crescimento rápido, de coloração creme e glabra, tornando-se espessa e castanha em direção ao ápice à medida que se desenvolve (Fig. 2B). No ápice localiza-se a coifa de coloração branca (Fig. 2C). As raízes são curtas, esparsas, delgadas e ramificadas (Fig. 2B-C). Apresenta cotilédones persistentes, com coloração castanha clara (Fig. 2).

Após três dias da emissão do eixo hipocótilo-radícula ocorreu a projeção do epicótilo, possuindo, com, aproximadamente 0,3 cm de comprimento e coloração verde, tornando-se espesso e castanho escuro durante o seu desenvolvimento. O coleto é inconspícuo e os primeiros eófilos foram emitidos em cerca de três dias (Fig. 2C).



**Figura 2.** Estádios da germinação até o desenvolvimento de plântula de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Semente com ruptura do tegumento (tg) e protrusão do eixo hipocótilo-radicular (hpr) **B.** Desenvolvimento da raiz primária (rp) **C.** Formação do epicótilo (e) primeiros eófilos (ef), pêlos absorventes (pab) **D.** Elongação do epicótilo (e), formação dos folíolos (fo), crescimento das raízes secundárias (rs); plântula criptocodiledonar com 12 meses.

Quanto à morfologia da plântula, *P. altsonii* chega a essa fase cerca de 30 dias após a sementeira. Apresenta sistema radicular axial; raiz primária cilíndrica, amarelada a castanha;

raízes secundárias cilíndricas; delgadas, amareladas, distribuídas irregularmente ao longo da raiz primária. O hipocótilo é reduzido e dilatado com, aproximadamente, 0,2 cm de comprimento, amarelado e glabro. O eixo do epicótilo é cilíndrico, ereto, logo em relação ao hipocótilo, com cerca de 6,5 cm de comprimento, sub-lenhoso, verde-claro a amarelo, pubescente. Apresentam dois eófilos simples, unifolialados, opostos, membranáceos, folíolos oval-elíptico, verdes, opacos, ápice acuminado, base obtusa a arredondada, margem inteira, levemente serreada no ápice, glabro na face adaxial; e puberulento na face abaxial. Pecíolo foliar delgado, ca. 0,1cm de comprimento, pubescente, peciólulo curto ca. de 0,1 cm (Fig. 2 C-D). Nesse estágio de desenvolvimento já são consideradas plantas jovens com 12 meses.

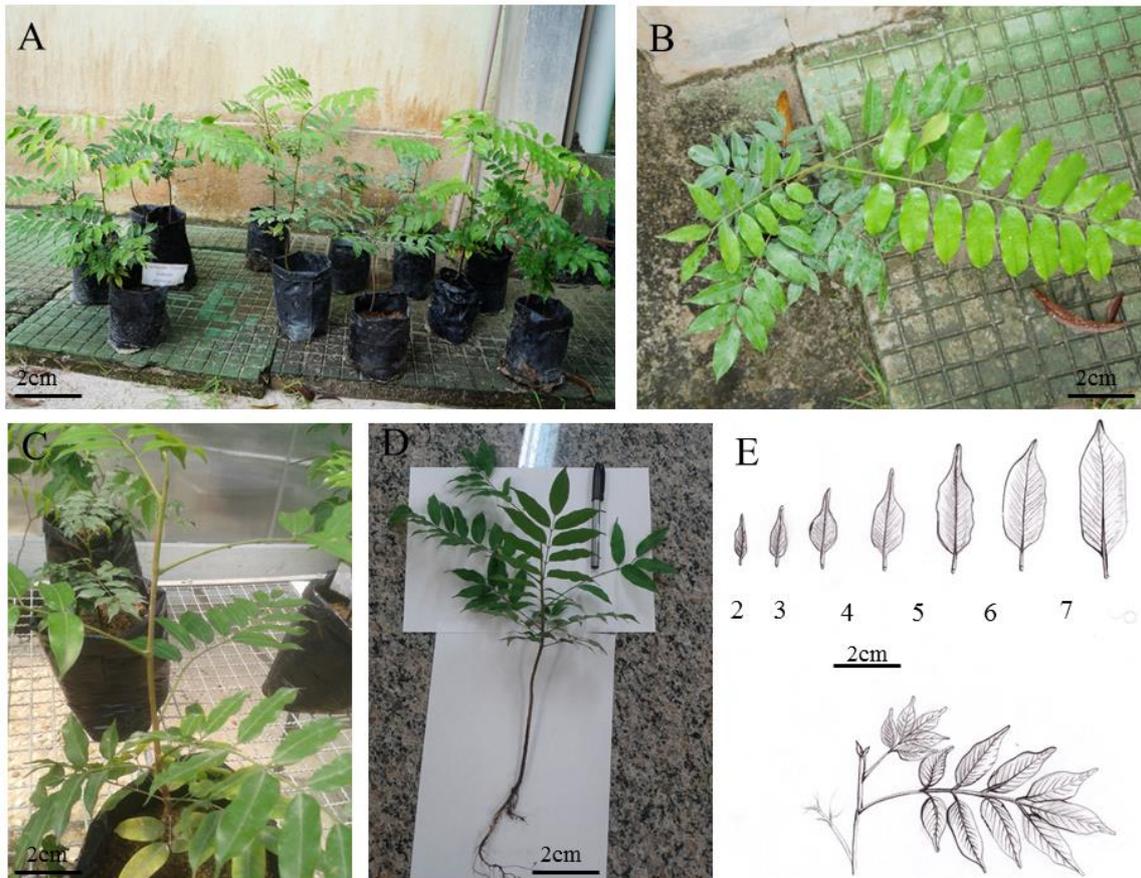
Após 12 meses da semeadura muitas plantas jovens ainda se encontram com seus cotilédones, tanto nas observações dos ensaios em casa de vegetação, quanto em campo (Fig. 2D). Adicionalmente, *P. altsonii* forma um banco de plantas jovens em ambientes sombreados com alto índice de sobrevivência, com altura em torno de 5 a 8,5cm de comprimento e 2 a 2,8cm de diâmetro, com a presença de 3 a 4 folíolos completamente expandidos (Fig. 2).

Nas plantas jovens, as primeiras folhas ( $3 \pm 6$  cm) são compostas, inicialmente trifolioladas (Fig. 2D), imparipinadas, opostas e exalam odor balsâmico. Apresentam pecíolo curto, verde (0,3 a 0,6cm), pulvino (ca. 0,1cm), peciólulo (ca. 0,3cm), pulvínulo (ca. 0,1cm). Os folíolos (ca. 3cm), são elípticos a levemente ovados, verdes brilhantes. A lâmina foliar é verde e lisa em ambas as fases; com a base arredondada e ápice agudo a acuminado; margem inteira, porém crenada no ápice; venação pinada; venação secundária broquidódroma (Fig. 2D). As próximas folhas apresentam algumas características morfológicas similares às descritas para as primeiras folhas, exceto para o pecíolo ( $3 \pm 5$  cm) e folíolos em número de 5 a 7 ( $3 \pm 10$  cm) (Fig. 3). O caule é lenhoso, marrom e, quando feridos exalam um odor balsâmico, suas raízes são bastante ramificadas (Fig. 3D).

### *Morfologia foliar*

Nas condições naturais, os indivíduos de *P. altsonii* apresentam copa frondosa com perda foliar no período de menor precipitação. Ocupam posição no estrato da floresta de dossel ou subdossel, formando populações agregadas à medida que ocorrem elevações topográficas. As diferentes espécies de *Protium* que foram registradas na área da RDS dividem espaços com espécies com grande valor econômico como Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), Copaíba (*Copaifera* sp.), Angelim (*Dinizia excelsa*), Cumaru (*Dipteryx odorata*), dentre outras.

Em sub-bosque, as folhas das plantas jovens com dois anos e seis meses são compostas, imparipenadas podem apresentar 6 até 11 pares de folíolos, com  $7,8 \pm 12,3 \times 3,0 \pm 5,4$  cm, pecíolo  $1,2 \pm 4,6$  cm de comprimento, levemente canaliculado, com lenticelas, cilíndrico, tricomas finos, simples, diminutos e eretos, esparsos; peciólulo delicado,  $0,7 \pm 1,7$  cm de comprimento, cilíndrico, com tricomas simples e eretos, esparsos (Fig. 3A-B), pulvínulo inconspícuo; folíolo  $2,5 \pm 4,6 \times 5,5 \pm 7,0$  cm, com 13 a 19 folíolos, elíptico, ápice acuminado, base assimétrica a aguda (Fig. 3C-D), ápice do folíolo com a borda inteira, membranáceo, glabro na face superior, puberulento na inferior; nervura principal proeminente em ambas as faces com tricomas finos, densos a esparsos na face inferior; venação broquidódroma (Fig.3E).



**Figura 3.** Estádios sucessivos do desenvolvimento de plantas jovens de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Plantas com 24 meses em casa de vegetação **B.** Folhas compostas, imparipinadas **C.** Arquitetura foliar **D.** Crescimento das raízes **E.** Folhas em diferentes estádios de desenvolvimento.

As folhas adultas são compostas, imparipinadas podem apresentar seis ou mais pares de folíolos por galho, com  $17,8 \pm 22,3 \times 10,0 \pm 21,1$  cm, pecíolo  $2,2 \pm 5,6$  cm de comprimento, cilíndrico, levemente canaliculado, com lenticelas, tricomas finos, simples, diminutos e eretos, densos a esparsos; pecíolulo delicado,  $1,0 \pm 2,7$  cm de comprimento, cilíndrico, com tricomas simples e eretos, densos a esparsos (Fig. 4A-B), pulvínulo inconspícuo, às vezes evidente; folíolo  $10,5 \pm 4,6 \times 14,5 \pm 5,0$  cm, com 17 a 21 folíolos, elíptico, ápice acuminado, base assimétrica a aguda (Fig. 4D), ápice do folíolo com a borda levemente serrada, membranáceo, glabro na face superior, puberulento na inferior; nervura

principal proeminente em ambas as faces com tricomas finos, densos a esparsos na face inferior; venação broquidódroma (Fig. 4C-D).



**Figura 4.** Folhas adultas de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Ramo com cinco pares de folíolos **B.** Pulvínulo inconspícuo (seta vermelha) e lenticelas (seta branca) **C.** Folhas compostas, imparipinadas **D.** Folíolo elíptico com ápice acuminado.

#### *Anatomia da semente*

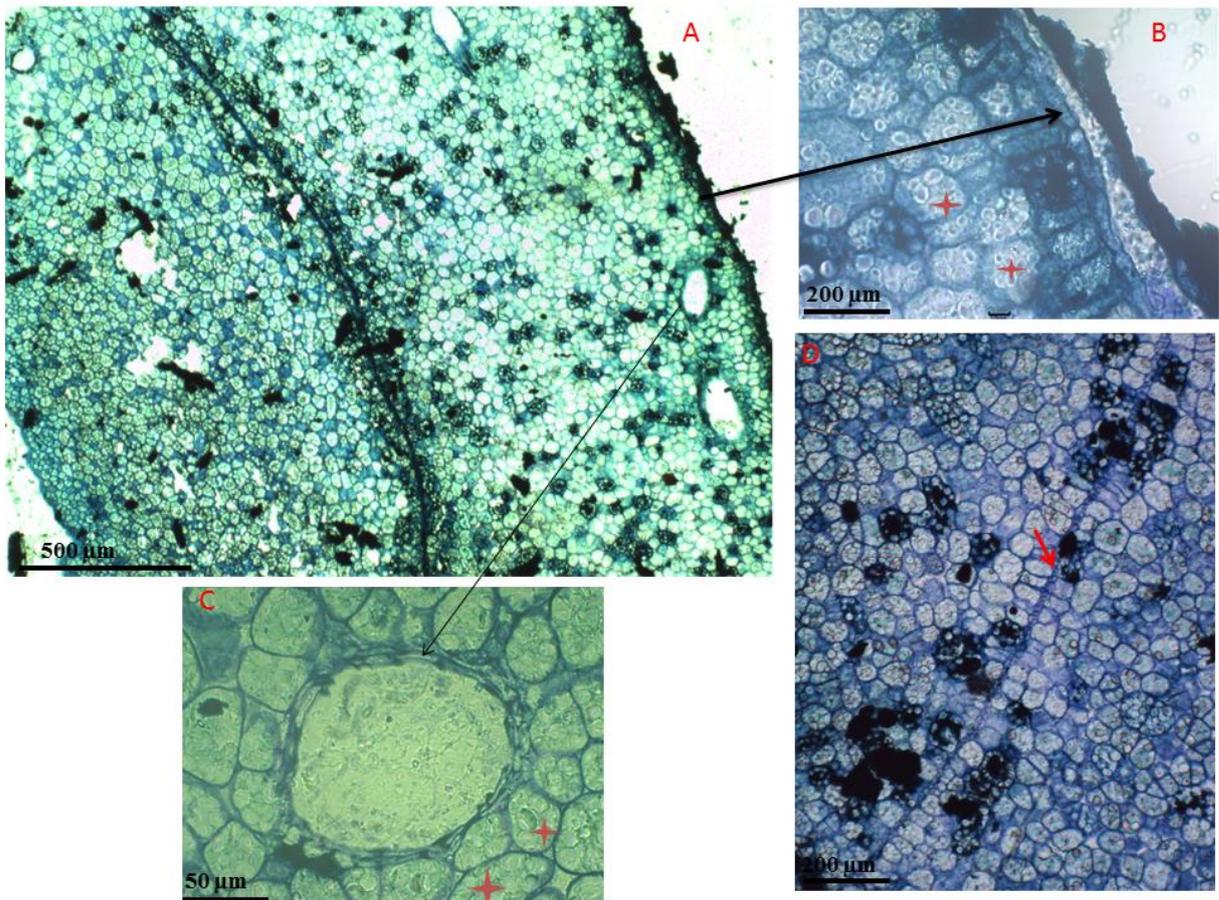
A semente de *P. altsonii*, após corte transversal na região abaxial, é formada por revestimento do envoltório seminal com células colapsadas, parênquima cotiledonar carnoso

com cavidades secretoras e outras substâncias. Na região adaxial da epiderme, em corte transversal, as células são justapostas e achatadas entre os dois cotilédones (Fig. 5D).

Os cotilédones em secção longitudinal são contortuplicados (Fig. 5I) e apresentam reservas de células com mucilagem, óleo, lipídios, proteínas e substâncias fenólicas, como cumarina e taninos, encontrados nos testes histoquímicos da espécie estudada (Fig. 5A-D).

As sementes apresentam uma camada reduzida de endosperma, com células com paredes finas (Fig. 5A). Adicionalmente, a presença de óleo ocorre em cavidades especializadas distribuídas por todo o parênquima cotiledonar, formada por células epiteliais (Fig. 5 A-C), além de células secretoras individuais com conteúdo de óleo, mucilagem, terpenos e substâncias fenólicas (Fig. 5B-D).

Durante os cortes anatômicos foram encontrados cotilédones volumosos ocupando quase toda a semente. Das 488 sementes que não germinaram em laboratório, 10 foram avaliadas em cortes transversais e, em apenas 20% foi registrada a presença de eixo embrionário (Fig. 5A). Dos registros em campo, a maioria apresentou eixo embrionário (81,62 %) e das que não germiaram (11,12 %) a presença de cumarina no parênquima cotiledonar era evidente (Fig. 5D). Porém, à medida que os cortes eram realizados no tecido com o passar do tempo observa-se que a cumarina desaparecia.



**Figura 5.** Estudos anatômicos da semente de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Corte transversal, evidenciando o envoltório seminal, células parenquimáticas dos cotilédones cheios de conteúdo de mucilagem e compostos fenólicos **B.** Detalhe na seta da camada de endosperma reduzido e células com óleo (estrela) **C.** Corte transversal da cavidade secretora com células epiteliais, e gotículas de óleo (estrela) **D.** Corte transversal da região adaxial, separando os dois cotilédones (seta), presença de cumarina.

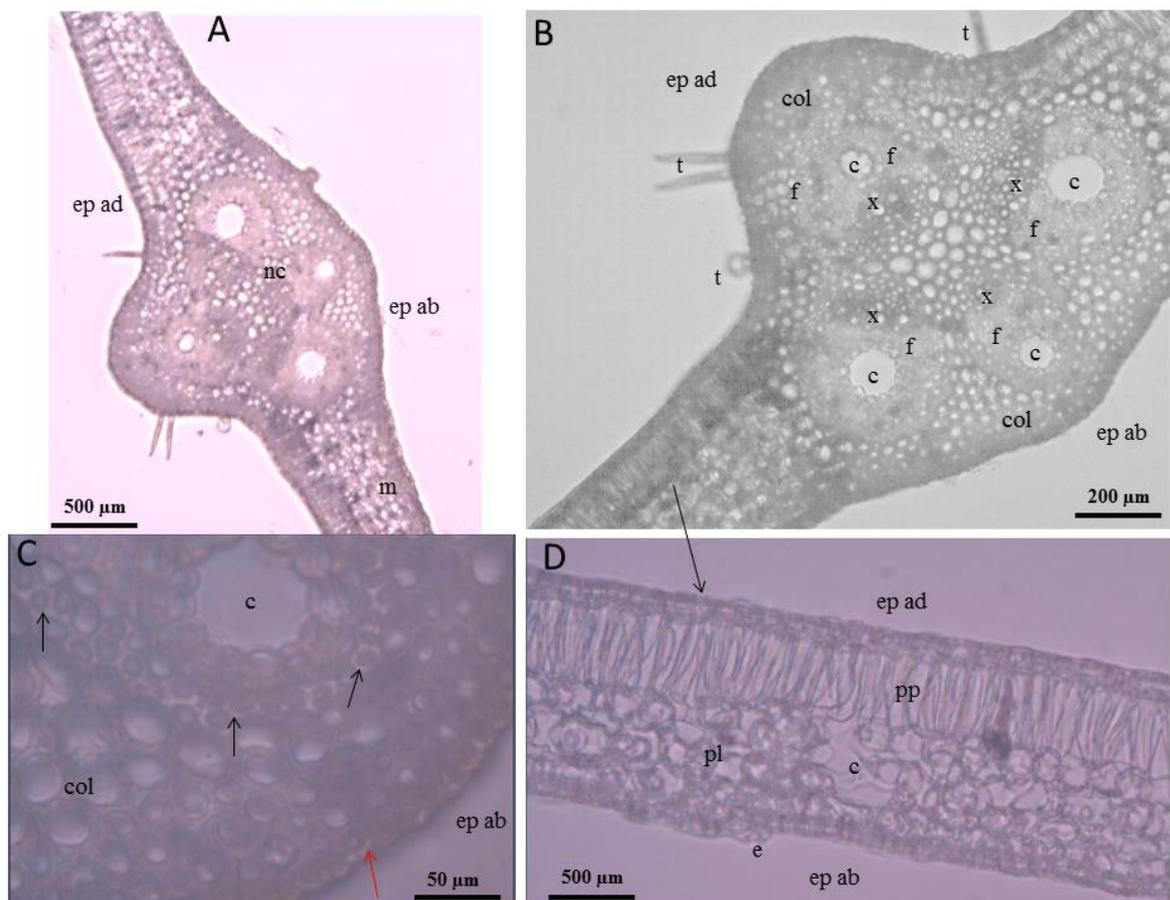
### *Anatomia foliar*

Em corte transversal da nervura central na região do terço inferior das folhas jovens de sombra, as epidermes apresentam cutícula fina, parede anticlinal e periclinal com depósito de lignina e substâncias fenólicas, com células heterodiamétricas (Fig. 6A-B). Apresenta colênquima lamelar adjacente as epidermes de 2 a 3 fileiras de células desorganizadas, com

espessamento tangencial nas paredes das células e pequenos espaços intercelulares (Fig. 6B-C). Tricomas secretores estão localizados na epiderme abaxial, onde encontramos do tipo pluricelular e glandular (Fig. 6B).

O feixe vascular é contínuo, onde o xilema e floema ainda estão em desenvolvimento. Sendo, intercalados por canais secretores de óleo localizados entre os floemas (Fig. 6B). Logo acima uma faixa contínua de esclerênquima circundando os canais e o conjunto de feixes (Fig. 6C). Os dois canais que estão próximo às epidermes ainda está em formação (Fig. 6A). Presença de terpenos e alcaloides em todo tecido.

O mesofilo, em corte transversal é dorsiventral, onde o parênquima paliçádico é formado por duas camadas de células curtas, estreitas, com paredes finas; já o parênquima lacunoso apresenta diferentes formatos celulares com pequenas lacunas e canais em formação nas nervuras secundárias e terciárias (Fig. 6B).

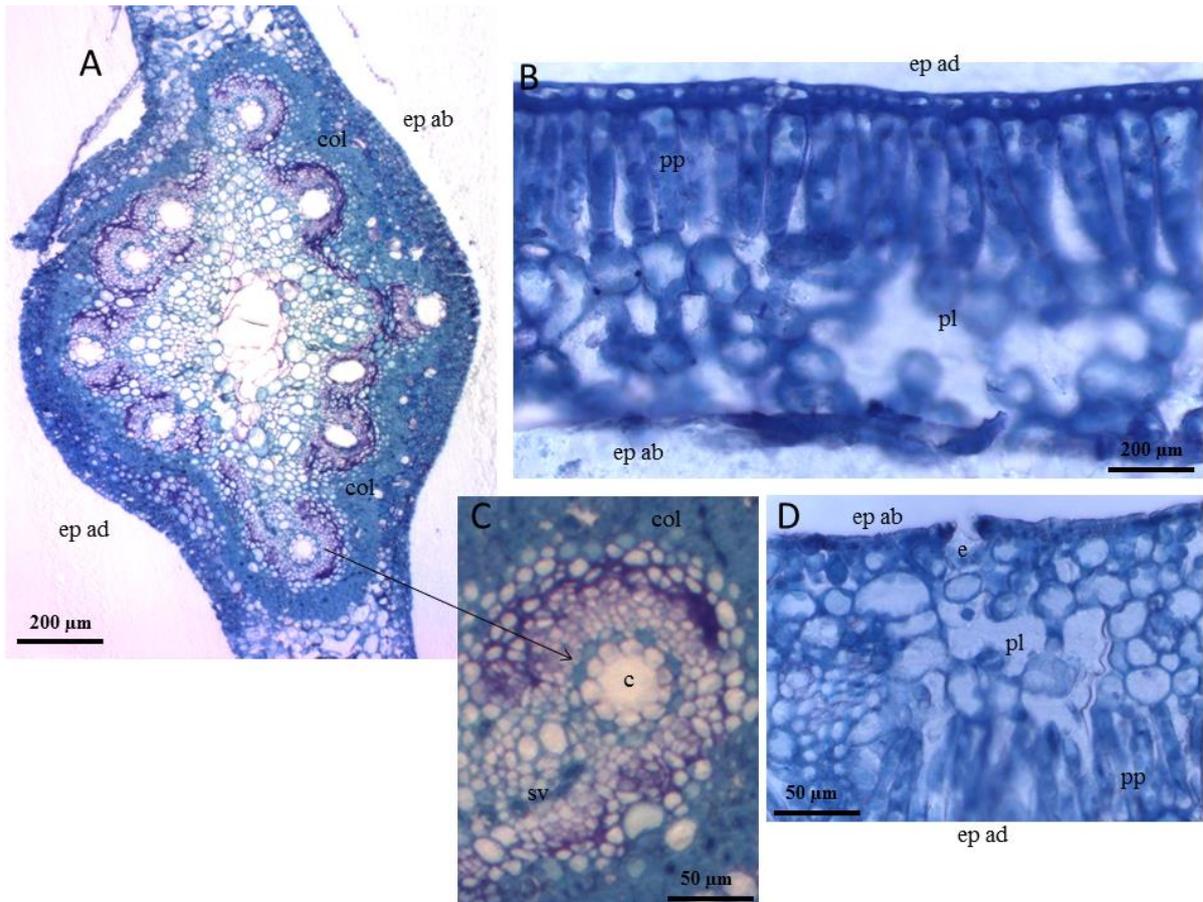


**Figura 6.** Anatomia de folhas jovens de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Corte transversal da nervura central **B.** Detalhe dos diferentes tricomas na epiderme adaxial (ep ad) e diversos canais secretores **C.** Detalhe da epiderme abaxial com substâncias fenólicas (seta vermelha), colênquima (col) e faixas de esclerênquima (seta preta) **D.** Detalhe do parênquima paliçádico (pp), lacunoso (pl) com canais (c) e estômatos (e) na epiderme abaxial.

A anatomia em folhas adultas de sol, em corte transversal da nervura central na região do terço inferior, as epidermes apresentam a cutícula espessada, parede anticlinal e periclinal com depósito de lignina, epiderme com células heterodiamétricas. Apresenta um colênquima lamelar adjacente as epidermes de 4 a 6 fileiras de células desorganizadas, com espessamento tangencial nas paredes das células (Fig. 7A). Não foram observados tricomas nas epidermes.

O feixe vascular é contínuo, onde o xilema e floema estão intercalados por canais secretores de óleo localizados entre os floemas (Figura 7A-C). Logo acima uma faixa contínua de esclerênquima circundando os canais e o conjunto de feixes (Figura 7A). De acordo com a expansão do tecido foliar ocorrem a formação de novos canais (Figura 6A). Presença de terpenos e alcaloides.

O mesofilo, em corte transversal é dorsiventral, onde o parênquima paliçádico é formado por camada única de células longas, largas com paredes espessas e presença de cloroplastos, entre suas células observam-se pequenos meatos; já o parênquima lacunoso apresenta diferentes formatos celulares com lacunas e canais nas nervuras secundárias e terciárias (Figura 7B-D).

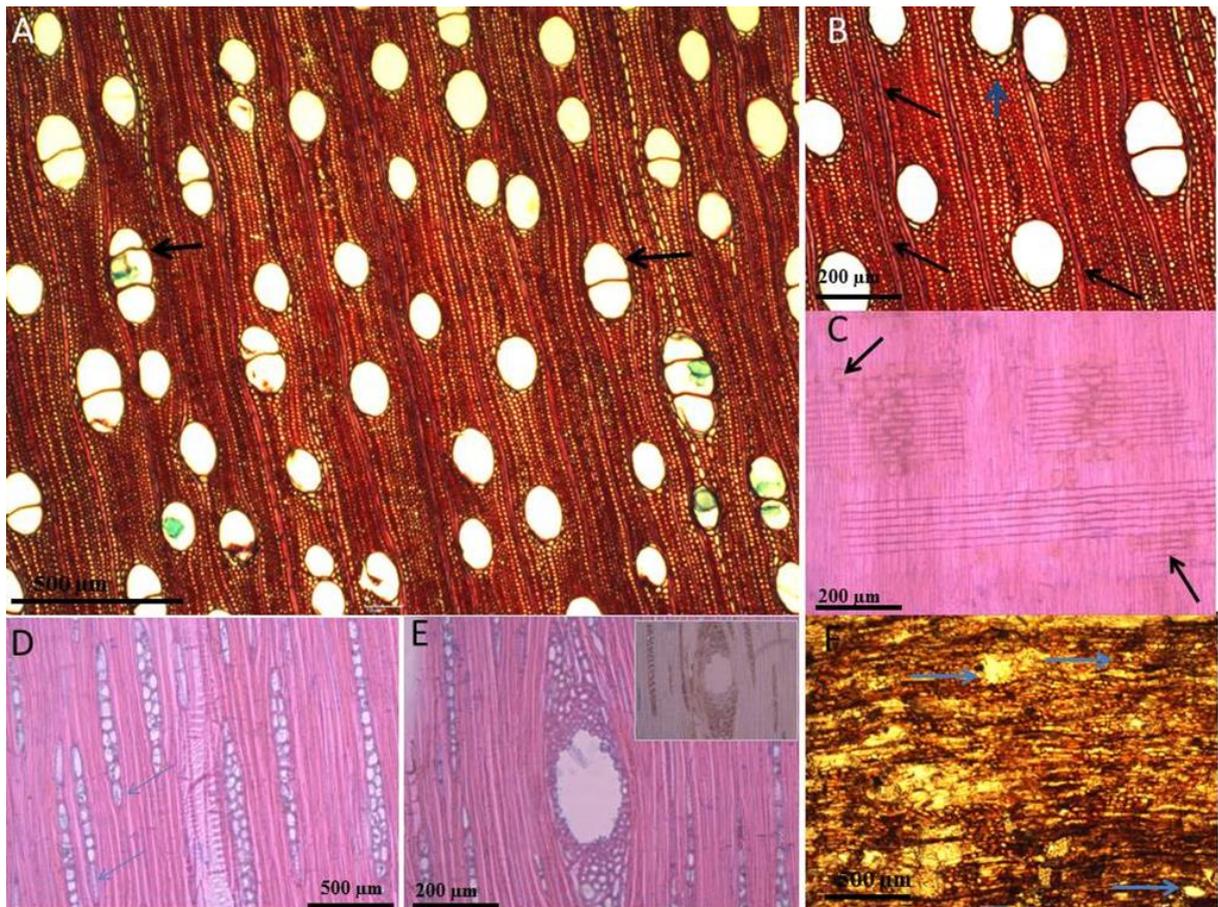


**Figura 7.** Anatomia de folhas adultas de *Protium altsonii* Sandwith **A.** Corte transversal da nervura central **B.** Detalhe do parênquima paliçádico com meatos (pp), lacunoso (pl) **C.** Detalhe do canal secretor e colênquima (col) **D.** Estômatos (e) na epiderme abaxial.

### *Anatomia da madeira*

A casca, em corte longitudinal apresenta numerosas células heterodiamétricas, com canais secretores e células com conteúdo. Em testes histoquímicos presença de lipídios, mucilagem, óleo e substâncias fenólicas (Figura 8F). Em corte transversal da madeira numerosos vasos solitários e múltiplos; pequenos a médios (Figura 8A); elementos vasculares com placa de perfuração simples (Figura 8D). Presença de vasos constituídos por elementos vasculares curtos (Figura 8D). Fibras libriformes, septada finas, de muito curtas a curtas (Figura 8A). Parênquima axial difuso (3 a 5 células por parênquima) e presença de conteúdo

lipídico nas células do raio (Figura 8B). Parênquima radial heterogêneo, em corte longitudinal radial formado por células procumbentes com uma fila de células marginais quadradas ou eretas dos raios. Presença numerosa de conteúdo fenólico nessas células (Figura 8C). Em corte longitudinal tangencial, as células podem ser unisseriadas a bisseriadas, com predominância de bisseriadas. As porções unisseriadas são altas, heterocelular (Figura 8D). Presença de canais intercelulares simples secretando óleo, em corte longitudinal tangencial (Figura 8E) e cristais prismáticos dentro das células quadradas ou eretas dos raios, em corte longitudinal radial (Figura 8D). Qualquer corte que ocorra na árvore em qualquer local e altura promove o extravasamento do óleo resina.



**Figura 8.** Características anatômicas gerais da madeira de *Protium altsonii* Sandwith. **A.** Vista geral do corte transversal, com numerosos vasos solitários e múltiplos (seta). Não há evidência de camada de crescimento **B.**

Detalhe de uma região corte transversal, parênquima axial difuso (seta azul), células do raio apresentado conteúdo lipídico (setas pretas) **C.** Detalhe do corte longitudinal radial, os raios formados por células procumbentes envoltas por camadas de células quadradas ou eretas com conteúdo lipídico e cristais prismáticos (setas) **D.** Corte longitudinal tangencial, com raios unisseriados e bisseriados, detalhe na seta de células prismáticas **E.** Detalhe do corte longitudinal tangencial, com canal intercelular simples, no detalhe secreção de óleo **F.** Corte longitudinal da casca, com canais secretores (setas) com conteúdo lipídico.

## Discussão

Durante o desenvolvimento morfológico não há sincronia entre o fruto e o embrião, ou seja, quando os frutos estão maduros, os embriões ainda se encontram na fase rudimentar no momento da dispersão. Nesse sentido, sugere-se que um dos fatores que influenciaram o processo germinativo, seja devido à imaturidade embrionária, além da presença de substâncias fenólicas (Daly 1989). Assim como para a *P. altsonii*, as espécies *P. spruceanum* (Benth.) Engl., *P. aracouchini* (Aubl.) e *P. pilosissimum* Engl. apresentam taxa de germinação baixa, em torno de 10% (Melo *et al.* 2007). Após a fertilização, o fruto e o pirênio desenvolvem-se mais rápido que a semente, alcançando seu tamanho máximo bem antes do embrião expandir-se e ocupar a cavidade interna do pirênio (Daly 1989).

Em estudo envolvendo a espécie *P. widgrenii* Engler. observou-se em torno de 70 % de sementes mal formadas, tendo comportamento típico recalcitrante, pois tiveram seu percentual de germinação reduzidos com a dessecação (Seiffert *et al.* 2006). Adicionalmente, sementes recalcitrantes apresentam alta suscetibilidade à perda de água, o que faz com que seja necessário o armazenamento com alto grau de umidade (Vidal & Vidal 2000). Em *P. altsonii*, suas sementes também apresentam comportamento recalcitrante, com taxa de germinação baixa.

Diferentes interpretações morfológicas são atribuídas aos frutos desse gênero, como drupas, drupáceos, filotrimídio e nukulânios (Roosmalen 1985; Daly 1987; Beltrati 1992; Spjut 1994; Barroso *et al.* 1999; Melo *et al.* 2007). Os caracteres morfológicos mais relevantes para a delimitação de algumas espécies de *Protium* foram encontrados, principalmente, na coloração, forma e superfície do fruto (Melo *et al.* 2007). O tamanho, a forma e o tipo de deiscência dos frutos são características imprescindíveis para sua classificação (Barroso *et al.* 1999).

O desenvolvimento dos frutos resulta em uma variedade de mudanças fisiológicas como teor de água, cor, consistência, odor, sabor e dimensões físicas (Dias *et al.* 2013). A descrição dos frutos, dentro de um contexto ecológico representa importante para a compreensão da biologia reprodutiva das espécies (Paoli & Bianconi 2008). Ademais, a biometria de frutos e sementes, bem como o conhecimento da morfologia e desenvolvimento das plântulas é fundamental para subsidiar estudos de germinação e produção de mudas para recomposição vegetal (Silva *et al.* 2014).

Diferentes opiniões também ocorrem na definição de um termo adequado para a polpa adocicada que envolve o pirênio, como ariloide ou pseudarilo (Daly 1987; Barroso *et al.* 1999; Beltrati 1992). O pirênio é uma estrutura que pode auxiliar tanto na identificação de frutos, como também de plântulas, uma vez que, em geral, é persistente nessa fase do ciclo de vida. Dentre os caracteres utilizados para a descrição taxonômica destacam-se: forma, coloração, presença ou ausência de tricomas, textura, consistência e espessura. Os pirênios em Burseraceae são geralmente ovóides, com ápice agudo, de consistência cartilaginosa (*P. paniculatum* variedade *riedelianum*) a óssea (*P. subserratum*), glabras ou pubescentes, com superfície diferenciada em torno da cicatriz funicular, de diferentes formas e tamanho (Melo *et al.* 2007).

O gênero *Protium* apresenta ampla diversidade morfológica das sementes e do processo germinativo, assim como a família Burseraceae como um todo, onde os cotilédones podem ser inteiros ou lobados e retos, contorduplicados ou dobrados no sentido vertical e/ou horizontal; a germinação pode ser hipógea ou epígea e cripto ou fanerocotiledonar; e tanto os eófilos como os metafilos podem ser opostos ou alternos e simples, unifoliolados, trifoliolados ou pinados, com margem inteira ou serrilhada (Duke 1969; Vogel 1983; Melo *et al.* 2007; Daly 2011).

O Comportamento morfológico e os diferentes tipos de germinação foram observados em nove espécies de *Protium*, onde a maioria teve registro de dormência na germinação (Melo *et al.* 2007). A maturidade dos frutos nem sempre é uma condição necessária para indicar que os embriões estão aptos para germinar, mas a integridade e o completo desenvolvimento do embrião são fundamentais para a germinação (Daly 2011).

Espécies com cotilédones carnosos são adaptadas a ambientes sombreados e formam um banco de plântulas com índice mais alto de sobrevivência (Garwood 1996). A presença de cotilédones armazenadores e persistentes (que em alguns casos, permanecem nas plântulas por quase um ano) deve suprir, em grande parte, as necessidades de recursos durante a fase de plântula (Garwood 1996). O investimento em cotilédones de reserva pode assegurar a sobrevivência das plântulas tolerantes à sombra até o surgimento de uma clareira, diminuindo a possibilidade de dessecação da plântula jovem (Dias *et al.* 2013; Alves *et al.* 2013).

Por meio da morfologia de plântulas é possível reconhecer as peculiaridades de cada táxon. O conjunto de caracteres com base na composição, margem e ápice dos eófilos das plântulas de *Protium*, além de muito importantes, servem como subsídio para o reconhecimento das espécies em campo (Melo *et al.* 2007). Tais estruturas transitórias permitem ampliar o conhecimento das estruturas essenciais da plântula ao logo do seu

desenvolvimento e possibilitam a caracterização da espécie, especialmente aquelas de ecossistemas florestais (Gurgel *et al.* 2012).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente associados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução desses organismos e, são frequentemente sintetizados como subprodutos do metabolismo de compostos primários. Esses metabólitos secundários exercem papel fundamental nas defesas contra herbívoros, além de atuarem como inibidores da germinação (Castro *et al.* 2004).

A cumarina é um composto fenólico inibidor natural da germinação amplamente conhecido e com grande espectro de ocorrência, sendo também responsável por afetar outros processos fisiológicos (Perez & Moraes 1991). Compostos fenólicos em vegetais, principalmente taninos, têm reconhecidamente a função de inibir herbívoros em frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens de plantas (Fahn 2000; Esau 2006).

No que diz respeito à morfologia das sementes do gênero *Protium*, em *P. unifoliolatum*, as sementes são bitegmentadas e há várias camadas tegumentares e o endosperma encontra-se reduzido a uma única camada de células, corroborando com o observado em *P. altsonii* (Corner 1976).

O embrião, geralmente, consiste de um eixo, hipocótilo-radícula, um ou mais cotilédones e o primórdio caulinar. Os primórdios de raiz e de caule podem ser apenas meristemas apicais e, às vezes, há uma raiz embrionária (radícula) na extremidade inferior do hipocótilo e um caule embrionário, acima da inserção dos cotilédones, o qual consiste de um eixo com entrenós não estendidos e um ou mais primórdios foliares. Esta primeira gema apical é comumente denominada plúmula e sua parte caulinar, epicótilo (Carvalho & Nakagawa 2000).

Os cotilédones são estruturas seminais, de formato variável, ligadas ao eixo embrionário, com função de absorver e reservar alimentos do endosperma e/ou perisperma,

que serão usados durante a germinação. A perda de vigor e viabilidade das sementes envolvem principalmente alterações no eixo embrionário (Carvalho & Nakagawa 2000). O embrião dessas sementes normalmente forma cotilédones carnosos que armazenam substâncias nutritivas e ocupam o maior volume da semente (Corner 1976; Appezzato da Gloria & Carmello - Guerreiro 2006).

Cavidades secretoras em frutos e sementes formam secreção em células que eventualmente se rompem e livram substâncias em seu interior (Metcalf & Chalk 1950). As células secretoras internas possuem grande variedade de conteúdos. Aparecem frequentemente como células especializadas dispersas entre outras menos especializadas (Appezzato da Gloria & Carmello- Guerreiro 2006). Em *P. altsonii*, no tecido parequimático a presença de substâncias é muito grande, apresentando muitas células secretoras.

Em *P. altsonii* a morfologia foliar é bastante diversificada, onde ocorrem algumas características morfológicas foliares distintas entre plantas jovens e folhas adultas, semelhante ao que foi descrito para *P. apiculatum* Swart., *P. decandrum* (Aubl.) March., *P. hebetatum* Daly e *P. spruceanum* (Benth.) Engl. (Camargo *et al.* 2008; Lima *et al.* 2014).

Em indivíduos com folhas em sombreamento jovem ou adulto de *P. altsonii*, o ápice é mais acuminado. Essa morfologia é marcante em regiões de alta umidade e associado com o escoamento da água da chuva, permitindo uma rápida secagem e evitando epifilia, isso é uma vantagem para os processos de fotossíntese e respiração (Rossato *et al.* 2010). A funcionalidade foliar é uma característica ecológica importante que indica o efeito integrado de vários fatores tais como condições microclimáticas, dinâmica de nutrientes e herbivoria (Asner *et al.* 2003). Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade, na qual uma espécie está adaptada, podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento (Atroch *et al.* 2001).

A resina e os óleos essenciais obtidos da casca, madeira e folhas são amplamente utilizados na medicina popular. O breu é usado em distúrbios gástricos, problemas respiratórios e do sistema nervoso. Há fontes que indicam seu uso para tratamento de doenças esplênicas e sífilis. Alguns de seus constituintes têm reconhecida ação antibiótica, cercaricida, antiinflamatória, expectorante e cicatrizante (Otuki *et al.* 2005; Lima *et al.* 2005).

São usados caracteres morfológicos que auxiliam na identificação de espécies em Burseraceae são: 1) cor da resina; 2) odor; 3) margem da folha; 4) tamanho e número de folíolos; e 5) textura da folha (Fine, 2005). Em *P. altsonii* essas características são extremamente essenciais para a descrição da espécie. A anatomia da madeira envolve o estudo dos diversos tipos de células que integram o xilema secundário (lenho), sua organização, funções e particularidade estruturais (Zenid 2008), podendo fornecer subsídios importantes à identificação de grupos taxonômicos em diversos níveis.

Os estudos sobre anatomia da madeira ainda são muito raros, destacando-se (León Hernández 2002) que estudou a anatomia de sete espécies venezuelanas, e (Clair *et al.* 2006) que analisou a ocorrência e a eficiência de lenho de reação em 21 espécies tropicais, entre elas *P. opacum* Swart.

Portanto, a morfologia da espécie *Protium altsonii* é essencial para assegurar a sobrevivência das plântulas em campo. Suas características morfológicas do fruto, semente e foliares, além da sua anatomia permitem dizer que essa espécie apresenta estratégia ecologia como a plasticidade fenotípica. A eficiência da germinação em campo dessas espécies pode ter sido em função da liberação da cumarina presente nos cotilédones, à medida que o solo é lavado pela chuva durante o período de maior precipitação. Já em condições controladas a presença de cumarina inibiu a germinação.

A presença de tanino em todo parênquima cotiledonar pode servir como um composto anti-herbivoria, devido a sua ação adstringente. A estrutura anatômica da semente de *P.*

*altsonii* não foi encontrada na literatura, incluído esse estudo uma nova contribuição para o gênero, além de indicar presença de metabólitos secundários como óleo e mucilagem.

A morfologia foliar é diversificada entre folhas de jovens e adultas, caracterizando bem as diferenças de idade;

Qualquer corte que ocorra na madeira de *P. altsonii* em qualquer parte e altura da árvore promove o extravasamento da resina, pois essa espécie é formada por canais intercelulares que percorrem todo o raio parenquimático.

### **Agradecimentos**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Capes e a Fundação do Amapá-FAPEAP pelo auxílio financeiro ao primeiro autor. Ao Museu Paraense Emilio Goeldi por toda ajuda na parte anatômica; ao Dr. Douglas Daly do New York Botanical Garden, USA pela identificação das espécies; ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA pelo apoio logístico e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA pela oportunidade de desenvolver o trabalho de doutorado; a SEMA pela autorização de coleta na RDS do Rio Iratapuru e a Comunidade de São Francisco pelo suporte em campo.

### **Referências**

ALVES, M. C. J. L.; LIMA, P. B.; LIMA, L. F.; ZICKEL, C. S. Descrição morfológica para identificação das plantulas de nove espécies lenhosas de uma floresta de restinga. **Biota Neotropica** vol. 13, no. 3, 2013.

ALVES, M. V. P.; SILVA, J. C. S.; COSTA, C. J. Caracterização Morfológica de Frutos, Sementes, Plântulas e Mudanças de *Emmotum nitens* (Benth.) Miers (ICACINACEAE). **Revista Verde (Mossoró – RN - Brasil)**, v 9. n. 2 , p. 59 - 67, 2014.

APPEZZATO GB.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. Ed. Viçosa: Ed. UFV. 438p., 2006.

ARAÚJO NETO, J. C.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M.; PAULA, R. C. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 203-211, 2002.

ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas a diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 4, p. 853-862, 2001.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L. & ICHASO, C.L.F. **Frutos e Sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 1999.

BELTRATI, C.M. Morfologia e anatomia de sementes. Instituto de Biociências, Rio Claro: UNESP, 1992. **Apostila do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, Área de Biologia Vegetal. Departamento de Botânica, 1992.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP. 588 p., 2000.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2. Ed. Visconde do Rio Branco: [s.n], 113p., 2004.

CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. University Printing House, Cambridge. V. 2. p. 82. 552p., 1976.

- COSMO, N.L.; GOGOSZ, A.M.; NOGUEIRA, A.C.; BONA, C.; KUNIYOSHI, Y.S. Morfologia do fruto, da semente e morfo-anatomia da plântula de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 389-397, 2009.
- COSMO, N.L.; NOGUEIRA, A.C.; LIMA, J.G. DE; KUNIYOSHI, Y.S. Morfologia de fruto, semente e plântula de *Sebastiania commersoniana*, Euphorbiaceae. **Floresta**, v. 40, n. 2, p. 419-428, 2010.
- DALY, D. C.; M. C. MARTÍNEZ-HABIBE , A. WEEKS; AND M. M. HARLEY . Burseraceae . Pp. 76 – 104 in **The families and genera of vascular plants** , ed. K. Kubitzki . New York : Springer-Verlag , 2011.
- DALY, D.C. Studies in Neotropical Burseraceae II. Generic limits in Neotropical Protieae and Canarieae. **Brittonia**. 41: 17-27, 1989.
- DALY, D.C. Burseraceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16658>>. Acesso em: 20 Jan. 2015.
- DALY, D.C.; FINE, P. V. A. New amazonian section of *Protium* (Burseraceae) including both edaphic specialist and generalist taxa. Studies in neotropical Burseraceae XVI. **Syst. Bot.**, v. 36, 939-949, 2011.
- DALY, D.C.B. A Taxonomic revision of the genus *Protium* (Burseraceae) in eastern Amazonia and the Guianas. v.1-2. University Microfilms International. **Tese de Doutorado**. New York, Faculty in Biology, 1987.
- DALY, D.C.B. New taxa and combinations in *Protium* Burm. f. studies in neotropical Burseraceae **Brittonia** 44 (3): 280-299, 1992.
- DAVID, R. E CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pi* maritime au moyen du reactif Nadi. Comptes Rendus de L' Académie des Sciences (Paris), série D, 258: 1338-1340, 1964.

- DIAS, G. B.; MALAVASI, M. M.; FERREIRA, R. A.; MALAVASI, U. C. Aspectos morfométricos de frutos e morfológicos de plântulas de *Vitex montevidensis* Cham. **Scientia Agraria Paranaensis** – SAP Mal. Cdo. Rondon, v. 12, n. 2, abr./jun., p.124-130, 2013.
- DUKE, J.A. On Tropical Seedlings. In: **Ann. Missouri Botanical Garden** **56**(2): 125-161, 1969.
- ESAU, K.. Esau's Plant Anatomy meristems, cells and tissues of the plant body: their structure,function, and development. 3rd ed. Copyright., 2006.
- FAHN, A. Structure and function of secretory cell. In : HALLAHAN, D. L.; GRAY, J. C. (Ed.). *Advances in Botanical Research: plant trichomes*. London: Academic, v. 31, p. 37-75, 2000.
- GARWOOD, N.C. Functional morphology of tropical tree seedlings. In: *The ecology of tropical forest tree seedlings*. (M.D. Swaine, Ed.) Paris: UNESCO/The Parthenon Publishing Group, p.59-129, 1996.
- GERLACH, D. **Botanish mikrotechnik**. Stuttgart: Georg. Thieme Verlag. 311p, 1977.
- GURGEL, E.S.C., SANTOS, J.U.M., LUCAS, F.C.A. & BASTOS, M.N. C. Morfologia de plântulas de Leguminosae e o potencial sistemático. **Rodriguésia** 63(1):065-073, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S2175-78602012000100006>
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and pratice**. San Francisco: W. H. Feeman. 408p, 1962.
- JOHANSEN, A. **Plant microtechnique**. New York, Mc Graw-Hill.533p, 1940.
- LAWRENCE, G.H.M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. v.2: 558-560, 1951.
- LEON HERNANDEZ, W. J. Estudio anatómico de la madera e incidencia tecnológicas em 7 especies del género Protium Burm. f (Burseraceae). *Revista Forestal Venezoelana*, Mérida, v. 1, n. 46, p. 73- 82, 2002.

- LIMA, M. P.; PINTO, D. S.; LIMA, T. A. A. C.; RIBEIRO, J. E. L. S.; MARQUES, M. O. M.; FACANAL, R. Óleos essenciais de espécies de *Protium* da reserva Ducke- AM: *P. paniculatum* var. *riedelianum* e *P. aracouchini*. Documentos IAC, v. 77. P. 50, 2005.
- LIMA, T. A. A. C.; ROCHA, K. R. A.; MELO, M. F. F.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; LIMA, M. P. Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*: Uma Contribuição Ao Conhecimento de espécies aromáticas do Bosque da Ciência do Inpa. **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 6-10, 2014.
- MELO, M. F. F.; MACEDO, S. T. e DALY, D. C. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de nove espécies de *Protium* Burm. f. (Burseraceae) da Amazônia central, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 21 (3): 503-520. 2007.
- OLIVEIRA, E.C. Morfologia de Plântulas. Pp. 175-213. In: I.B. Aguiar; F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia. **Sementes Florestais Tropicais**. Brasília, ABRATES, 1993.
- OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical anti-inflammatory effects of the ether extracts from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.
- PAOLI, A.A.S.; BIANCONI, A. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pseudima frutescens* (Aubl.) Radlk. (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v.30, n.2, p.146-155, 2008.
- PONTES, W.J.T.; OLIVEIRA, J.C.G. DE; CÂMARA, C.A.G. DA; LOPES, A.C.H.R.; GONDIM-JÚNIOR, M.G.C.; OLIVEIRA, J.V. DE; BARROS, R.; SCHWARTZ, M.O.E. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). **Acta Amazonica**, 37: 103-110, 2007.
- RABELO, B.V. Macrodiagnóstico do Estado do Amapá: primeira aproximação do ZEE. 3. ed. **Revista. ampl.** Macapá: IEPA. 2008.

- RADFORD, A.E.; DICKINSON, W.C.; MASSEY, J.R. & BELL, C.R. **Vascular Plant Systematics**. New York Harper & Row Publishers, 1974.
- ROOSMALEN, M.G.M. **Fruits of the Guiana Flora**. Utrecht, Institute of Systematic Botany, Utrecht University and Wageningen Agricultural University, 1985.
- ROSSATTO, D. R.; TAKAHASHI, F. S. C.; SILVA, L. DE C. R. AND FRANCO, A. C. Características funcionais de folhas de sol e sombra de espécies arbóreas em uma mata de galeria no Distrito Federal, Brasil. *Acta Bot. Bras.* [online]. vol.24, n.3, pp. 640-647. 2010.
- SEIFFERT, M.; ALVARENGA, A. A.; GUIMARAES, R. M.; CASTRO, E. M.; CARDOSO, M. G.; PAIVA, R.; DOUSSEAU, S.; VIEIRA, C. V. Efeito da secagem e de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Protium widgrenii* Engler. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 35-42, jan./fev., 2006.
- SILVA, A. G.; COSTA, L. G. Germinação, Morfologia de frutos, sementes e plântulas de Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth.). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 1871, 2014.
- SILVA, M.M.F.; BASTOS, M. N. C.; GURGE, E.S.C. Aspectos taxonômicos e morfológicos do processo germinativo e da plântula de *Peltogyne venosa* subsp. *densiflora* (Spruce ex Benth.) M. F. Silva (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 4, n. 3, p. 291- 302, 2009.
- SILVA, W. A. S.; CARIM, M. J. V.; GUIMARAES, J. R. S.; TOSTES, L. C. L. Composição e diversidade florística em um trecho de floresta de terra firme no Sudoeste do Estado do Amapá, Amazônia Oriental, Brasil. **Biota Amazônia**. Macapá, v. 4, n. 3, p. 31-36, 2014.
- SOBRINHO, T.R.G. et al. Classificação climática conforme a metodologia Köppen do município de Laranjal do Jari/Amapá/Brasil. In: **Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. Palmas, Tocantins, 2012.

SPJUT, R.W. A Systematic Treatment of Fruit Types. Memoirs of The New York Botanical Garden. **The New York Botanical Garden 70**: 70-93, 1994.

SVENDSEN, A. B. E VERPOORTE, R. Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1983.

TOSTES, L. C. L.; CARIM, M. J. V.; GONÇALVES, J. F. C.; TORRES, A. M.; GUIMARAES, J. R. S. Padrão de Distribuição Espacial e Estrutura Diamétrica de *Protium* Burm. f. na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru, Sudoeste do Amapá, Amazônia Oriental, Brasil. *no prelo Revista Árvore*.

VIDAL, W.N. & VIDAL, M.R.R. **Botânica - Organografia**. 4ed. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa, 2000.

VOGEL, E.F. **Seedlings of dicotyledons**. 2ed. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, the Netherlands, 1983.

Metcalf CR, Chalk L. Anatomy of the dicotyledons. Oxford: Clarendon, Vol. II. Clarendon press, Oxford. 1950.

Zenid GJ. Comercialização de madeiras no Brasil a importância da correta identificação das espécies. Tecnologias aplicadas ao seto madeireiro III. Jerônimo Monteiro: Suprema. 2008. P. 7397.

## Capítulo II

---

**Efeitos do ambiente lumínico e aspectos nutricionais sobre a morfofisiologia foliar de plantas jovens de *Protium altsonii* Sandwith**

\*Capítulo transformado em artigo de acordo com normas da revista *American Journal of Plant Sciences*

## **Efeitos do ambiente lumínico e aspectos nutricionais sobre a morfofisiologia foliar de plantas jovens de *Protium altsonii* Sandwith**

### **Resumo**

A plasticidade foliar é determinante para a aclimatação de uma espécie a diferentes condições luz e é resultante da capacidade da planta em ajustar sua anatomia e seu aparato fotossintético, de modo que a luz seja utilizada de maneira mais eficiente possível. Neste sentido, este trabalho investigou o efeito da irradiância no crescimento, acúmulo de biomassa, bem como as respostas e estratégias da planta quanto à captação e utilização da energia luminosa de plantas jovens de *P. altsonii* sob diferentes condições de irradiância. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímico Vegetal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia em regime de casa de vegetação e com duração de 61 dias. Após período de adaptação, 27 plantas foram selecionadas e divididas em três tratamentos de irradiância: pleno sol, intermediário e sombra. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo três tratamentos (T1: sombreado com 10-15  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; T2: intermediário com  $\sim 1000$   $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e T3: pleno sol com  $\sim 2000$   $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) com 9 repetições cada. Para o crescimento em altura e diâmetro do coleto, os maiores valores foram observados nas plantas submetidas a um nível intermediário de irradiância e os menores valores nas plantas submetidas à baixa irradiância. Para o crescimento em altura e diâmetro do coleto, os maiores valores foram observados nas plantas submetidas ao nível intermediário de irradiância e os menores valores nas plantas submetidas à baixa irradiância. Os teores foliares de nitrogênio variaram de 14,5 a 15,9  $\text{g kg}^{-1}$  entre os tratamentos, com os maiores valores observados nas plantas de sombra, comparado com os demais tratamentos. Quanto às variáveis de fluorescência da clorofila *a* verificou-se que as plantas quando submetidas a maior irradiância elas exibiram diminuição da eficiência no uso da energia, no tratamento intermediário e pleno sol, como indicativo de fotoinibição crônica. Contudo, com a emissão de novas folhas adaptadas ao novo ambiente de irradiância, e após a expansão das folhas, o que ocorreu dois meses depois do início do experimento, as plantas exibiram recuperação da sua eficiência fotoquímica. Portanto, neste estudo verificou-se que plantas jovens de *P. altsonii* são capazes de se ajustarem morfofisiologicamente em relação à disponibilidade de luz, o que resulta na sua aclimatação a altas e baixas intensidades luminosas.

**Palavras-chave:** Breu branco; Fluorescência da clorofila *a*; Área foliar específica; Massa seca; Teor de N foliar.

## 1. Introdução

As florestas tropicais apresentam grande heterogeneidade em termos de disponibilidade de luz, tanto espacial (*e.g.* Dossel; sub-dossel; sub-bosque e presença de clareiras) quanto temporalmente (*e.g.* períodos sazonais). Além disso, atividades antrópicas (*e.g.* corte seletivo; desflorestamento causado por atividades agropecuárias) e / ou eventos naturais podem promover mudanças frequentes e significativas em ambientes florestais equilibrados (Souza et al., 2009; Rossatto et al., 2010). Assim, o estabelecimento de uma espécie e / ou a sua continuidade no sistema são resultantes de sua capacidade de efetivar adaptações morfofuncionais e metabólicas às novas condições ambientais (Gonçalves et al., 2007; Capuzzo et al., 2012).

A disponibilidade de irradiância é fator determinante para o fluxo de energia em sistemas biológicos, e em grande parte, fundamental para a regulação dos processos fisiológicos e das mudanças morfológicas das plantas. Com isso, as respostas e estratégias utilizadas pelas espécies quanto à captação e o uso da irradiância disponível, assim como os ajustes morfológicos e metabólicos em ambientes que sofreram modificações são necessários para a sua sobrevivência, crescimento e adaptação em diferentes ambientes lumínicos, bem como decisivos para o sucesso ou fracasso do estabelecimento das plantas aos ambientes alterados (Gymah e Nakao, 2007; Lima et al., 2008).

Dentre os ajustes que a planta exhibe sob diferentes condições de luz destacam-se os ajustes morfológicos (*e.g.* área foliar específica; anatomia foliar) e os ajustes fisiológicos relacionados à capacidade de absorção e dissipação eficiente da energia bem como sua utilização nos processos fotossintéticos (Gonçalves et al., 2007; Souza et al., 2009; Rossatto et al., 2010).

A estrutura foliar pode ser fortemente influenciado pela intensidade de irradiância e aspectos nutricionais durante o período de crescimento e desenvolvimento e expansão foliar. A capacidade de alteração da estrutura foliar em resposta a diferentes níveis de luz é um atributo comum das espécies que apresentam amplo potencial de aclimação aos diferentes ambientes de luz (Atroch et al., 2001). Nesse sentido, a plasticidade foliar da planta ao ambiente de luz depende também da capacidade da espécie em ajustar seu aparato fotossintético, de modo que a luminosidade disponível seja utilizada de maneira mais eficiente possível, perpassando pela capacidade de aumentar a absorção da irradiância em ambientes de baixa luminosidade bem como pela capacidade de utilização e dissipação eficiente do excesso

de irradiância em ambientes de pleno sol. As respostas dessas adaptações serão refletidas no crescimento e acúmulo de biomassa pela planta (Fernandes et al., 2014).

A fotossíntese é um processo vital para o crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais durante seu ciclo de vida. Por sua vez, o processo fotossintético pode sofrer alterações decorrentes das alterações dos fatores externos como luz, CO<sub>2</sub>, água, nutrientes, temperatura e poluentes, e internos como condutância estomática, concentração de fotoassimilados, concentração de nutrientes nas folhas e concentrações de pigmentos cloroplastídicos (Kull, 2001; Cao et al., 2007). Estresses ambientais como aqueles causados pela abertura repentina de uma clareira, decorrente do corte seletivo ou da queda natural de árvores em uma floresta primária, promovem a exposição de espécies que ocupam os estratos inferiores da floresta a uma alta irradiância o que pode levar à rápida oxidação dos pigmentos cloroplastídicos e ao aumento da temperatura da folha, e promover a fotoinibição crônica da fotossíntese que podem até levar a planta não tolerante à morte. Por outro lado, algumas espécies podem desenvolver mecanismos de tolerância a essa mudança repentina de luminosidade e responderem de forma positiva por meio de modificações moleculares, estruturais, fisiológicas e anatômicas que possam garantir sua sobrevivência e seu estabelecimento no sistema (Morais et al., 2004). Dessa forma, o conhecimento das respostas das espécies florestais quanto ao estresse ambiental pode ser de fundamental importância para a compreensão da distribuição local das espécies, bem como auxiliando na melhor forma de exploração sustentável, na escolha de sistemas de plantios adequados e na implementação de programas de conservação e manejo de diversas espécies de interesse econômico e ecológico (Morais et al., 2004).

Dentre as espécies florestais com grande potencial para ser usada em plantios destacam-se as espécies do gênero *Protium* (Burseraceae) com representantes de importância econômica no estado do Amapá, entre as quais se verifica *P. altsonii* Sandwith denominada de “breu branco”, cuja resina é usada na indústria de perfumaria nacional (Tostes et al., prelo). *Protium* sp trata-se de um gênero de grande interesse ecológico e econômico, cujas espécies podem ser utilizadas em projetos de recuperação e restauração de áreas alteradas e em plantios florestais com fins econômicos (Costa, 2006; Ferreira et al., 2010). Por outro lado, as pesquisas com espécies deste gênero ainda são poucas e restringem-se a descrição de seus compostos químicos (Otuki et al., 2004; Rudiger et al., 2007), bastante utilizados pela indústria de cosméticos. Além disso, estudos relacionados à ecofisiologia das espécies de *Protium* ainda são poucos e as informações muito pulverizadas (Marenco et al., 2007; Santos et al., 2012) o que dificulta sua conservação bem como a exploração sustentável destas espécies.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da irradiância sobre as respostas e estratégias da planta quanto à captação e utilização da energia luminosa, bem como sobre o crescimento e acúmulo de biomassa de plantas jovens de *P. altsonii* sob diferentes condições de irradiância. As informações obtidas nesse estudo podem ser úteis para consolidar o conhecimento das respostas das espécies florestais quanto ao estresse ambiental podendo ser de fundamental importância para a compreensão da distribuição local das espécies, bem como auxiliando na melhor forma de exploração sustentável, na escolha de sistemas de plantios adequados e na implementação de programas de conservação e manejo de diversas espécies de interesse econômico e ecológico.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Áreas de estudo, montagem e condução do experimento**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímico vegetal (LFBV), localizada no Campus III (V-8) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA), em regime de casa de vegetação.

Plantas jovens de *P. altsonii* com dois anos e seis meses de idade, coletadas da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru- RDS, no município de Laranjal do Jari-Amapá, provenientes de 50 matrizes foram transportadas para Manaus e utilizadas neste estudo. Estas foram transferidas para sacos plásticos de 5L e submetidas a seis meses de adaptação sob baixa irradiância (10 a 15  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Após período de adaptação 27 plantas saudáveis foram selecionadas quanto à altura e número de folhas (12 folíolos) e, separadas para comporem os três tratamentos de diferentes ambientes de luz: Pleno sol (cerca de 2000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); intermediário (50%; cerca de 1000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e sombreado (10 a 15  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), valores coletados entre 11:00 e 13:00 h durante o período do experimento.

### **2.2 Análise de crescimento e ganho de biomassa**

A determinação da altura e do diâmetro do coleto das plantas foi realizada no início e no fim do experimento de 61 dias. A altura das plantas foi medida com auxílio de régua milimetrada, o diâmetro do caule à altura do coleto foi medido utilizando paquímetro digital (marca Mitutoyo – modelo CD-8” CX-B). As taxas de crescimento absoluto (TCA) em altura e diâmetro foram calculadas conforme metodologia descrita por [Bugbee \(1996\)](#) e [Davanso et al. \(2002\)](#).

O cálculo da área foliar específica (AFE) foi realizado a partir de cinco discos foliares de área conhecida ( $0,283 \text{ cm}^2$ ), retirados de cada folha, acondicionados em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa a  $65^\circ\text{C}$  durante o período de 72 horas, até atingir massa constante. A AFE foi determinada a partir da razão da área foliar ( $\text{cm}^2$ ) pela massa foliar seca (g) (Evans e Poorter, 2001).

Ao final do experimento, as plantas foram seccionadas em folhas, caule e raiz, e acondicionadas em sacos de papel para secagem em estufa a  $65^\circ\text{C}$  até a obtenção de massa constante. A partir do material seco, foram obtidas: massa seca foliar (MSF), massa seca caulinar (MSC), massa seca de raízes (MSR) e massa seca total (MST) bem como as respectivas taxas de crescimento (TC) em massa seca para cada compartimento da planta.

### **2.3 Determinação dos teores de macro e micronutrientes foliares**

No laboratório de solos da Embrapa/ Amazônia Ocidental foi quantificado os teores de macro e micronutrientes foliares, coletadas folhas maduras e completamente expandidas, que foram secas em estufa a  $65^\circ\text{C}$  até a obtenção de massa constante. Os teores de nitrogênio foram determinados a partir de amostras contendo 0,1g de matéria seca. Estas amostras secas foram submetidas à pré-digestão, durante uma noite, seguida pela digestão com duplo ácido ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$ ), utilizando-se como catalisadores o sulfato de lítio e o selênio, a uma temperatura gradativa de até  $350^\circ\text{C}$  (Miyazawa et al., 1999). Por último, o nitrogênio total foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl, a partir de uma alíquota de 25 ml do extrato puro.

Os teores de fósforo foram determinados a partir de amostras contendo 0,5 g de matéria seca submetidas à digestão nitro-perclórica, com temperatura ajustada de 50 em  $50^\circ\text{C}$  até  $210^\circ\text{C}$ , em intervalos de 30 minutos. Posteriormente, os teores de fósforo foram determinados por espectrofotometria do visível a  $\lambda = 725 \text{ nm}$  (Vitti e Ferreira, 1997). A partir do mesmo extrato nitro-perclórico foram retiradas alíquotas e os teores dos demais nutrientes (Ca, Mg, K, Fe, Zn e Mn) foram determinados por espectrometria de absorção atômica (Perkin Elmer, 1100B).

### **2.4 Teores de pigmentos cloroplastídicos**

A determinação dos pigmentos cloroplastídicos foi realizada no fim do experimento em folhas maduras e completamente expandida. As folhas foram coletadas no terço médio das plantas e conduzidas ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA), onde foram

determinados os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides (Lichtenthaler e Wellburn 1983).

Para a determinação dos teores de pigmentos cloroplastídicos foram retiradas amostras de 0,1 g de material vegetal fresco e macerados com 10 mL de acetona (100% v/v) mais 10 mL de uma solução de acetona (80% v/v) contendo MgCO<sub>3</sub> (0,5% p/v). Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo nº 2. O extrato filtrado foi usado para determinar a absorvância nos comprimentos  $\lambda=663, 645$  e 480 nm, com auxílio do espectrofotômetro UV-visível, a fim de obter as concentrações de clorofila *a* (chl *a*), clorofila *b* (chl *b*) e carotenóides (*cx+c*), respectivamente. Para o cálculo das concentrações dos pigmentos cloroplastídicos na base da área ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) foram utilizadas as equações descritas por Hendry e Price (1993).

## 2.5 Fluorescência da clorofila *a* e teste JIP

*Fluorescência da clorofila a*: Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram obtidos por meio de um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hansatech Instruments, Norfolk, UK) entre os horários de 6:00 e 8:00 da manhã. As folhas foram aclimatadas ao escuro durante período de 30 minutos e em seguida foram submetidas a um pulso de luz saturante de alta intensidade ( $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e comprimento de onda de 650 nm por 1 segundo (Gonçalves e Santos Junior, 2005). As análises foram realizadas em duas folhas por planta, com leituras em intervalos de 61 dias de tratamento. As respostas relacionadas aos transientes da fluorescência da clorofila *a* foram obtidas a partir de software específico (Handy PEA software - 1,30), de acordo com equações do teste JIP (Strasse et al., 1995). A indução da curva da fluorescência, a partir de  $F_0$  até  $F_M$  é denominada “Transiente de fluorescência” (FT), fluorescência direta ou imediata (Strasse et al., 2004; Strasser et al., 2010). Plotadas em escala algorítmicas, a FT exibe comportamento polifásico. Os diferentes passos deste transiente polifásico são rotulados: O (20–50  $\mu\text{s}$ ), J (2 ms), I (30 ms) e P (pico). Este último indica a alta intensidade da fluorescência ( $F_M$ ). A partir da curva JIP foram calculados os parâmetros:  $F_V/F_M$ ,  $PI_{\text{ABS}}$  e  $PI_{\text{total}}$ .

O teste JIP representa a tradução dos dados originais gravados dos parâmetros biofísicos que quantificam as etapas do fluxo de energia. Os parâmetros referentes ao tempo zero são: (i) os fluxos específicos expressos por centro de reação (ABS/RC; TR<sub>O</sub>/RC; DI<sub>O</sub>/RC; ET<sub>O</sub>/RC; RE<sub>O</sub>/RC); (ii) os fluxos fenomenológicos expressos por seção transversal (ABS/CS; TR<sub>O</sub>/CS; DI<sub>O</sub>/CS; ET<sub>O</sub>/CS; RE/CS) foram derivados da teoria do fluxo de energia de biomembranas no qual ABS se refere à absorção de fótons pelas moléculas de clorofila do complexo antena,

TR<sub>O</sub> se refere à energia absorvida que é capturada pelos centros de reação do PS II (P<sub>680</sub>), DI<sub>O</sub> se refere à energia dissipada na forma de calor e fluorescência e ET<sub>O</sub> se refere à parte da energia capturada pelo centro de reação do PS II que é convertida em energia red-ox e direcionada para a cadeia transportadora de elétrons através da Q<sub>A</sub> e Q<sub>B</sub>. Parte de ABS é aprisionada pelos centros de reação do PS II (TR) para ser convertida em energia redox a partir da redução do aceptor primário de elétrons Q<sub>A</sub> a Q<sub>A</sub><sup>-</sup> que é então reoxidada à Q<sub>A</sub> e a energia utilizada para redução da cadeia de transporte de elétrons após a Q<sub>A</sub><sup>-</sup> (ET) e dos aceptores finais de elétrons do PS I (RE); e (iii) Eficiência quântica máxima de-excitação não fotoquímica [ $\phi_{D_0}$  (DI<sub>O</sub>/ABS) = 1- $\phi_{P_0}$  = (F<sub>50 $\mu$ s} /F<sub>M</sub>)]; Eficiência quântica máxima do PS II [ $\phi_{P_0}$  (TR<sub>O</sub>/ABS) = [F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> = 1-(F<sub>50 $\mu$ s} /F<sub>M</sub>)]; Probabilidade da energia de excitação capturada pelo centro de reação (RC) do PS II mover um elétron após a Q<sub>A</sub><sup>-</sup> [ $\Psi_0$  (ET<sub>O</sub>/TR<sub>O</sub>) = 1-V<sub>j</sub>]; Probabilidade de um fóton absorvido mover um elétron após a Q<sub>A</sub><sup>-</sup> [ $\phi_{E_0}$  (ET<sub>O</sub>/ABS) = [1-(F<sub>50 $\mu$ s} /F<sub>M</sub>)] (1-V<sub>j</sub>)]; Probabilidade de um elétron do processo de transferência inter- sistemas reduzir os aceptores finais do PSI [ $\delta_{R_0}$  (RE<sub>O</sub>/ET<sub>O</sub>) = (1-V<sub>i</sub>) (1-V<sub>j</sub>)]; Rendimento quântico para redução dos aceptores finais de elétrons do PSI { $\phi_{R_0}$  (RE<sub>O</sub>/ABS) = [(1-(F<sub>o</sub>/F<sub>M</sub>)] (1-V<sub>i</sub>)}</sub></sub></sub>

O índice de desempenho (PI<sub>ABS</sub>) está relacionado com um conjunto de parâmetros de fluorescência da clorofila *a* que fornecem informações quantitativas sobre o estado das plantas e suas respectivas vitalidades derivadas dos princípios das reações Red-Ox conforme descrita pelas equações de Nernst, a saber: PI<sub>ABS</sub> = (RC/ABS)[ $\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})$ ][ $\Psi_0/(1 - \Psi_0)$ ]. (Srivastava et al., 1999).

O índice de desempenho total (PI<sub>tot</sub>) está relacionado com a conservação do fóton absorvido pelo PSII para o fluxo de redução (RE) dos aceptores de elétrons finais do PSI. Esse índice foi calculado a partir da fórmula: PI<sub>tot</sub> = ( $\gamma_0/(1 - \gamma_0)$ ) [ $\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})$ ][ $\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})$ ] [ $\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0})$ ] (ver detalhes em Strasser et al. 2010).

## 2.6 Anatomia foliar

No final do experimento foram coletadas amostras de folhas maduras e completamente expandidas, adaptadas às novas condições de luminosidade, para as análises das modificações anatômicas promovidas pelos diferentes tratamentos de irradiância, com sete repetições para os três tratamentos. Para a realização das medidas dos tecidos foliares e para a quantificação da densidade estomática foram realizados três cortes no terço mediano (cortes transversais e paradérmicos). Todos os cortes foram à mão livre, clarificados em solução de hipoclorito de

sódio durante, aproximadamente, de 1 min, em seguida, lavados em água destilada, e montados em glicerina.

O estudo da espessura dos tecidos foliares, bem como a quantificação de estômatos, foi feita a partir do programa ANATI QUANTI 2.0/ UFV. As lâminas foram observadas com o auxílio do microscópio óptico e a partir de uma câmera acoplada ao microscópio as imagens foram salvas para posterior contagem. A espessura dos tecidos foliares foi mensurada em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) e a quantificação dos estômatos foi calculada pela razão de estômatos/ $\text{mm}^2$ .

## **2.7 Desenho experimental e análises estatísticas**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos e com nove repetições. Os tratamentos foram: Pleno sol (cerca de  $2000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); intermediário (50%; cerca de  $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e sombreado ( $10$  a  $15 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (valores coletados entre 11:00 e 13:00 h).

Para os dois locais e duas idades foliares, os dados foram submetidos ao delineamento experimental utilizando o inteiramente casualizado (DIC), obedecendo ao experimento fatorial  $2 \times 2$ . Os dados coletados foram submetidos aos testes Lilliefors e Levene para verificação do atendimento às premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Em seguida, foram aplicadas análises de variância (ANOVA) e, quando os resultados se mostraram significativos, as médias foram separadas pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram processadas a partir do programa Statistica versão 7.0 ([StatSoft Inc., 2004](#)).

## **3. Resultados**

### **3.1 Área foliar específica e ganho de biomassa**

A maior área foliar específica foi observada nas plantas submetidas à sombra, exibindo valores cerca de 20% maiores que os demais tratamentos ([Tabela 1](#)). Para o crescimento em altura e diâmetro do coleto, os maiores valores foram observados nas plantas submetidas a um nível intermediário de irradiância e os menores valores nas plantas submetidas à baixa irradiância ([Tabela 1](#)).

**Tabela 1.** Área foliar específica (AFE), taxas de crescimento em altura (TC-a), diâmetro do coleto (TC-d), massa seca foliar (TCMSF), massa seca caulinar (TCMSC), massa seca radicular (TCMSR) e total (TCMST) de plantas jovens de *Protium altsonii* submetidas a três níveis de irradiância.

	Pleno sol	Intermediário (50%)	Sombra
AFE (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	210±21 B	213±26 B	255±25 A
TC-a (cm mês <sup>-1</sup> )	1,30±1,23 A	2,18±1,40 A	-0,22±0,82 B
TC-d (mm mês <sup>-1</sup> )	0,16±0,29 AB	0,44±0,41 A	0,04±0,18 B
TCMSF (g mês <sup>-1</sup> )	0,26±0,16 B	0,81±0,41 A	0,15±0,31 B
TCMSC (g mês <sup>-1</sup> )	0,21±0,22 A	0,41±0,62 A	0,00±0,23 A
TCMSR (g mês <sup>-1</sup> )	0,10±0,15 AB	0,43±0,53 A	-0,01±0,24 B
TCMST (g mês <sup>-1</sup> )	0,57±0,26 B	1,64±1,37 A	0,14±0,76 B

Média ± Desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha, para ambientes de irradiância, não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ; Teste Duncan).

Quanto às taxas de crescimento em massa seca, observou-se que as plantas submetidas à irradiância intermediária exibiram valores de taxa de crescimento em massa seca foliar (TCMSF) cerca de três a cinco vezes maiores que as plantas submetidas a pleno sol e a sombra, respectivamente (Tabela 1). A semelhança dos valores de TCMSF, os valores de taxa de crescimento em massa seca radicular (TCMSR) foram maiores nas plantas sob o nível intermediário de irradiância e os menores valores nas plantas na sombra. As taxas de crescimento em massa seca total (TCMST) variaram de 0,14 a 1,64 g mês<sup>-1</sup>, no qual os valores das plantas sob luminosidade intermediária exibiram valores cerca de três e 12 vezes maiores que as plantas a pleno sol e sob sombra, respectivamente (Tabela 1).

### 3.2 Teores foliares de nutrientes

Os teores foliares de Nitrogênio (N) variaram de 14,5 a 15,9 g kg<sup>-1</sup> entre os tratamentos com os maiores valores observados nas plantas de sombra, comparado com os demais tratamentos (Tabela 2). Para magnésio (Mg), os teores nas plantas de sombra foram 20% maiores que nas plantas de sol. Quanto aos micronutrientes, os teores foliares de boro (B) nas plantas de sol foram maiores que as plantas submetidas ao tratamento intermediário (T2). Para os demais micronutrientes, como cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), os maiores valores foram encontrados nas plantas de sombra quando comparadas com os demais tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Teores foliares de macro e micronutrientes de plantas jovens de *Protium altsonii* submetidas a três níveis de irradiância.

	Pleno sol	Intermediário (50%)	Sombra
<b>N (g kg<sup>-1</sup>)</b>	14,9±0,7 <b>B</b>	14,5±0,7 <b>B</b>	15,9±0,8 <b>A</b>
<b>P (g kg<sup>-1</sup>)</b>	0,83±0,09 <b>A</b>	0,84±0,07 <b>A</b>	0,79±0,05 <b>A</b>
<b>K (g kg<sup>-1</sup>)</b>	7,1±0,6 <b>A</b>	7,7±1,3 <b>A</b>	8,1±0,4 <b>A</b>
<b>Ca (g kg<sup>-1</sup>)</b>	4,4±0,7 <b>A</b>	4,6±0,8 <b>A</b>	5,1±0,4 <b>A</b>
<b>Mg (g kg<sup>-1</sup>)</b>	0,66±0,05 <b>B</b>	0,69±0,09 <b>AB</b>	0,79±0,14 <b>A</b>
<b>S (g kg<sup>-1</sup>)</b>	0,85±0,21 <b>B</b>	1,15±0,90 <b>B</b>	1,43±0,88 <b>A</b>
<b>B (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	29,7±7,8 <b>A</b>	22,3±3,9 <b>B</b>	25,8±3,2 <b>AB</b>
<b>Cu (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	4,79±0,66 <b>B</b>	5,26±0,97 <b>B</b>	6,75±0,86 <b>A</b>
<b>Fe (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	351±98 <b>B</b>	266±98 <b>B</b>	481±111 <b>A</b>
<b>Mn (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	298±80 <b>B</b>	287±55 <b>B</b>	434±36 <b>A</b>
<b>Zn (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	16,3±4,0 <b>B</b>	17,2±5,5 <b>B</b>	23,4±3,6 <b>A</b>

Média ± Desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha, para ambientes de irradiância, não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ; Teste Duncan).

### 3.3 Teores de pigmentos cloroplastídicos

Para a razão Chl *a* / Chl *b* verificou-se menor valor para as plantas no ambiente de sombra, comparado com os demais ambientes (Tabela 3). Já para a razão Chl<sub>Tot</sub>/C<sub>x+c</sub>, o menor valor foi observado para as plantas submetidas a pleno sol, sendo este 29% menor que as plantas da sombra (Tabela 3).

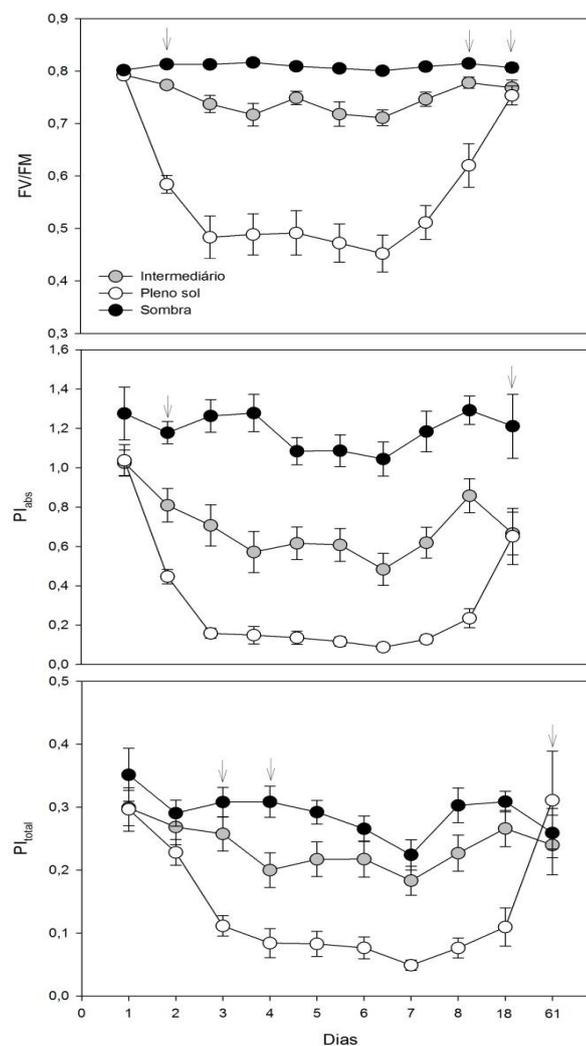
**Tabela 3.** Teores de pigmentos cloroplastídicos de plantas jovens de *Protium altsonii* submetidas a três níveis de irradiância. Clorofila *a* (Chl *a*), Clorofila *b* (Chl *b*), Clorofila total (Chl<sub>Tot</sub>), carotenóides (C<sub>x+c</sub>) e razões Clorofila *a* / Clorofila *b* (Chl *a* / Chl *b*) e Clorofila total / Carotenóides (Chl<sub>Tot</sub>/C<sub>x+c</sub>)

	Pleno sol	Intermediário (50%)	Sombra
<b>Chl <i>a</i> (μmol m<sup>-2</sup>)</b>	571±41 <b>A</b>	527±203 <b>A</b>	602±212 <b>A</b>
<b>Chl <i>b</i> (μmol m<sup>-2</sup>)</b>	196±22 <b>A</b>	188±72 <b>A</b>	249±74 <b>A</b>
<b>Chl<sub>Tot</sub> (μmol m<sup>-2</sup>)</b>	767±61 <b>A</b>	716±274 <b>A</b>	850±285 <b>A</b>
<b>C<sub>x+c</sub> (μmol m<sup>-2</sup>)</b>	283±41 <b>A</b>	235±65 <b>A</b>	231±30 <b>A</b>
<b>Razão Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i></b>	2,85±0,18 <b>A</b>	2,79±0,13 <b>A</b>	2,38±0,21 <b>B</b>
<b>Razão Chl<sub>Tot</sub> / C<sub>x+c</sub></b>	2,57±0,85 <b>B</b>	2,98±0,38 <b>AB</b>	3,62±0,92 <b>A</b>

Média ± Desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha, para ambientes de irradiância, não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ; Teste Duncan).

### 3.4 Fluorescência da Clorofila *a*

O comportamento do aparato fotoquímico de plantas jovens de *P. altsonii* submetidas a três níveis de irradiância ao ser analisado verificou-se que a maior eficiência no uso da irradiância foi observada nas plantas de sombra (Figura 1; Tabela 3). Quando as plantas foram submetidas a maior irradiância elas exibiram diminuição da eficiência no uso da energia, como pode ser observado nos tratamentos intermediário e a pleno sol (Figura 1). As plantas submetidas a pleno sol exibiram os menores valores, atingindo valores de rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_M$ ), do índice de desempenho na base ABS ( $PI_{ABS}$ ) e Índice de desempenho total ( $PI_{TOT}$ ) mais baixos por volta do terceiro e quarto dia. Contudo, com a emissão de novas folhas adaptadas ao novo ambiente irradiância, e após estarem maduras, o que ocorreu dois meses depois do início do experimento, as plantas submetidas a pleno sol exibiram recuperação da sua eficiência fotoquímica (Figura 1).



**Figura 1.** Comportamento do aparato fotoquímico de plantas jovens de *Protium altsonii* submetidas a três níveis de irradiância. Rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_V/F_M$ ); Índice de desempenho na base ABS ( $PI_{ABS}$ ); Índice de desempenho total ( $PI_{total}$ ). As setas indicam diferenças entre os tratamentos. Média±Desvio Padrão.

Quanto aos valores de  $F_V/F_M$  observou-se que as plantas submetidas à irradiância intermediária e a pleno sol exibiram redução de 9 e 38% após quatro dias de experimento. Esse mesmo comportamento foi observado para as variáveis  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOT}$ , no qual a redução após quatro dias de experimento foi de 86 e 73% nas plantas a pleno sol e de 45 e 33% nas plantas sob irradiância intermediária, respectivamente (Tabela 3). Contudo, aos 61 dias de experimento as plantas destes tratamentos exibiram recuperação da eficiência no uso da irradiância (Tabela 3). Os maiores valores referentes à efetividade do processo de transferência de elétrons na redução dos aceptores finais do PSI ( $Y_{ro}$ ) foram observados para as plantas a pleno sol, em especial nos dia 4 e 61; ao passo que as plantas de sombra exibiram os menores valores de I-Pphase, também nos dias 4 e 61 (Tabela 3).

**Tabela 4.** Variáveis do teste JIP referentes à análise do comportamento do aparato fotoquímico de plantas jovens de *Protium altsonii* submetidas a três níveis de irradiância. Rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_V/F_M$ ); Banda K ( $K_{band}$ ); Fase I-P ( $IP_{phase}$ ); Efetividade do processo de transferência de elétrons na redução dos aceptores finais do PSI ( $Y_{ro}$ ); Indica; Índice de desempenho na base ABS ( $PI_{ABS}$ ); Índice de desempenho total ( $PI_{total}$ ).

Tratamentos	Dia	Fv/Fm	I-Pphase	Yro	Kband	PI <sub>ABS</sub>	PI <sub>total</sub>
Pleno sol	1	0,79±0,02 aA	0,10±0,02 aA	0,27±0,05 aB	0,59±0,06 aA	1,04±0,24 aA	0,30±0,10 aA
	4	0,49±0,10 cB	0,13±0,02 aA	0,57±0,10 aA	0,50±0,08 aA	0,15±0,12 cB	0,08±0,06 cB
	61	0,75±0,02 bA	0,13±0,02 aA	0,47±0,06 aA	0,59±0,06 aA	0,65±0,28 bA	0,31±0,14 aA
Intermediário	1	0,79±0,01 aA	0,11±0,02 aA	0,29±0,07 aB	0,55±0,04 aB	1,03±0,19 aA	0,30±0,08 aA
	4	0,72±0,06 bB	0,11±0,02 aA	0,39±0,10 bA	0,54±0,04 aB	0,57±0,28 bB	0,20±0,07 bB
	61	0,76±0,02 bA	0,11±0,01 bA	0,36±0,06 bAB	0,61±0,06 aA	0,66±0,21 bB	0,24±0,07 aAB
Sombra	1	0,80±0,01 aA	0,11±0,02 aA	0,27±0,03 aA	0,54±0,05 aA	1,28±0,40 aA	0,35±0,13 aA
	4	0,82±0,01 aA	0,09±0,01 bB	0,24±0,01 cB	0,51±0,03 aA	1,28±0,25 aA	0,31±0,07 aA
	61	0,81±0,01 aA	0,08±0,01 cB	0,21±0,03 cB	0,54±0,06 aA	1,22±0,32 aA	0,26±0,08 aA

Média ± desvio padrão (n = 9). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não representam diferenças significativas entre os tratamentos e letras maiúsculas iguais na mesma coluna não representam diferenças significativas entre os dias.

### 3.5 Anatomia quantitativa foliar

Os valores de espessura do mesófilo, parênquima paliçádico e parênquima lacunoso variaram de 83 a 115, 28 a 36 e 34 a 56  $\mu$  entre as plantas nos três ambientes de luz, respectivamente, sendo os maiores valores observados nas plantas de sol e os menores nas plantas de sombra (Tabela 5). Quanto à espessura da epiderme superior, o maior valor foi observado nas plantas de sol comparado com os demais tratamentos.

Para a densidade estomática verificou-se que as plantas de sombra exibiram valores cerca de 18 e 15% menor que as plantas submetidas à irradiância intermediária e a pleno sol (Tabela 5). Quanto ao comprimento e largura das células guardas e comprimento do poro estomático, os maiores valores foram encontrados nas folhas de sombra, ao passo que nas folhas de sol foram observados os maiores valores de largura do poro estomático (Tabela 5).

**Tabela 5.** Variáveis anatômicas de folhas de plantas jovens de *Protium altsonii* submetidas a três níveis de irradiância. Espessura do mesófilo (EM); espessura do parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL), espessura da epiderme superior (EES) e inferior (EEI), Densidade estomática; comprimento (CCG) e largura (LCG) da célula guarda; comprimento (CPE) e largura (LPE) do poro estomático.

	Pleno sol	Intermediário (50%)	Sombra
EM ( $\mu$ )	115 $\pm$ 8 A	98 $\pm$ 4 B	83 $\pm$ 5 C
EPP ( $\mu$ )	36 $\pm$ 4 A	32 $\pm$ 2 B	28 $\pm$ 1 C
EPL ( $\mu$ )	56 $\pm$ 4 A	44 $\pm$ 2 B	34 $\pm$ 4 C
EES ( $\mu$ )	11,8 $\pm$ 0,9 A	10,6 $\pm$ 0,5 B	10,4 $\pm$ 0,4 B
EEI ( $\mu$ )	10,8 $\pm$ 0,7 A	10,5 $\pm$ 0,5 A	10,3 $\pm$ 0,4 A
Dens.Estom. (n <sup>o</sup> mm <sup>-2</sup> )	148 $\pm$ 3 A	144 $\pm$ 3 A	122 $\pm$ 1 B
CCG ( $\mu$ )	24,1 $\pm$ 1,9 B	23,6 $\pm$ 1,1 B	27,2 $\pm$ 0,6 A
LCG ( $\mu$ )	5,8 $\pm$ 0,8 B	7,4 $\pm$ 0,3 A	7,8 $\pm$ 0,2 A
CPE ( $\mu$ )	13,6 $\pm$ 0,5 B	13,5 $\pm$ 0,4 B	14,6 $\pm$ 0,3 A
LPE ( $\mu$ )	7,5 $\pm$ 0,5 A	5,6 $\pm$ 0,8 C	6,5 $\pm$ 0,4 B

Média  $\pm$  Desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha, para ambientes de irradiância, não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ; Teste Duncan).

## 4. Discussão

Em plantas de *P. altsonii* os maiores valores de TCMST foram encontrados na irradiância intermediária, estes resultados sugerem que a espécie, na fase juvenil, requer ambientes de moderada luminosidade, evitando extremos de alta e baixa irradiância. Na literatura tem sido descrito que as características como massa seca, área foliar e espessura são consideradas as

principais indicadoras de taxa de crescimento dos vegetais e os ajustes dessas características podem ser consideradas estratégias desenvolvidas para maximizar a eficiência do uso dos diferentes recursos pelas plantas como, por exemplo, luz e nutrientes (Poorter et al., 2012). A quantidade de massa seca é bastante variável entre espécies e sob diferentes irradiâncias, e, na avaliação da qualidade de mudas, é um dos parâmetros que define a capacidade de sobrevivência após o plantio. A massa seca total da muda é fortemente influenciada pela capacidade fotossintética e pela quantidade de nutrientes minerais absorvidos (Farias et al., 2013; Lopes et al., 2013). As diferenças fisiológicas encontradas entre folhas de sol e sombra também são atribuídas parcialmente a diferenças na estrutura foliar (Poorter et al., 2012), sendo a área foliar específica um parâmetro diretamente relacionado à área disponível para captura de luz por unidade de fotoassimilados investidos na folha. A área foliar específica é uma variável altamente plástica e dependente das condições ambientais, principalmente a luz (Dahlgren et al., 2006). Os menores valores dessa variável são encontrados geralmente em condições de alta luminosidade (Markesteyn et al., 2007; Sarijeva et al., 2007; Hodnett et al., 2012), como observado nas plantas de *P. altsonii* submetidas a pleno sol. Os maiores valores de AFE encontrados nas plantas sob sombra neste estudo, sugerem menor investimento na lignificação de tecidos como epiderme e cutícula, acarretando em menor espessura foliar, aspecto também verificado em *A. legalis* crescendo em dois ambientes de luz (Pereira et al., 2009). Além disso, a maior AFE nas plantas sob sombra é uma estratégia da planta no qual ela investe mais em área em detrimento da espessura com o objetivo de ampliar sua área de captação de energia luminosa para o melhor aproveitamento nos processos fotossintéticos (Dahlgren et al., 2006).

Quanto ao crescimento e ao acúmulo de biomassa, as plantas de *P. altsonii* também exibiram melhor desempenho sob irradiância intermediária, sugerindo que tanto o ambiente com baixa irradiância quanto o ambiente a pleno sol afetam o crescimento e o desenvolvimento da espécie durante a fase juvenil. Sob condição de baixa irradiância, as plantas podem ter exibido menores taxas de crescimento devido à baixa quantidade de energia luminosa necessária para o processo fotossintético (Dahlgren et al., 2006). Por outro lado, o excesso de energia no ambiente a pleno sol pode ter promovido inibição do processo fotossintético, acarretando em menor acúmulo de biomassa. Algumas espécies arbóreas secundárias ou climax de florestas tropicais apresentam plasticidade fisiológica sob altas ou baixas irradiâncias, porém, sobretudo, quando expostas à alta irradiância, otimizam o ganho em carbono (Gonçalves et al., 2012).

A condição de luminosidade influencia o comportamento das mudas, diferencialmente, de acordo com o grupo ecológico da espécie. Em ambientes de sol, as espécies pioneiras alocam mais biomassa na parte aérea do que as espécies secundárias e clímax, assim define-se a capacidade de competição entre espécies (Carvalho, 2015). As plantas jovens de *P. altsonii* apresentaram valores de TCMSF e de TCMSR maiores sob o nível intermediário de irradiância e menores valores em baixa irradiância.

Quanto aos teores de nutrientes às plantas de *P. altsonii* sob sombra apresentaram maiores teores de N comparado com as plantas submetidas a maiores irradiâncias. A concentração de nitrogênio foliar tem sido fortemente correlacionada com a capacidade fotossintética por afetar a etapa fotoquímica influenciando no transporte de elétrons e afetando os fotossistemas I (PSI) e II (PSII) (Nikiforou e Manetas, 2011) e afetar a etapa bioquímica, devido sua relação com a taxa de carboxilação da Rubisco (Evans 1989). Quanto à variação dos teores de N em ambientes contrastantes de luz, os teores de N podem variar conforme a espécie. No caso da espécie *P. altsonii*, os maiores teores foram encontrados nas plantas de sombra, podendo fazer parte da estratégia da espécie em investir na ampliação da captação e aumento da eficiência do uso da luz decorrente da baixa irradiância disponível (Rossatto et al., 2010). A utilização de grande quantidade de N nas folhas resulta no decréscimo da eficiência do uso deste elemento, entretanto, pode aumentar a eficiência no uso da radiação fotossintética ativa, uma vez que o N faz parte das proteínas associadas ao aparato fotossintético (Bundchen et al., 2013). Entretanto, deve-se salientar que nem sempre há relação direta entre fotossíntese e o conteúdo de nitrogênio da folha. Isto porque, em muitos casos, uma alta proporção de nitrogênio foliar pode estar alocada em compartimentos celulares não diretamente envolvidos na fotossíntese, o que pode tornar fraca a correlação entre fotossíntese e o conteúdo de nitrogênio em alguns casos (Carvalho, 2015).

Os maiores teores de Mg foram encontrados nas folhas de *P. altsonii* sob condições de sombra comparado com os teores das folhas submetidas a pleno sol. Este nutriente é, dentre outros, notadamente o que apresenta constante variação em amostragem foliar (Hawkesford et al., 2012). Dentre os principais papéis do magnésio destaca-se sua participação nas moléculas de clorofila, como cofator de quase todas as enzimas fosforilativas e na formação de pontes entre o pirofosfato do ATP ou ADP (tri e difosfato de adenosina) (Maathuis, 2009).

Quanto aos micronutrientes, os maiores teores desses nutrientes nas folhas de *P. altsonii* de sombra podem estar relacionados à necessidade de maior investimento na captação da energia luminosa disponível sob- baixa luminosidade. O Fe é requerido para a síntese de clorofila; componentes do citocromo e da nitrogenase (Raven et al., 2006), e o Mn que é um

componente ativador de algumas enzimas; requerido para a integridade da membrana do cloroplasto e faz parte de uma mangano-proteína presente no complexo de evolução do oxigênio (Raven et al., 2006).

Folhas adaptadas à baixa intensidade luminosa apresentam concentrações de clorofila mais elevada do que plantas de sol. O aumento da clorofila em folhas de sombra pode ser resultado do aumento relativamente nas concentrações de clorofila *b*, causada pelo aumento na quantidade de complexos coletores de luz do fotossistema II que é mais rico em clorofila *b* do que em o fotossistema I. O aumento na proporção do fotossistema II permite um acréscimo da eficiência na absorção de luz nos ambientes onde a irradiância é escassa, proporcionando maior eficiência na capacidade fotossintética (Oguchi et al., 2005). Contudo, no presente estudo não houve diferença significativa entre as concentrações de Chl *a*, Chl *b*, Chl<sub>Tot</sub> e C<sub>x+c</sub> na base da área entre as plantas nos diferentes níveis de irradiância das plantas de *P. altsonii*.

A maior relação clorofila *a/b* foi encontrada nas folhas de sol, pois a proporção entre as clorofilas *a* e *b*, de uma maneira geral, tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa (Oguchi et al., 2005). Uma maior proporção relativa de Chl *b* em plantas sombreadas é significativa porque permite que a captura de energia em diferentes comprimentos de ondas, bem como uma transferência com menos perdas para as moléculas de Chl *a* especiais presentes nos centros de reação dos fotossistemas. Assim, a adaptação à baixa irradiância pode envolver um aumento do complexo antena do fotossistema II, bem como uma diminuição da taxa de Chl *a* / *b* esperado em folhas de sombra em comparação com as folhas de sol (Mendes et al., 2001).

A alteração na disponibilidade de luz pode induzir modificações nos processos fisiológicos que são determinantes para otimização das trocas gasosas e assimilação de carbono (Tang et al. 1999, Poorter 1999, Kenzo et al., 2011). Para uma análise de fluxo de elétrons em plantas, a fluorescência da clorofila *a* associada ao teste JIP tem sido uma poderosa ferramenta, sensível e não invasiva que tem possibilitado informações rápidas quanto ao funcionamento dos dois fotossistemas (Stirbet e Govindjee, 2011).

Um dos fatores que podem também influenciar na capacidade de assimilação de carbono em plantas é a produção de ATP e NADPH provenientes da etapa fotoquímica. Dentre os fatores que podem influenciar na etapa fotoquímica destacam-se a luz. Alterações na eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) são indicativos da ocorrência de fotoinibição na folha (Gonçalves et al., 2010). Valores de ( $F_v/F_m$ ) de aproximadamente 0,80 a 0,83 são característicos de folhas que não apresentam sinais de fotoinibição (Balaguer et al., 2002). Quando são encontradas diminuições nos valores de  $F_v/F_m$  em medidas realizadas após o

decorrer da noite e antes do amanhecer, podemos assumir a ocorrência de fotoinibição crônica, envolvendo danos no aparato fotossintético. É importante ressaltar que, em alguns casos, a manutenção de queda no  $Fv/Fm$  pode ser relacionada com a presença, mesmo durante a noite, de elevados níveis de zeaxantina, pigmentos envolvidos na dissipação termal do excesso de energia de excitação (Maxwell e Johnson, 2000). Caso a queda de  $Fv/Fm$  aconteça durante o dia, diminuindo gradativamente após um elevado  $Fv/Fm$ , podemos associá-la a utilização de vias alternativas não fotoquímicas na extinção da energia dos fotossistemas (ex., dissipação termal via ciclo das xantofilas) (Balaguer et al., 2002).

No presente estudo, observou-se que as plantas jovens de *P. altsonii* submetidas a pleno sol e a irradiância intermediária exibiram fotoinibição crônica, resultantes de danos causados pelo excesso de irradiância. A diminuição dos valores de  $Fv/Fm$  podem estar associados a inatividade dos centros de reação (RC), o que pode favorecer maior dissipação de energia na forma de calor e de fluorescência (Gonçalves et al., 2007). Além disso, o efeito prolongado da fotoinibição também pode estar relacionado à degradação da proteína D1 do PS II e a efeitos nocivos ocasionados pela produção de espécies reativas de oxigênio (Aro et al., 1994; Strasser et al., 2000; Gonçalves et al., 2001).

Contudo, as plantas submetidas a pleno sol, após 61 dias de experimento apresentaram aumento nos valores de  $Fv/Fm$ , como consequência da emissão de folhas adaptadas ao ambiente com alta irradiância. Em experimento com plantas adultas de *P. opacum*, Marengo e colaboradores verificaram que folhas de dossel exibiram apenas fotoinibição dinâmica, sugerindo que algumas espécies de *Protium* apresentam plasticidade exibindo ajustes morfofisiológicos importantes para a aclimação sob diferentes irradiâncias (Marengo et al., 2007).

A capacidade de aclimação das plantas ao ambiente de luz perpassa por ajustes no tamanho do complexo antena do PSII ou ainda na estequiometria PSI/PSII (Hogewoning et al., 2012). Nas plantas de sol, após a emissão de folhas novas, aos 61 dias de experimento, pode-se observar maior valor da fase IP, o que sugere abundância relativa de PSI comparada a de PSII em folhas expostas a pleno sol em relação às folhas de sombra (Schansker et al. 2003, Ceppi et al. 2012).

A semelhança dos valores de  $Fv/Fm$ , os parâmetros relacionados aos índices de desempenho também reduziram quando as plantas foram submetidas a intensidades luminosas maiores. Essa exposição da folha a alta irradiância pode ter danificado a proteína D<sub>1</sub> do PSII, interferido no transporte de elétrons durante a fotossíntese, diminuindo a eficiência no uso da energia (Dahlgren et al., 2006). Contudo, com a emissão de novas folhas adaptadas ao novo

ambiente lumínico, as plantas sob pleno sol exibiram recuperação dos índices de desempenho. O índice de desempenho na base ABS ( $PI_{ABS}$ ) permite uma análise mais ampla do processo de funcionamento do aparato fotossintético e tem sido considerado como um parâmetro mais sensível para a detecção e quantificação de estresse em plantas do que a resposta da eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (Gonçalves e Santos Junior, 2005; Gonçalves *et al.*, 2007). Isto porque este parâmetro relaciona a eficiência de absorção, captura e transferência de energia de excitação pelo fotossistema II proporcionando melhor diagnóstico do grau de efeito do ambiente estressante. O  $PI_{total}$  é o índice de desempenho para a conservação de energia proveniente da absorção de fótons pelo PSII para o fluxo de redução dos receptores finais de elétrons do PSI (Desotgiu *et al.*, 2012).

Esses ajustes da variação de intensidade luminosa mostram a plasticidade morfofisiológica da espécie em se adaptar as condições ambientais existentes. Paralelo aos ajustes fisiológicos, as plantas jovens de *P. altsonii* também apresentaram ajustes anatômicos relevantes que indicam sua plasticidade quanto à adaptação a novos ambientes lumínicos (Cao, 2000; Hanba *et al.* 2002). Espécies tolerantes à sombra, a plasticidade do mesofilo pode ser menor (Hanba *et al.* 2002).

O mesofilo de *P. altsonii* apresentou diferenças significativas no parênquima lacunoso nos três tratamentos, com valores maiores no tratamento de sol. O aumento nas taxas de fotossíntese de plantas adaptadas à baixa irradiância, e que passam a receber mais luz, só é possível quando as folhas possuem capacidade para aumentar o tamanho dos cloroplastos nas células do mesofilo; isto é, na interface cloroplasto/espaco intercelulares. Plantas que possuem grandes espaços vazios nas células do mesofilo (área da membrana celular não ocupada por cloroplasto) conseguem desenvolver – se após uma abertura de dossel (Oguchi *et al.*, 2005).

Em plantas jovens de *P. altsonii* a espessura do mesofilo foi maior nos tratamentos de sol e intermediários. Os maiores valores para espessura da lâmina em condições de luz mais intensa podem ser resultantes do aumento na espessura dos tecidos fotossintetizantes da lâmina foliar (Cao, 2000) e pelo alongamento das células do parênquima paliçádico, uma vez que o número de camadas celulares das plantas do tratamento de sol e intermediário teve um incremento da espessura do parênquima paliçádico e lacunoso.

Maiores espessuras do parênquima lacunoso em relação ao parênquima paliçádico favorecem a luz difusa predominante nos tratamentos de sol e intermediário. O aumento do parênquima lacunoso associado a maior fração de espaços intercelulares no interior da folha, geram maiores quantidades de luz difusa, aumentando à absorção da luz pelos cloroplastos dentro do mesofilo, tornando mais eficiente à distribuição da luz no interior da folha (Taiz e

Zeiger, 2004). Essas variações estruturais estão relacionadas com a regulação da radiação luminosa e a difusão de CO<sub>2</sub> proporcionando uma maior eficiência fotossintética e o crescimento em massa seca (Valladares et al., 2012; Fernandes et al., 2014). Essas características foram observadas nas plantas sob irradiância intermediária.

Folhas que se desenvolvem em ambientes com alta luminosidade tendem a ser menores e mais espessas (Fernandes et al., 2014). Foi registrado aumento da espessura da epiderme superior no tratamento de sol.

A densidade estomática geralmente está positivamente relacionada com as trocas gasosas, pois o aumento da densidade está associado com maior condutância estomática (Cao, 2000), fato observado no tratamento de sol e intermediário.

## 5. Conclusão

As plantas jovens de *Protium altsonii* exibiram melhor crescimento e acúmulo de biomassa quando submetidas à irradiância intermediária. Contudo, a espécie também apresentou capacidade de ajustar sua morfologia e sua fisiologia a condições contrastantes de irradiância, sugerindo boa capacidade de aclimação a altas e baixas intensidades luminosas. A aclimação ao ambiente de alta irradiância ocorreu em função da emissão de novas folhas com características anatômicas e fisiológicas mais adequadas a aumentar a eficiência na utilização do excesso de luz como demonstrado pela recuperação dos valores de Fv/Fm e dos índices de desempenho.

## Agradecimentos

A Capes, e a Fundação do Amapá- FAPEAP pelo auxílio financeiro ao primeiro autor. Ao Dr. Douglas Daly do New York Botanical Garden, USA pela identificação das espécies; ao Dr. Ulysses Santos Júnior pela imprescindível ajuda e discussões; ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA pelo apoio logístico e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA pela oportunidade de desenvolver o trabalho de doutorado; a SEMA pela autorização de coleta na RDS do Rio Iratapuru; a Comunidade de São Francisco pelo suporte em campo.

## Referências

- ARO, N.R.; Mc CARRERY, S. & ANDERSSON, J.M. Recovery from photoinhibition in peas (*Pisum sativum* L.) acclimated to varying growth irradiances, Role of D1 protein turnover. **Plant Physiology**. 104:1119-1129, 1994.
- ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas a diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 4, p. 853-862, 2001.
- BUGBEE, B. G. Growth, analysis and yield components. In: Salisbury, F. B. Units, Symbols, and Terminology for plant physiology. *Oxford University Press*, 115-119p. 1996.
- CAO, B.; DANG, Q.; ZHANG, S. Relationship between photosynthesis and leaf nitrogen concentration in ambient and elevated [CO<sub>2</sub>] in white birch seedlings. *Tree Physiology*, 27: 891-899. 2007.
- CAO, K.F. Leaf anatomy and chlorophyll content of 12 woody species in contrasting light conditions in a Bornean heath forest. **Canadian Journal of Botany** 78(10): 1245-1253. 2000.
- CAPUZZO, J. P.; ROSSATTO, D. R.; FRANCO, A. C. Differences in morphological and physiological leaf characteristics between *Tabebuia aurea* and *T. impetiginosa* is related to their typical habitats of occurrence. *Acta Bot. Bras.* [online], vol.26, n.3, 2012.
- CEPPI, P., Y.-T. HWANG, D. M. W. FRIERSON, AND D. L. HARTMANN, 2012: Southern Hemisphere jet latitude biases in CMIP5 models linked to shortwave cloud forcing. *Geophys. Res. Lett.*, 39, L19708, doi:10.1029/2012GL053115.
- COSTA, S. C. C. da. Dinâmica populacional de *Protium pallidum* Cuatrec. (Breu Branco) em uma floresta tropical de terra-firme explorada seletivamente no estado do Pará, Brasil. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Botânica, área de concentração em Botânica Tropical) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.
- DAHLGREN, J.P.; ERIKSSON, O.; BOLMGREN, K.; STRINDELL, M. & EHRLÉN, J. Specific leaf area as a superior predictor of changes in field layer abundance during forest succession. **Journal of Vegetation Science** 17: 577-582. 2006.
- DAVANSO, V.M.; SOUZA, L.A.; MEDRI, M.E.; PIMENTA, J.A.; BIANCHINI, E. Photosynthesis, growth and development of *Tabebuia avellanadae* Lor. Ex Griseb. (Bignoniaceae) in flooded soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45: 375-384, 2002.

- DESOTGIU R., CASCIO C., POLLASTRINI M., GEROSA G., MARZUOLI R., BUSSOTTI F. 2012. Short and long term photosynthetic adjustments in sun and shade leaves of *Fagus sylvatica* L., investigated by the fluorescence transient (FT) analysis. *Plant Biosystems*, 146 (Suppl), 206–216.
- EVANS, D.S. *Entrepreneurial Choice and Success*, Washington: U.S. Small Business Administration, 1989.
- EVANS, J.R.; POORTER, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of SLA and nitrogen partitioning in maximising carbon gain. *Plant Cell & Environment*, 24:755-768, 2001.
- FARIA C, JORGE CD, BORGES N, TENREIRO S, OUTEIRO TF. HInhibition of formation of a-synuclein inclusions by mannosylglycerate in a yeast model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1830(8):4065-72.
- FERREIRA, L.C.; THOMAZI, R. D.; OLIVEIRA, D. A.C.; SILVA, A. G. Estrutura populacional e padrão espacial de *Protium icicariba* (DC.) Marchand na Área de Proteção Ambiental de Setiba, Espírito Santo, sudeste do Brasil. *Natureza on line* 8 (1): 39-45. 2010.
- GONÇALVES JFC, MARENCO RA, VIEIRA G (2001) Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of mahogany and tonka bean under two light environments. *Braz. J. Plant Physiol.* 13:149-157.
- GONÇALVES, J. F. C, SANTOS JUNIOR, U. M. Utilization of the chlorophyll *a* fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:307-313.2005.
- GONÇALVES, JFC, SANTOS JR, UM, NINA JR, AR, CHEVREUIL, LR. Energetic flux and performance index in copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) and mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedlings grown under two irradiance environments. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(3):171-184. 2007.
- GONÇALVES, C.N.; CERETTA, C.A.; BASSO, C.J. Sucessões de culturas com plantas de cobertura e milho em plantio direto e sua influência sobre o nitrogênio no solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, p.153-159, 2010.
- GYIMAH, R.; NAKAO, T. Early growth and photosynthetic responses to light in seedlings of three tropical species differing in successional strategies. **New Forests**, v. 336, p. 217-236, 2007.
- HANBA, Y. T.; KOGAMI, H.; TERASHIMA, I. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.1021-1030, 2002.

- HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H. Stress indicators: Chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME, J.P. (ed.), *Methods in Comparative Plant Ecology*. Chapman and Hall, London. p. 148-152.1993.
- HODNETT, J.P. ELLIOTT, D.K. OLSON, T.J. WITTKE, J.H. Ctenacanthiform sharks from the Permian Kaibab Formation, northern Arizona *Historical Biology*, v. 24, p. 1-15.
- HOGEWONING, S.; MALJAARS, H.; HARBINSON, J. The acclimation of photosynthesis in cucumber leaves to different ratios of red and blue light. *Photosynthesis Research*, v.91 p.287-288, 2007.
- KENZO, T., YONEDA, R., MATSUMOTO, Y., AZANI, M.A., MAJID, N.M.: Growth and photosynthetic response of four Malaysian indigenous tree species under different light conditions. – *Journal of Tropical Forest Science* **23**: 271-281, 2011.
- KULL, O. Acclimation of photosynthesis in canopies: models and limitations. *Oecologia*, 133: 267-279. 2001.
- LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. Determination of total carotenoids and Chlorophyll *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11:591-592. 1983.
- LOPES, J.C.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. *Oxandra unibracteata* (Annonaceae), a new species from the Atlantic Forest and a new synonym of *O. nitida*. *Phytotaxa*, Auckland, v. 84, n. 1, p. 25-30, 2013.
- MARENCO, R. A.; Neves, T. S.; CAMARGOS, M. A. B.; DIAS, D. P.; COSTAS, G. F.; RODRIGUES, J. C. Fotoinibição dinâmica da fotossíntese em árvores de dossel da Amazônia Central. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 150-152, jul. 2007.
- MARKESTEIJN, L.; POORTER, L. & BONGERS, F. 2007. Light-dependent leaf trait variation in 43 tropical dry forest tree species. *American Journal of Botany* 94(4): 515-525.
- MAXWELL, K. e JOHNSON, N.G. “Chlorophyll fluorescence – a practical guide”. *Journal of Experimental Botany* 51 (345), pp. 659-668.2000.
- MENDES, M. M.; GAZARINI, L. C.; RODRIGUES, M. L. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments – effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environmental and Experimental Botany*, n.45, p.165-178, 2001.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; MURAOKA, T.; CARMO, C. A. F. S.; MELO, W. J. Análise química de tecidos vegetais. In: Silva, F. C. (Ed.). *Manual de Análise Química de Solos, Plantas e Fertilizantes*. EMBRAPA, Brasília, p. 172-223.1999.

- MORAIS, V.A; HADDAD, D; CRAESSAERTS, K. DE BLOCK, P.J; SWERTS, J; VILAIN, S. PINK1 loss-of-functions mutations affect mitochondrial complex I activity via Ndufa10 ubiquinone uncoupling. *Science*. 10.1126/science.1249161.
- NIKIFOROU C, MANETAS Y. The winter-red-leaf syndrome in *Pistacia lentiscus*: evidence that the anthocyanic phenotype suffers from nitrogen deficiency, low carboxylation efficiency and high risk of photoinhibition. *Journal of Plant Physiology* 168:2184-2187. doi:10.1016/j.jplph.2011.07.011. 2011.
- PEREIRA, D.C.; BARROS, C.F. & SCARANO, F.R. In *situ* variation in leaf anatomy and morphology of *Andira legalis* (Leguminosae) in two neighbouring but contrasting light environments in a Brazilian sandy coastal plain. **Acta Botanica Brasilica** 23: 267-273. 2009.
- POORTER H., NIKLAS K. J., REICH P. B., OLEKSYN J., POOT P., MOMMER L. 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *Tansley review. New Phytol.* 193, 30–5010.1111/j.1469-8137.2011.03952.
- POORTER, L.: Variation in crown light utilization characteristics among tropical canopy trees. – *Functional Ecology* 13: 396-410, 1999.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 7 ed. 830p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- ROSSATTO, D. R.; TAKAHASHI, F. S. C.; SILVA, L. DE C. R. AND FRANCO, A. C. Características funcionais de folhas de sol e sombra de espécies arbóreas em uma mata de galeria no Distrito Federal, Brasil. *Acta Bot. Bras.* [online]. vol.24, n.3, pp. 640-647. 2010.
- RUDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Plant Review*, 1 (1), 93- 104, 2007.
- SANTOS, T. A.; MIELKE, M. S.; PEREIRA, H. A. S.; GOMES, F. P.; SILVA, D. C. Trocas gasosas foliares e crescimento de plantas jovens de *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae) submetidas ao alagamento do solo em dois ambientes de luz. *Scientia Forestali*, Piracicaba, v. 40, n. 93, p. 047-056, mar, 2012.
- SARIJEVA, G.; KNAPP, M. & LICHTENTHALER, H.K. 2007. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Ginkgo* and *Fagus*. *Journal of Plant Physiology* 164: 950-955.

- SCHANSKER, G; SRIVASTAVA, A; GOVINDJEE; STRASSER, R. Characterization of the 820 nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Functional Plant Biology*, Dordrecht, v. 30, p. 785-796, 2003.
- SOUZA, G. M.; BALMANT, B. D.; VÍTOLO, H. F.; GOMES, K. B. P.; FLORENTINO, T. M.; CATUCHI, T. A.; VIEIRA, W. L. Estratégias de utilização de luz e estabilidade do desenvolvimento de plântulas de *Cordia superba* Cham. (Boraginaceae) crescidas em diferentes ambientes luminosos. *Acta bot. bras.* 23(2): 474-485. 2009.
- SRIVASTAVA A, STRASSER RJ, GOVINDJEE . Greening of peas: parallel measurements of 77 K emission spectra, O-J-I-P chlorophyll *a* fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynthetica* 37:365-392. 1999.
- STIRBET, A., GOVINDJEE. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104:236-257.
- STRASSER RJ, SRIVASTAVA A, GOVINDJE E . Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61:32-42. 2010.
- STRASSER RJ, SRIVASTAVA A, TSIMILLI-MICHAEL M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (eds), *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, pp.445-483. Taylor & Francis, London.
- STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M., QIANG, S., GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**: 1313-1326, 2010.
- STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Ed.). *Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Springer, Dordrecht, 321-362p.2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 690 p. 2004.
- TANG, Y., KACHI, N., FURUKAWA, A., AWANG, M.B.: Heterogeneity of light availability and its effects on simulated carbon gain of tree leaves in a small gap and the understory in a tropical rain forest. – *Biotropica* **31**: 268-278, 1999.
- TOSTES, L. C. L.; CARIM, M. J. V.; GONÇALVES, J. F. C.; TORRES, A. M.; GUIMARAES, J. R. S. Padrão de Distribuição Espacial e Estrutura Diamétrica de *Protium*

Burm. f. na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru, Sudoeste do Amapá, Amazônia Oriental, Brasil. *no prelo* Revista *Árvore*.

VALLADARES, F. Photosynthetic responses to radiation. In: FLEXAS. Terrestrial photosynthesis in a changing environment: a molecular, physiological and ecological approach. United Kingdom: Cambridge University, cap. 16, p. 241-260, 2012.

VITTI, G.C.; FERREIRA, A.C. 1997 Síntese de análises químicas em tecido vegetal. ESALQ - *Departamento de Ciência do Solo*.

## Capítulo III

---

**Variabilidade de metabólitos secundários e atividade antifúngica do óleo de âmbar resina emitida por *Protium altsonii* Sandwith (Burseraceae)**

\*Capítulo transformado em artigo de acordo com normas da revista *Phytochemistry*

**Variabilidade de metabólitos secundários e atividade antifúngica do óleo de âmbar  
resina emitida por *Protium altsonii* Sandwith (Burseraceae)**

**RESUMO**

*Protium altsonii* Sandwith, denominados de “breu”, tem importância econômica no estado do Amapá, que exsuda uma resina branca usada pela comunidade de São Francisco (RDS), através da Cooperativa mista de produtores e extrativistas do Rio Iratapuru- COMARU para calefação de embarcações, como repelente além de abastecer a empresa Natura Inovação Tecnológica com toneladas de pedras de bréus, o que representa um importante insumo para indústria de perfumaria e fonte de renda para a comunidade. O objetivo deste trabalho visa o estudo da variabilidade química das su óleo de âmbar resina emitido por *P. altsonii* Sandwith (Burseraceae), além de seu potencial antifúngico. As amostras foram coletadas de indivíduos em áreas de platô, com estado fitossanitário sadias, pela manhã, sendo retiradas do tronco com um facão e colocadas imediatamente em saco de papel vedado, devidamente identificado em local isento de luz. Foi realizada cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas, prospecção fitoquímica em todas as amostras, além da obtenção e cultivo das linhagens, preparo do inóculo, atividade mínima inibitória e ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido. Os óleos essenciais da resina de nove amostras de *P. altsonii* conduziram a identificação de 86 compostos químicos, representando 98 - 100 % dos constituintes dos óleos essenciais. Os monoterpenos foram predominantes em todas as amostras, embora o conteúdo de sesquiterpenos em algumas amostras tenha sido em torno de 38,05 %. Esse óleo apresenta em sua composição substâncias químicas, como pinene, camphor, thymol, carvacrol, copaene, metil eugenol e chamigrene que apresentam potencial antifúngico. Todos os perfis dos óleos de *P. altsonii* foram muito eficientes para inibir o crescimento do fungo *P. chrysogenum*. A avaliação fungitóxica, por disco difusão, quando realizada nos extratos do óleo de *P. altsonii* apresentaram halos de inibição evidenciando a atividade fungistática. As frações 3, 8 e 9 foram as que apresentaram melhor resposta frente aos fungos filamentosos *A. niger* e *F. oxysporum*, evidenciando halos com diâmetro acima de 1,0 cm. A presença, ausência ou a quantidade de um determinado composto químico deve estar associada a diversos fatores ambientais. Em *P. altsonii* a quantidade de uma determinada substância esta relacionada com o período da sazonalidade e tipo de resina. Os resultados mostrados aqui neste trabalho, e que *P. altsonii* (Breu Branco) tem um potencial fonte de

agentes antifúngicos, devido à presença de compostos que tem atividade para estes fins. Contudo, os resultados mostram que o período de coleta é extremamente importante para a identificação de certos compostos essenciais com interesse na atividade fungicida.

Palavras-chave: *Protium*, óleo essencial, breu, resina.

## 1. Introdução

Espécies de Burseraceae são endêmicas na região amazônica e possuem enorme potencial econômico, destaque para seus óleos essenciais, um dos mais importantes grupos de matérias-primas para as indústrias de perfumaria, alimentícia e farmacêutica (Marques et al., 2010; Lima et al., 2014). *Protium* Burm. f e o que mais se destaca dessa família com 150 espécies, ocorrendo predominantemente na Amazônia Legal (Weeks et al., 2005; Daly e Fine, 2011) e em diferentes domínios fitogeográficos (Daly, 2015).

O óleo essencial extraído da resina de algumas espécies de *Protium* apresenta-se como uma mistura complexa que pode conter até 100 ou mais compostos orgânicos que pertencem as mais diversas classes de compostos com diversas atividades biológicas já registradas (Oliveira et al., 2004; Otuki et al., 2005; Aragão et al., 2006; Pontes et al., 2007; Soldi et al., 2008; Holanda Pinto et al., 2008; Pontes et al., 2010). O uso de agentes antifúngicos resulta, através de processos naturais de adaptação de evolução biológica das espécies, em um aumento nos últimos anos de espécies de leveduras resistentes patógenas a humanos e animais (Duarte, 2006; Rybalchenko, et al., 2010). As infecções de origem fúngicas correspondem até 10% do total de casos, com predomínio das *Cândidas sp* e dos *Aspergillus sp* (Koshi & Cherian, 1995).

A características que as plantas medicinais possuem de sintetizar substância com estruturas diversificadas, como sistema de defesa contra agentes patogênicos, devido apresentem atividade sobre grande espectro de fungos filamentosos e leveduras (Deus et al., 2011). A investigação sistemática sobre os aspectos microbiológicos, profiláticos e terapêuticos das infecções oportunistas, ressaltam-se as infecções fúngicas que correspondem até 10% do total de casos, com predomínio de microrganismo pertencente aos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Mylonakis & Calderwood, 2001). O fungo *Fusarium* está presente no solo e é o causador de “damping off” em sementeiras e murchas vasculares em viveiros de mudas e culturas de importância econômica (Deus et al., 2011).

*Protium altsonii* Sandwith tem representantes de importância econômica em todo o estado do Amapá, denominados de “breu”, que exsuda uma resina branca usada pela comunidade de São Francisco (RDS), através da Cooperativa mista de produtores e extrativistas do Rio Iratapuru-COMARU para calefação de embarcações, como repelente além de abastecer a empresa Natura Inovação Tecnológica com toneladas de pedras de bréus, o que representa um importante insumo para indústria de perfumaria e fonte de renda para a comunidade.

A presença ou ausência de substâncias químicas do metabolismo secundário em uma determinada espécie pode ser pelo fator externo da sazonalidade, em resposta a fatores bióticos e abióticos, principalmente, aqueles ligados ao clima que influencia na qualidade e quantidade do óleo essencial. Estes fatores provocam desvios de rotas biossintéticas de metabólitos primários e secundários, por isso, a variabilidade na composição química do metabolismo das plantas (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Em *P. altsonii* essa relação é possível de existir, assim a concentração das substâncias pode variar em função da temperatura, radiação solar, precipitação pluviométrica, nutrientes do solo, o que ocorre devido a grande diversidade de ambientes onde essas árvores se encontram. A concentração e fluxos de macro e micronutrientes na matéria orgânica do solo, bem como as taxas de rotatividade de matéria orgânica tem fundamental importância para a manutenção da fertilidade entre os diferentes habitats da floresta (Sobrado, 2013). Essa distribuição nutricional no solo é relevante em uma situação de deficiência, quando diversos processos de desenvolvimento de plantas nativas e rotas bioquímicas podem ser priorizados em função do crescimento, desenvolvimento, estado metabólico e meio ambiente (Sobrado, 2014).

A exploração da resina dos breus apresenta algumas características originais em seu manejo que vão definir, em última instância, as possibilidades de suas aplicações industriais, e, portanto, estabelecer o seu padrão de qualidade para o mercado. A principal delas se refere à eventual mistura das resinas das diversas espécies encontradas, no estado do Amapá, ou, ainda, de espécimes de idades e locais distintos. Fato ocorrido pela dificuldade de se proceder à diferenciação morfológica e taxonômica, entre as espécies, comprometendo a qualidade e atividade química do óleo encontrado em sua resina. Esses óleos podem ser obtidos de diferentes partes da planta, como dos frutos, sementes, resina, caules, folhas e ramos (Siani et al., 1999; Bandeira et al., 2002; Zoghbi e Andrade, 2002).

Este trabalho visa registrar diferentes perfis dos constituintes químicos e sua atividade antifúngica do âmbar resina de *Protium altsonii* emitidos por essa espécie de acordo com os diferentes padrões adotados durante a coleta na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Iratapuru, estado do Amapá.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Procedência do material*

As amostras de âmbar resina de *P. altsonii* foram coletadas na região da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru- RDS, no município de Laranjal do Jari, entre as coordenadas 00° 20' 00'' a 00° 30' 00'' de latitude Sul e 52° 30' 00'' a 52° 34' 00'' de longitude Oeste de Greenwich. De sul para o norte, a área estudada da RDS foi Serra Anani/Manoel Preto, distante 9 Km da vila de São Francisco em percurso fluvial e terrestre com altitudes entre 200 e 300 metros. A região está sob o domínio do Escudo Guianense, constituído por rochas cristalinas do Pré-Cambriano, e a borda norte da Bacia do Amazonas, composta por rochas sedimentares paleozóicas. O relevo apresenta-se dissecado, muitas vezes sob a forma de colinas. A floresta é densa de terra firme, com predomínio de latossolos arenosos a argilosos, bastante intemperizados (Rabelo, 2008). O clima é tropical com temperatura média de 27,5 °C e índice pluviométrico médio de 2.158,8 mm (Sobrinho et al., 2012).

## 2.2. Coleta do âmbar resina

Foram inventariados 143 indivíduos de *P. altsonii* com altura do peito  $\geq$  10 cm, sendo selecionadas e marcadas 50 matrizes para os estudos fitoquímicos. A identificação foi feita com base no registro fotográfico de ramos floríferos e frutíferos de indivíduos destas espécies e confirmados pelo especialista em Burseraceae, o Dr. Douglas Daly do New York Botanical Garden, USA e incorporados no HAMAB do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA.

As amostras de âmbar resina de *P. altsonii* foram coletadas de indivíduos em áreas de platô, com estado fitossanitário sadias, pela manhã, sendo retiradas do tronco com um facão e colocadas imediatamente em saco de papel vedado, devidamente identificado em local isento de luz. Posteriormente, em laboratório foi armazenada no freezer. As coletas desses indivíduos foram realizadas em períodos de maior precipitação pluviométrica (janeiro/abril) e menor precipitação (agosto/novembro) de 2012 a 2014 em diferentes fenofases (presença de frutos, ausência de frutos, queda foliar, presença de flores e ausência de flores), além de separar resina branca (com larva) e preta (sem larva).

A produção dos frutos ocorre entre janeiro- abril (período de maior precipitação), com frutos imaturos (verde) entre janeiro e março e frutos maduros (vermelhos) em abril. O período de menor precipitação ocorre entre agosto a dezembro quando a espécie produz floração. Porém, a espécie apresenta comportamento fenológico (observação em campo) com características supra anual, ou seja, não produz frutos todo ano.

### *2.3. Obtenção do óleo essencial*

Foram realizadas 9 extrações do óleo essencial das matrizes de âmbar resina de *P. altsonii*, no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará- UFPa. Foram separados os perfis químicos de acordo com as fenofases e o período de precipitação pluviométrica. 50 g de âmbar resina fresca foram pesadas, macerada e submetida à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado durante cinco horas, acoplado a um sistema de refrigeração para manutenção da água de condensação entre 10-12° C. O óleo essencial foi desidratado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, e armazenado em frascos selados, e conservados sob baixa temperatura para posterior análises. Para cada perfil coletado duas repetições foram realizadas. Os rendimentos dos óleos foram calculados a partir do peso do material fresco e volume do óleo obtido.

### *2.4. Obtenção dos extratos brutos*

Os resíduos das resinas (49,5 g) extraídas por hidrodestilação foram mensurados e submetidos à extração por percolação exaustiva, à temperatura ambiente no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará- UFPa. Foram utilizados 50 ml de hexano (Synth), em seguida acetato de etila (Synth), éter etílico (CRQ), clorofórmico (CRQ) e metanol (Synth) por 30 minutos, respectivamente em triplicata, para assegurar uma melhor extração dos constituintes solúveis. Cada solvente foi filtrado e evaporado à pressão reduzida com auxílio de um rota-evaporador para eliminação do solvente e obtenção do extrato (Simões et al., 2000; Maia et al., 2000). Os rendimentos foram calculados a partir do peso do material fresco e da massa final obtida dos extratos.

### *2.5. Identificação química dos constituintes dos óleos essenciais*

Os constituintes químicos foram identificados analiticamente por meio da cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR- EM), injetando-se 1  $\mu\text{L}$  da amostra diluída em hexano. Os componentes foram identificados através da comparação dos seus espectros de massas e índice de retenção (IR) com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas do sistema e, com dados da literatura (Adams, 2007). Os IR foram obtidos utilizando a série homologada dos *n*- alcanos. A quantificação foi obtida por cromatografia de gás (CG).

### *2.6. Análises cromatográficas*

A análise foi realizada em um sistema CG/EM Thermo, equipado com um detector seletivo de massas quadrupolo operando no modo de impacto eletrônico (EI) a 70eV. O CG-TRACE-1300 equipado com uma coluna (RXi-5Sil-MS-5% difenil, 95% dimetilpolisiloxilano-RESTECK), com 30m x 0,25mm di x 0,25µm de espessura de filme. O forno operou com uma programação de temperatura que variou de 40°C até 260°C a 3°C/min, utilizando gás Hélio como carreador a um fluxo de 0,75mL/min. O injetor foi mantido a 220°C com injeção de 1 µL da amostra através de injetor automático AI/AS-1310 no modo Split 1:20. O EM-ISQ-Single Quadrupolo, operou no modo full scan (iniciando após 3 min, na faixa de massas desde 40-300 a.m.u a 0,2 scan/s). A linha de transferência e a fonte de íons operaram a 240°C, 220°C, respectivamente. As substâncias foram identificadas através do tempo de retenção, índice de retenção calculada a partir dos hidrocarbonetos homólogos e da comparação dos espectros de massas das substâncias com aqueles das bibliotecas Wiley Registry of Mass Spectra 9ª Edição e Adam Essentia Oil library mass spectra, 2009.

CCDA- Cromatografia em camada delgada em alta resolução. Foram utilizadas placas de alumínio com sílica gel 60 (MACHEREY-NAGEL), espessura 0,20 mm, sem indicador de fluorescência, as dimensões das placas eram de acordo com o número de amostras. Os extratos brutos foram solubilizados em hexano, acetato de etila, éter, clorofórmico e metanol (SYNTH) e aplicados cerca de 8 µL em forma de bandas para cada extrato. Para a eluição das placas, foi utilizado sistema tolueno + acetato de etila (95:5). As placas unidimensionais eram desenvolvidas a uma temperatura de 25°C em uma cuba hermeticamente fechada contendo 30 ml da mistura de solventes. Após eluição, as placas eram visualizadas em câmaras de irradiação UV a 365nm e 254nm. Foi utilizado revelador universal (vanilina/etanol/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1) para visualizar a distância percorrida pelo fator de retenção (R<sub>f</sub>).

### *2.7. Prospecção fitoquímica*

Os extratos brutos solubilizados em hexano, acetato de etila, éter, clorofórmico e metanol foram submetidos à prospecção fitoquímica para detecção qualitativa das classes compostos fenólicos, terpenos, cumarina, antranas, antraquinonas e alcaloides. Os diferentes extratos e todas as amostras de óleo essencial foram aplicados em CCDA, posteriormente reveladas com os reagentes específicos para cada classe de metabólitos ([Adaptado de Paris et al., 1965;](#) [Noirfalise et al., 1967](#)).

Para compostos fenólicos totais, as placas foram borrifadas com cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) a 2%. A presença foi considerada positiva quando a coloração foi azul ou verde azulada. O desenvolvimento de fluorescência é considerado positivo para taninos (Matos, 1997). A presença para quase todas as substâncias, em particular terpenos, fenilpropanóides e derivados de poliketóides foi testada com vanilina sulfúrica (vanilina + etanol + ácido sulfúrico) obtendo-se coloração marrom e azul intenso. Para cumarina, antronas e antraquinonas foi borrifado com hidróxido de potássio (KOH/ 20 %, etanol) foi positiva a coloração azul (UV a 365 nm), amarelo (UV a 365 nm) e vermelho respectivamente (Wagner et al., 1984). Os alcaloides foram revelados com Dragendorff, sendo positiva com coloração laranja. Os constituintes voláteis foram revelados com Ácido fosfomolibdico 20%, etanol, sendo positiva para azul intenso.

## 2.8. *Fracionamento por coluna*

Após a prospecção fitoquímica foram separados dois perfis com frutos, resina branca em alta precipitação e sem fruto, com resina oxidada em baixa precipitação para serem solubilizados em coluna utilizando 10g de amostra em uma fração de mistura de hexano, sendo colocado algodão + sílica (30 g) + algodão e palha de aço para separar as substâncias presentes. Posterior, foi lavado com 160 v em hexano; 8 hexano: 2 éter; 1 hexano: 1 éter; éter; clorofórmio; etanol e metanol. Cada solvente foi filtrado e evaporado à pressão reduzida com auxílio de um rota-evaporador para eliminação do solvente e obtenção do extrato (Simões et al., 2000; Maia et al., 2000). Os rendimentos foram calculados a partir do peso do material fresco e da massa final obtida dos extratos. Posterior, foi realizada a prospecção fitoquímica onde diferentes extratos foram aplicados em CCDA, posteriormente reveladas com os reagentes específicos para cada classe de metabólitos (Adaptado de Paris et al., 1965; Noirfalise et al., 1967).

## 2.9. *Obtenção e cultivo das linhagens utilizadas nos ensaios*

Para a investigação da atividade antifúngica foram utilizadas cepas cedidas pela Coleção de cultura de fungos filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e os ensaios realizados no Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos da Universidade Federal do Pará. Os testes com uma cepa de levedura resistente *Candida albicans* (IOC 3770) e duas cepas de fungos filamentosos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* (IOC 4020) e *Aspergillus ninger* (IOC 100). A levedura foi cultivada em meio Ágar Saboraud Dextrose (ASD), incubados a 28°C por cinco dias. Os fungos filamentosos foram cultivados em meio Ágar

Batata Dextrose (BDA), incubado a 28°C por sete dias. Todos os micro-organismos foram purificados através de repicagens sucessivas. O método de investigação de atividade antifúngica aplicado neste trabalho foi adaptado e segue um protocolo de execução do descrito por [Lima et al. \(2006\)](#).

### 2.10. Preparo do inóculo

Após crescimento e purificação dos microrganismos realizou-se o preparo dos inóculos. Da cultura de levedura (*C. albicans*) foi retirada uma alçada (alça de platina) e transferida para tubos contendo 9mL de solução salina a 0,9%. A solução final foi ajustada para uma concentração de  $1 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colônias para cada 1mL de solução (UFC/mL). A partir da solução concentrada realizou-se a lei das diluições segundo [Herrera \(2001\)](#) até diluição  $10^{-3}$ . Dos fungos filamentosos (*A. ninger* e *F. oxysporum*) preparou-se uma suspensão de esporos com água estéril e armazenado sobre refrigeração, desta suspensão foi retirado uma alíquota de 1m L e transferidos para tubos de eppendoff, em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, o líquido sobrenadante foi descartado e os esporos depositados no fundo dos tubos foram ressuspensos em solução salina a 0,9 % até concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para posterior obtenção das diluições. Para os testes utilizou-se meio de cultura GPY {20 % de glicose (m/v), 5 % de peptona (m/v), 5 % de extrato de levedura (m/v) e 20 % de Agar (m/v)} esterilizado em autoclave a 121 °C/ 15min e distribuído em placas de petri esterilizadas.

### 2.11. Atividade antifúngica: método disco difusão em Agar

O método consistiu na aplicação de 10 µL da substância avaliada previamente diluída (20mg/mL) em um disco de papel de filtro qualitativo de 5 mm de diâmetro, em seguida o disco é disposto em uma placa de Petri contendo 20mL de meio de cultivo Agar-GPY {2 % glicose (m/v), 0,25 % de peptona (m/v), 0,25 % de extrato de levedura (m/v) e 2 % de Agar (m/v)} e suspensão de conídios na concentração de  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC). Esta placa foi disposto um controle positivo contendo 10 µL de nitrato de miconazol (20mg/mL) e um controle negativo contendo apenas o solvente de dissolução da amostra. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 h e observadas a cada 24 horas o crescimento do fungo. A atividade foi positiva a partir da observação de um halo formado em volta do disco, o halo foi medido com uma régua e comparado ao controle positivo ([Bauer et al., 1966](#)).

### 2.12. Atividade mínima inibitória

A atividade antifúngica dos óleos investigados foi realizada pelo método adaptado de contagem de unidade formadora de colônia (UFC). De cada óleo utilizou-se 20 mg dissolvidos no solvente de extração, a partir desta solução retirou-se 100µL e transferiram-se para as placas de Petri contendo meio de cultura Agar-GPY, os extratos foram dispersos na placa com o auxílio de uma alça de Drigalsky até secagem dos mesmos. Após evaporação do solvente, alíquotas de 100 µL da suspensão de conídios foram semeadas na superfície do meio de cultura com o auxílio da alça de Drigalsky e semeadas em placas que não continham extrato para comparação e controle de crescimento dos fungos. Igualmente placas de eliza contendo o solvente, foram semeadas com a suspensão de conídios para controle negativo. As placas foram incubadas a 28 °C e as leituras de crescimento das colônias foi realizada a cada 24 h. Os testes foram realizados em duplicata e a partir da leitura de crescimento dos micro-organismos (UFC/72 horas) foi calculada a atividade relativa.

### *2.13. Obtenção da Suspensão de Esporos*

Após os fungos terem tomado todo diâmetro da placa de Petri, cerca de 15 dias após o repique (cultura fresca), essas foram abertas em capela de fluxo laminar e 10 ml de água destilada foram adicionados aos meios de culturas contendo os respectivos fungos. Com auxílio de uma alça de Drigalski (previamente flambada), movimentos suaves na superfície do micélio foram realizados para a liberação dos esporos. As suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis para a retirada das hifas remanescentes. O filtrado resultante foi denominado de suspensão padrão de esporos. Para a realização dos ensaios de inibição de crescimento e da germinação de esporos, as suspensões contendo os esporos foram ajustadas para uma concentração de  $2 \times 10^5$  esporos/ml. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60) (Melo et al., 2005).

### *2.14. Ensaio de Inibição do Crescimento Fúngico em Meio Líquido e Determinação da IC50*

Os ensaios de inibição do crescimento foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert et al (1990). Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (estéreis) de 96 poços. Cada poço continha 10 µl de uma suspensão de esporos ( $2 \times 10^5$  esporos/ml) e 90 µl de meio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”). Após 16 h na ausência de luz, a 27 °C, 100 µl dos extratos em diferentes concentrações (concentração final: 0,0; 0,097; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 mg/ ml) foram adicionados. Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento foram o Tween

20 1% e o peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm. O crescimento fúngico foi monitorado através de leituras de absorvância a 620 nm, em intervalos de 12 ou 24 horas, até um total de 48 ou 72 horas, em leitora de microplacas (Thermo Plate, BioTec Instruments). A concentração mínima inibitória (MIC) foi definida com a menor concentração que inibe > 90% do crescimento após 48 h ou 72 horas (Chavan e Tupe, 2014).

A concentração capaz de reduzir em 50 % o crescimento fúngico do controle (Tween 20 1%), após 48 h ou 72 horas de ensaio, foi representada como IC<sub>50</sub>. Os valores finais foram calculados através de método de regressão não linear com os valores do logaritmo das diferentes concentrações *versus* percentual de inibição normalizado usando o Programa GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., California, USA).

Para a análise estatística dos dados, foram realizadas análises de variância simples (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., California, USA).

#### 2. 15. Coleta de solos

As coletas de solos foram realizadas no período de maior e menor precipitação a cada 300 metros das áreas georeferenciadas com três repetições cada (9 amostras/ área) próximo dos indivíduos marcados com profundidades 0-20 e 20-40 m.

#### 2. 16. Determinações da granulometria e fertilidade do solo

A análise granulométrica foi realizada no Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA, no laboratório de solos, a partir do método da pipeta, o qual se baseia na velocidade de deposição das partículas que compõem o solo, o teor de argila foi determinado a partir de uma alíquota de 20 mL da suspensão. A areia total foi separada por tamisação e os teores de silte por diferença em relação ao valor de 100% da amostra original (EMBRAPA, 1997).

Com relação à fertilidade do solo, no laboratório de solos da Embrapa/Amapá foram analisadas as concentrações dos macronutrientes (P, K, Ca, Mg, Al, pH) e no laboratório de solos da Embrapa/ Amazônia Ocidental foi analisadas de micronutrientes (Fe, Mn, Cu e Zn). As extrações de Ca, Mg e Al foram feitas a partir de uma solução extratora de KCl 1 M (Miyazawa et al., 1999), sendo o Ca e Mg determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o Al pelo método de titulação com NaOH (Embrapa, 1999). Os macronutrientes (P

e K) e os micronutrientes (Fe, Zn e Mn) foram extraídos com solução Mehlich 1 (HCl 0,05 M + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125 M), sendo o P determinado pelo método do azul de molibdato e por espectrofotometria ( $\lambda = 660$  nm); K e micronutrientes foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Perkin–Elmer 1100B). Os valores de pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> serão obtidos potenciométricamente, utilizando eletrodo combinado, imerso em solução de solo e água (1 : 2: 5). A leitura foi efetuada após 1 min de agitação individual das amostras e 1 h de repouso da solução (EMBRAPA, 1999).

Para a análise estatística dos dados, foram realizadas análises de agrupamento hierárquico (HCA) e de correspondência canônica (CCA), sendo utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., California, USA).

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização de âmbar resina

*P. altsonii* apresenta resina que exsuda do tronco, e cuja produção é estimulada por injúrias da larva do inseto da família Curculionidae no tronco, onde permanecem na árvore até o estado adulto. Após a perfuração da larva no tronco, os indivíduos de *Protium* exsudam um líquido balsâmico que ao oxidar forma uma resina de coloração branca, transparente, translúcida, de odor almiscarado, denominados popularmente de breu branco. A resina também ocorre de forma natural, através de feridas no tronco da árvore. A produção da resina é maior no período de maior precipitação, apresentando coloração branca com presença da larva, e coloração escura sem a presença da larva, já oxidada.

A resina é insolúvel em água, solúvel em compostos orgânicos, muito heterogênea na sua composição orgânica (Ca, Mg, P, K) com propriedades inflamáveis e que apresenta características químicas de âmbar.

#### 3.2. Caracterização do óleo essencial

O óleo essencial é viscoso, odor forte e almiscarado, de coloração incolor no período de maior precipitação e amarelo claro no período de menor precipitação. Para 50 g de resina, o rendimento por hidrodestilação foi variado, com alto rendimento no período de maior precipitação, com fruto e resina fresca (6,8±8,2 %), e com baixo rendimento no período de menor precipitação, com resina seca (0,5 ±1,2 %). Por ser muito volátil, o tempo de extração foi em torno de 4 horas com rendimento máximo.

### 3.3. Caracterização dos extratos

O extrato hexânico teve uma coloração amarela forte (1,2 g); coloração amarela clara para acetato de etila (1,8 g); amarelo claro para extrato etéreo (1,5 g); amarelo bem claro (0,1 g) extrato clorofórmico com coloração incolor (0,9 g) para metanólico.

### 3.4. Principais componentes do óleo essencial

#### 3.4.1. Perfil quantitativo dos óleos essenciais

Os óleos essenciais da resina de nove amostras de *P. altsonii* conduziram a identificação de 86 compostos químicos, representando 98 - 100 % dos constituintes dos óleos essenciais. Os monoterpenos foram predominantes em todas as amostras, embora o conteúdo de sesquiterpenos em algumas amostras tenha sido em torno de 38,05 %. Além disso, diferenças importantes na variação da composição química e nas quantidades dos constituintes de acordo com o período registrado.

Durante a frutificação, no período de alta precipitação com resina branca molhada, a composição química emitida pelo perfil (PA) foi de 15 substâncias voláteis, onde  $\alpha$  pinene é o composto majoritário (51,99%), seguido por  $\beta$  phellandrene (14,81%),  $\alpha$  phellandrene (13,74%) e  $\beta$  pinene (9,62%), totalizando uma composição majoritária de 93,3% de monoterpenos, e uma composição minoritária de esteroides (2,02%) e fenilpropanoides (0,13%) (Tabela 1). Já no período sem frutificação, com alta precipitação, resina branca, porém seca, a espécie apresenta comportamento químico (PB) com 29 substâncias voláteis, com  $\alpha$  phellandrene (44,41%) como majoritário seguido de *p* cymene (16,43%),  $\beta$  phellandrene (13,87%) e  $\alpha$  pinene (11,87%), além de outros compostos (tabela). Os grupos de monoterpenos são em maioria (95,9 %), seguidos de sesquiterpenos (2,53 %), éster (0,86%) e fenil propanoides (0,38 %) (Tabela 1).

Para o período de menor precipitação com queda foliar e com mistura das resinas, *P. altsonii* emitiu comportamento químico (PC) com 52 substâncias voláteis, com componente majoritária  $\alpha$  pinene (45,28%), e demais compostos *p* cymene (7,18%) e  $\beta$  phellandrene (6,38%). Os monoterpenos (91,6%) em sua maioria, seguidos de sesquiterpenos, (2,38%), fenil propanoides (0,24%) e éster (1,83%). Ainda no período de menor precipitação, sem flor e resina branca, a espécie estudada apresenta perfil químico (PD) com produção de 29 substâncias voláteis, com  $\alpha$  pinene (51,78%) majoritário, seguido de  $\beta$  phellandrene (12,93%) e  $\beta$  pinene (9,37%). Com grupos de monoterpenos (97,79%) em sua maioria, seguidos de éster (3,49%), sesquiterpenos (0,26%), fenil propanoides (0,21%) (Tabela 1).

No perfil PE, com menor precipitação, porém com flor e resina oxidada, a espécie é formada por 27 substâncias voláteis, com *α pinene* (28,93%) majoritário, *benzil benzoate* (25,26%), *camphene* (19,47%) e *β pinene* (5,92%). Os grupos de monoterpenos são em maioria (91,63%), seguidos de éster (25,26%) e fenil propanoides (1,11%) (Tabela 1).

Durante o período de maior precipitação, sem fruto e com mistura de resinas, *P. altsonii* emitiu comportamento químico (PF) com de 27 substâncias voláteis, com *α pinene* (34,17 %) majoritário, seguido de *orto- cymene* (9,49 %), *benzil benzoate* (7,06 %) e *β pinene* (6,83 %). Os monoterpenos são em maioria (64,39%), seguidos de sesquiterpenos (20,37%) e éster (7,06%). Ainda no período de maior precipitação, com fruto e com mistura de resinas, o perfil (PG) apresentou 20 substâncias voláteis, com *α pinene* (37,97 %) majoritário, seguido de *α phellandrene* (25,91%), *orto- cymene* (7,97 %), *benzil benzoate* (4,88 %). Os monoterpenos são em maioria (97,68%), seguidos de éster (4,88%) e sesquiterpenos (1,16 %) (Tabela 1).

Em maior precipitação, sem fruto e com resina oxidada, o perfil (PH) teve comportamento químico com 20 substâncias voláteis, com *benzil benzoate* (37,79 %) majoritário, *α pinene* (16,38 %), *α phellandrene* (8,13 %), *orto- cymene* (4,65 %). Os monoterpenos são em maioria (48,79 %), seguidos de éster (37,79 %) e sesquiterpenos (7,42 %) (Tabela 1).

Para o perfil (PI), com período de menor precipitação, sem flor e resina oxidada, *P. altsonii* emitiu 20 substâncias voláteis, com *α pinene* (27,99 %) majoritário, seguido de *benzil benzoate* (26,77 %), *orto- cymene* (8,11 %) e *camphor* (5,77). Os monoterpenos são em maioria (72,5 %), seguidos de éster (26,27 %) e sesquiterpenos (0,74 %) (Tabela 1).

Na tabela 1, a porcentagem de *α pinene* se manteve sempre alta durante os perfis (PA, PC, PD, PF, PG) emitidos por *P. altsonii*, diminuído muito no perfil PB e PH. Porém, mantendo-se baixo nos perfis PE, e PI ficando abaixo de 30%. Isso se deve ao fato que nesses perfis, a produção de resina branca com larva foi em maior quantidade, já no perfil PB, ocorreu presença de resina branca seca, diminuindo a produção de *α pinene*. Os perfis PE, PH e PI tiveram resina oxidada com presença da cor preta em abundância sem a larva, com produção de *benzil benzoate*, que confere uma substância mais amadeirada.

Em todos os perfis emitidos pela espécie, a quantidade *p cymene* apresenta relação com *α, β pinene* e *α, β phellandrene*, onde essas substâncias apresentam relação direta, ou seja, um aumento de *α, β phellandrene*, ocorre uma diminuição no *p cymene*, ou vice versa. Quanto à presença de *benzil benzoate*, ele está relacionado com a quantidade de *α pinene* na amostra volátil. Quanto maior for à produção de *pinene*, inversamente será a produção de *benzil benzoate* (Tabela 1).

Certas moléculas químicas *pinene*, *phellandrene*, *sabinene*, *cymene*, *terpinene* e *benzil benzoate* dependendo do perfil podem aparecer ou não ou ainda a quantidade pode variar muito. Dependendo do período coletado, certas substâncias antimicrobianas (*pinene*, *camphor*, *thymol*, *carvacrol*, *copaene*, *metil eugenol*, *elemol*, *elimicin*, *benzil benzoate*, *cubebene* e *chamigrene*) podem aparecer e com mudanças na quantidade (Tabela 1).

Na tabela 1 demonstra os principais constituintes químicos encontrados durante as coletas com vários perfis.

**Tabela 1**  
Porcentagens e rendimento dos constituintes químicos de *Protium altsonii* Sandwith.

Constituintes	RT	RI*	PA	P B	PC	PD	PE	PF	PG	PH	PI
$\alpha$ -Thujene	5.31	941	1,58	0,52	1,82	1,74	0,67	0,56	3,36	0,43	0,44
$\alpha$ - Pinene	5.5	946	51,99	11,87	45,28	51,78	28,93	34,17	37,97	16,38	27,99
Camphene	5.95	958	0	0	0	0	19,47	0,84	0,82	0,43	0,95
Benzaldehyde	6.37	969	0	0	0	0	0	0,24	0	0	0
Sabinene	6.54	973	1,46	0,51	0,37	0,87	0,65	0,65	0,7	0	0
$\beta$ - Pinene	6.7	977	9,62	2,72	4,5	9,37	5,92	6,83	4,81	3,59	3,74
$\alpha$ Phellandrene	7.53	999	13,74	44,41	1,02	5,74	0,89	0,68	25,91	8,13	5,4
Dimetil Phenol	7.57	1000	0	0	0	0	0	0	0	0,42	0
2 -Etil Fenol (CAS)	7.63	1001	0	0	0	0	0	0	0,83	0	0
D- 3 Carene	7.63	1008	0	0	0	0	2,29	3,4	0	0	0
O- Cymene	8.13	1014	0	0	0	0	5,32	9,49	7,97	4,65	8,11
D- Limonene	8.28	1018	0	0	0	3,06	3,42	0	0	0	0
p Cymene	8.46	1020	1,54	16,43	7,18	1,19	0	0	0	0	0
Cineole 1,8	8.53	1023	0	0	0	0	1,26	1,82	0,71	2,21	3,64
Limonene	8.69	1024	0	0	1,93	2,43	0	0	0	3,25	1,79
$\beta$ - Phellandrene	8.7	1025	14,81	13,87	6,38	12,93	2,47	2,9	6,84	0	1,74
$\gamma$ - Terpinene	8.3	1054	0,26	0,18	0,78	0,72	0	0	0,48	0	0
Menthadiene- 3,8-p	10.3	1068	0	0	0	0,06	0	0	0	0	0
$\alpha$ -Terpinene	9.78	1071	0	2,82	0,67	0	0	0	0,34	0	0
Terpinolene	10.98	1086	0,2	0,23	1,3	0,37	0	0	0	0	0
p- Cymenene	8.53	1089	0	0	0,2	0	0,45	0	0	0	0
Camphenol , 6	11.98	1113	0	0	0	0	0,77	0	0	0	0
Fenchol endo	12.1	1114	0	0	0,26	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ - Campholenal	12.46	1122	0	0	0,49	0	0	0	0	0	0
trans Pinocarveol	12.99	1129	0	0	0,77	0	0,94	0	0	0	0,75
Camphor	13.28	1134	1,29	0,37	4,32	2,2	5,58	4,46	2	3,24	5,77
Mentha-2-en-1-ol- trans-p	13.04	1136	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0
Terpineol trans dihydro $\alpha$	13.33	1137	0	0	0	0	0,99	0	0	0	0
Verbenol cis	13.07	1139	0	0	0	0	0	0	0	0	0,44
Pinocarvone	14.07	1151	0	0	0,65	0	0,56	0	0	0	0

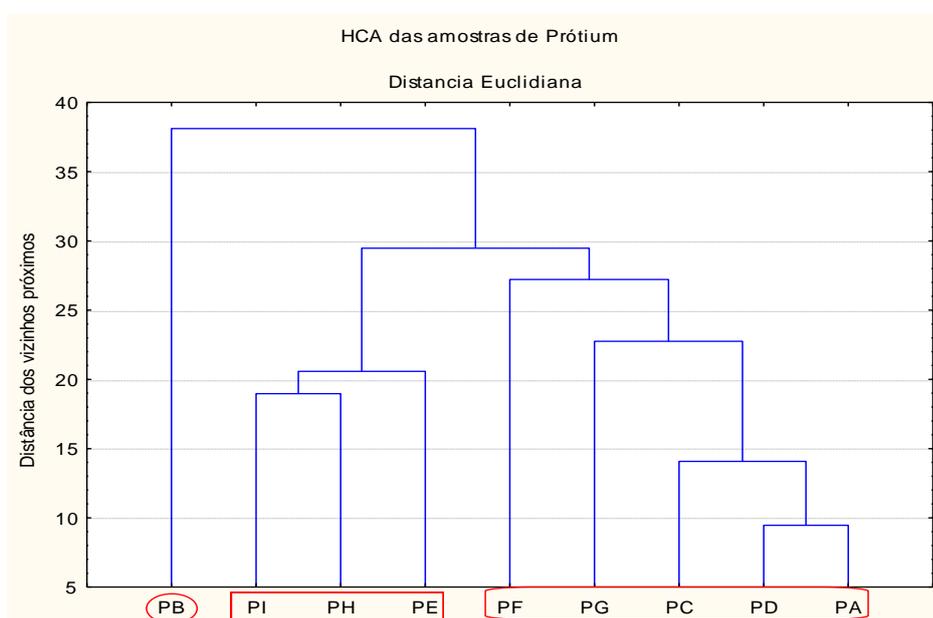
Thujone trans	12.00	1159	0	0	0	0	0	0	0	0,51	0
Thujanol- 3	14.26	1164	0	0	0	0,09	0	0	0	0	0
Borneol	14.29	1165	0,17	0,07	2,97	0,56	1,04	0	2,03	0	3,37
Terpinen-4-ol	14.66	1170	0,37	0,25	3,49	1,92	2,4	0,53	1,14	0,86	1,06
Cymen-8-ol- para	14.91	1178	0	0	0,9	0	1,41	0	0	0,36	0,93
Cryptone	15.07	1183	0	0	0	0,52	0	0,4	0	0	0
$\alpha$ Terpineol	15.21	1186	0,47	0,66	4,31	2,06	5,01	0	0,92	1,43	3,11
Mentha-1(7), 8-dien-2-ol trans-p	15.24	1187	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0
91 (100), 79 (60), 53 (25), 109 (18), 119 (20), 134 (25), 167 mistura	15.09	1195	0	0	0	0	0,46	0	0	0	0
Sabinol trans	15.07	1195	0	0	0	0	0	0	0	0	2,62
$\alpha$ Phellandrene epoxide	15.13	1196	0	0	0	0	0	0,27	0,55	1,53	0
Verbenone	15.97	1202	0	0	1,08	0	0,88	0	0	0	0,65
trans Carveol	16.44	1214	0	0	0,22	0	0,31	0	0	0	0
Thymol, methyl ether	17.19	1232	0	0	0,06	0	0	0	0	0	0
Cumin aldehyde	17.47	1237	0	0	0,25	0	0,35	0	0	0	0
Carvotanacetone	17.72	1244	0	0,13	0	0	0	0	0	0	0
Piperitone	17.95	1249	0	0,08	0,18	0	0	0	0	0	0
Thymol	19.71	1289	0	0,09	0,28	0	0	0	0	0	0
Valencene	28.66	1297	0	0	0	0	0	0	0	1,37	0
Carvacrol	20.14	1298	0	0,04	0,25	0,04	0	0	0,3	0	0
Pinanediol cis- 2,3	21.01	1326	0	0	0	0	0	0,55	0	0	0
Menth-1-en-7-al-3-oxo-para	21.56	1330	0	0	0,03	0,01	0	0	0	0	0
$\alpha$ Cubebene	22.33	1345	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ Ylangene	23.43	1373	0	0	0,22	0,05	0	0	0	0	0
$\alpha$ Copaene	23.49	1374	0	0,4	0,06	0	0	0	0	0	0
Methyl eugenol	24.75	1403	0	0,44	0,04	0,06	0	0	1,16	0	0,74
Caryophyllene (E-)	25.36	1417	0	0,91	0,37	0,03	0	0	0	0	0
trans $\alpha$ Bergamotene	25.99	1432	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ Guaiene	26.2	1437	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ Humulene	26.82	1452	0	0,17	0,06	0	0	0,78	0	0	0
$\beta$ Chamigrene	27.82	1476	0	0,09	0	0	0	0	0	0	0
$\gamma$ Muurolene	27.91	1478	0	0	0,03	0	0	0	0	0	0
$\gamma$ Himachalene	28.05	1481	0	0	0,14	0,05	0	0	0	0	0
$\beta$ Selinene	28.37	1489	0	0	0,08	0,03	0	0	0	0	0
$\alpha$ Selinene	28.74	1498	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0
$\beta$ Bisabolene	29.04	1505	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ Bulnesene	29.2	1509	0	0	0,09	0,04	0	0	0	0	0
$\gamma$ Cadinene	29.35	1513	0	0	0,13	0	0	0	0	0	0
D Cadinene	29.72	1522	0	0,38	0,08	0	0	0	0	0	0
Elemol	30.78	1548	0	0	0,11	0,05	0	0	0	0	0
Elemicin	31.09	1555	0,13	0,38	0	0	1,11	0	0	2,5	0
Tridecen 1AL 2E	31.55	1567	0	0	0	0	0	0	0	4,03	0
Nerolidol E	31.32	1561	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0

$\beta$ Calacorene	31.43	1564	0	0	0,11	0	0	0	0	0	0
Isoeemicin E	31.62	1568	0	0	0,13	0,16	0	0	0	0	0
Caryophyllene oxide	32.16	1582	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
Eudesmol-5-epi-7-epi- $\alpha$	33.17	1607	0	0	0,11	0	0	0	0	0	0
Tetradecanal	33.35	1611	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cadalene	35.8	1675	0	0	0,14	0	0	0	0	3,39	0
Eudesm-7(11)-en-4-ol	36.74	1700	0	0	0,04	0	0		0	0	0
Benzyl benzoate	38.9	1770	2,02	0,86	1,83	3,49	25,26	7,06	4,88	37,79	26,27
Pseudo phytol (6Z, 10Z)	46.93	1988	0	0	0	0	0	19,59	0	0	0

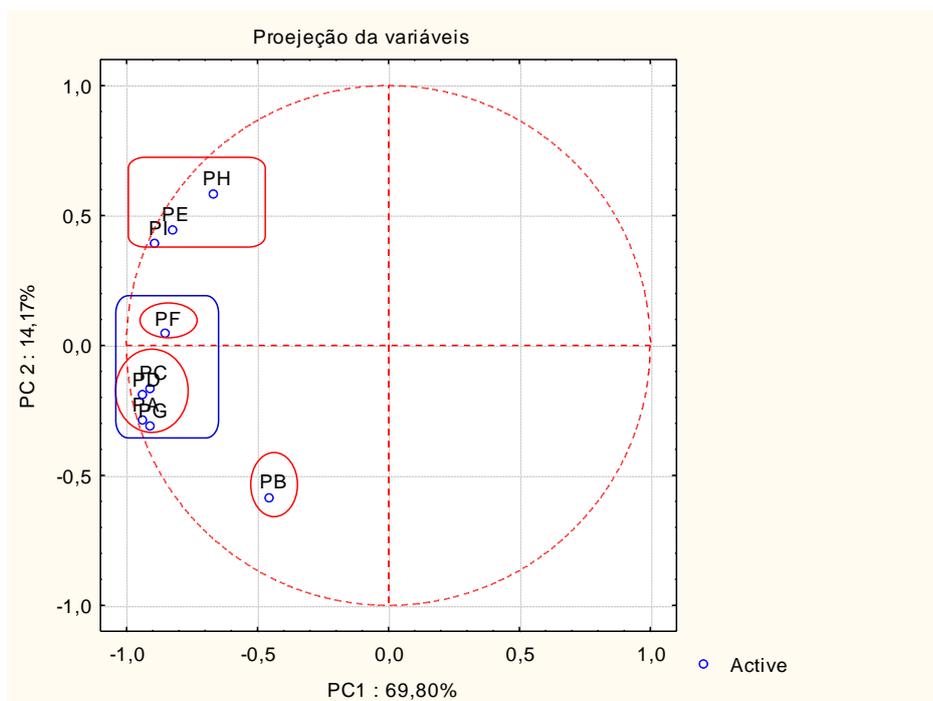
RT- RI- Índice de retenção.

De acordo com a análise de agrupamento hierárquico (HCA) o perfil PA e PG estão no mesmo grupo em função da espécie esta no período de frutificação, entretanto, apresenta um pequeno distanciamento devido ao tipo de resina (PA- resina branca), (PG- resina misturada). Já o perfil PC e PD pertencem ao mesmo grupo e estão próximos, pois a planta esta sem floração e sua resina apresentam características semelhantes, atentando para o fato de que PD apresenta resina branca e PC resina misturada. Neste mesmo sentido, PH e PI estão próximos, porém se diferem de PC e PD compondo grupamento diferente; PH e PI apresentam resina oxidada, mais ressalta- se que PH não apresenta fruto, no período de maior precipitação e PI esta sem floração, no período de menor precipitação (Fig. 1, 2).

Para o perfil PE que se encontra no segundo grupo e forma um cluster com PI e PH caracterizado o grupo das resinas oxidadas. O PF faz parte do primeiro grupamento da resina branca. O PB foi coletado no período sem frutificação, com resina branca, período de maior precipitação. Em função da resina se apresentar com característica seca, ela se diferencia dos demais formando o grupo três (Fig. 1, 2).



**Fig. 1.** Análise de agrupamento hierárquico dos diferentes perfis químicos de *P. altsonii*. PA: ↑ precipitação, + de frutos, resina branca. PB: ↑ precipitação, s/fruto, resina seca. PC: ↓ precipitação, queda foliar, mistura de resinas. PD: ↓ precipitação, s/flor, resina branca. PE: ↓ precipitação, c/flor, resina branca. PF: ↑ precipitação, s/flor, mistura de resinas. PG: ↑ precipitação, + de frutos, mistura de resinas. PH: ↑ precipitação, s/flor, resina oxidada. PI: ↓ precipitação, s/flor, resina oxidada.

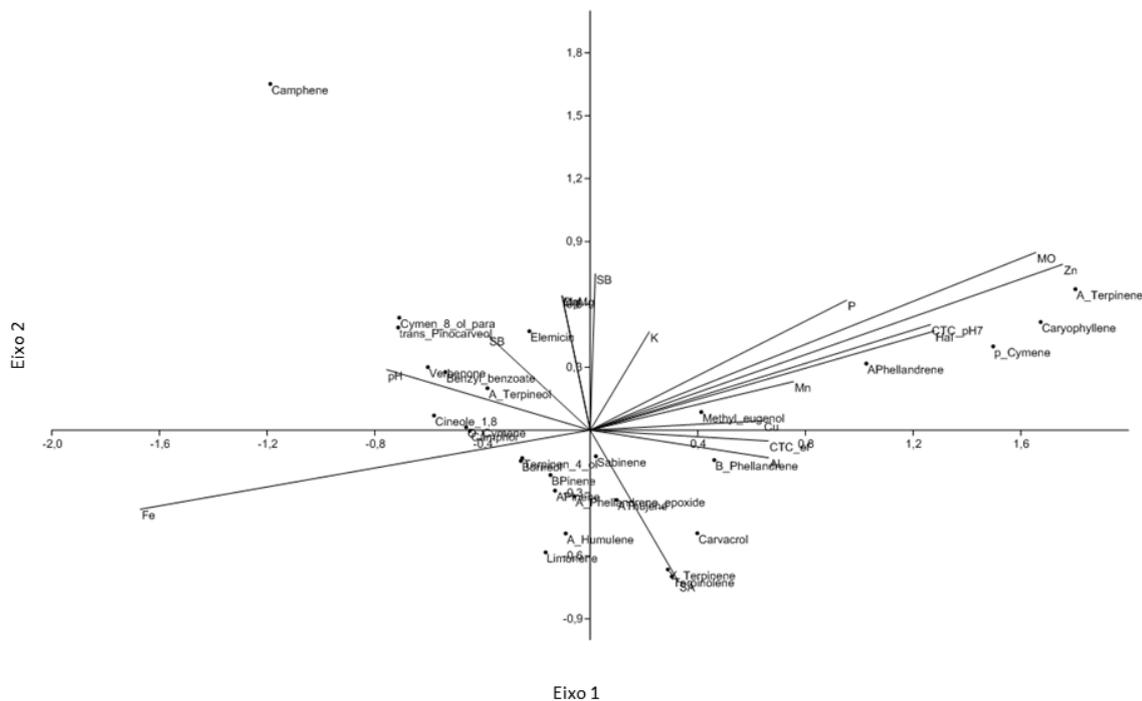


**Fig. 2.** Projeções de variáveis dos diferentes perfis químicos de *P. altsonii*. PA: ↑ precipitação, + de frutos, resina branca. PB: ↑ precipitação, s/fruto, resina seca. PC: ↓ precipitação, queda foliar, mistura de resinas. PD: ↓ precipitação, s/flor, resina branca. PE: ↓ precipitação, c/flor, resina branca. PF: ↑ precipitação, s/flor, mistura de resinas. PG: ↑ precipitação, + de frutos, mistura de resinas. PH: ↑ precipitação, s/flor, resina oxidada. PI: ↓ precipitação, s/flor, resina oxidada. PC1: 69,80 %; PC2: 14,1 %.

Os resultados da análise de correspondência canônica (CCA), entre os perfis químicos dos óleos essenciais e macro e micronutrientes dos solos, o eixo 1 explicou 47,56 % e o eixo 2, 29,44 % totalizando 68,00 % da variância acumulada. Estes resultados sugerem uma forte associação entre a composição química dos óleos essenciais com o parâmetro físico-químicos do solo para alguns compostos químicos (Fig. 3).

O eixo CCA 1 apresenta uma relação positiva dos nutrientes do solo MO e Zn com *metil eugenol*, *α pllelandrene*, *p cymene*, *caryophyllene* e *α terpinene*. Ainda no eixo CCA 1 o Fe apresentou uma relação negativa com os demais compostos. Por outro lado, os parâmetros pH, SB, CaMg e Mg do eixo 2 correlacionaram-se positiva com *camphene*, *cymenol p 8*, *trans pinocarveol*, *elemicin*, *benzil benzoate*, *verbenone* e *α terpinol* (Fig. 3).

## Análise de correspondência canônica (CCA)



**Fig. 3.** Ordenação dos dois primeiros eixos do CCA mostrando a distribuição dos macro e micronutrientes do solo e os constituintes químicos do óleo essencial dos 9 perfis coletados. O eixo 1 representa 47,56 % da relação óleo e nutrientes do solo. Eixo 2: 29,44 %.

### 3.4.2. Perfil qualitativo

Através do perfil CCDA, os extratos brutos obtidos por percolação dos solventes descritos e óleo essencial de *P. altsonni* foram investigados quanto à presença de possíveis classes de compostos químicos, sendo observada a presença de diversos tipos de metabólitos secundários de acordo com as colorações estabelecidas (Tabela 2). Todas as amostras de óleo essencial apresentaram os mesmos padrões de localização de compostos metabólicos durante a triagem fitoquímica.

Através da prospecção fitoquímica foi possível indicar a presença de alguns compostos nos extratos, segundo o revelador específico para cada classe. Os compostos fenólicos foram observados nos extratos hexânicos e metanólicos; os terpenos foram revelados em solução hexânica, éterea e metanólica. Para cumarina foram observados nos extratos hexânico e de acetato de etila; as antronas somente em solução metanólica. Já para alcaloides foi revelado em extratos hexânicos, étereo e metanólico (Tabela 2), (Fig. 3).

Para a coluna foi indicado à presença de terpenos nos extratos hexânico, hex/éter (8:2), hex/éter (1:1), éter e clorofórmio. Para cumarina foram revelados nos extratos hexânico, hex/éter (8:2). As antronas foram encontradas somente no extrato clorofórmio. E para os alcaloides foi observado nos extratos hexânico, hex/éter (1:1), éter e clorofórmio (Tabela 3), (Fig. 4).

**Tabela 2**  
Detecção das classes metabólicas e triagem fitoquímica dos extratos de *P. altsonii*

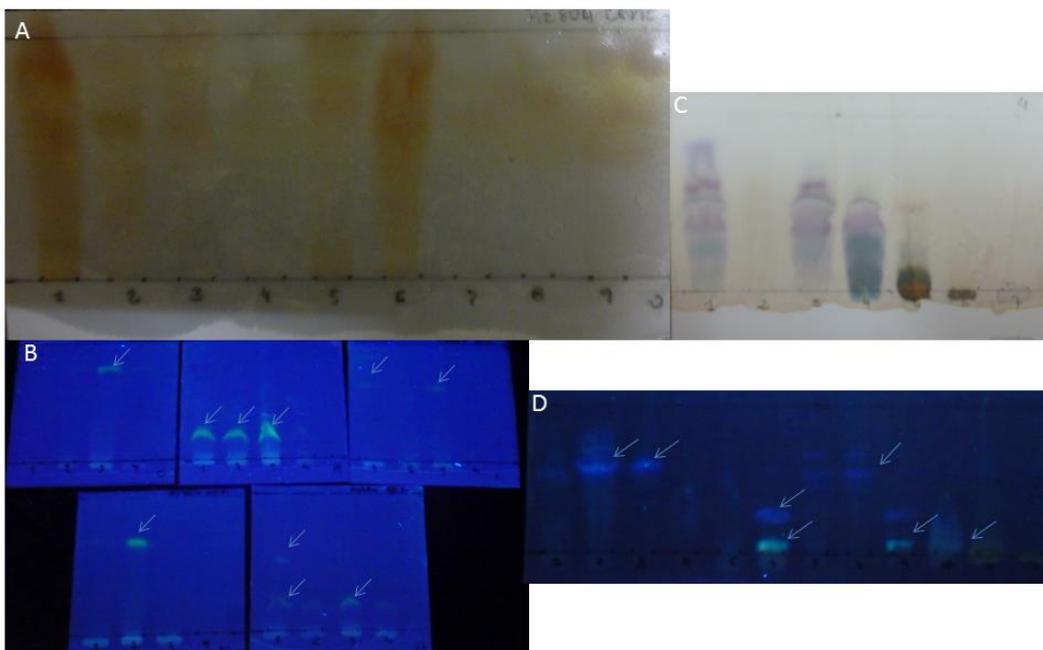
Classes de substancia	Extrato Hexânico	Extrato Acetato de etila	Extrato Etéreo	Extrato Clorofórmico	Extrato metanólico
Compostos fenólicos	+	-	-	-	+
Terpenos	+	+	+	+	+
Cumarina	+	+	+	-	-
Antronas	-	-	-	-	+
Antraquinona	-	-	-	-	-
Alcaloide	+	-	+	+	+
Taninos	-	-	-	-	-

Os sinais (+) (-) indicam presença ou ausência da classe de compostos.

**Tabela 3**  
Triagem fitoquímica das frações obtidas na coluna de *P. altsonni*

Classes de compostos	Extrato Hexânico	Extrato Hex/éter (8:2)	Extrato Hex/éter (1:1)	Extrato éter	Extrato clorofórmio
Terpenos	+	+	+	+	+
Cumarina	+	+	-	-	-
Antronas	-	-	-	-	+
Antraquinona	-	-	-	-	-
Alcaloide	+	-	+	+	+

Os sinais (+) (-) indicam presença ou ausência da classe de compostos.



**Fig. 4.** Cromatografia em camada delgada em alta resolução dos extratos de *P. altsonii*. A) Placa revelada com ácido sulfúrico concentrado para visualizar a presença de constituintes de óleos essenciais característica de cor amarela e vermelha em todos os perfis químicos. B) Placa visualizada em 365nm, após revelação com ácido sulfúrico 10% em etanol para detecção de alcalóides. As manchas amarelo fluorescente indicam a presença de alcaloides. C) Presença de diferentes compostos químicos. D) Após revelação com KOH. As manchas fluorescentes intensas caracterizam a possibilidade da presença das classes de cumarinas.

As substâncias encontradas (cumarina, alcaloides, terpenos) sofrem uma variação muito grande de quantidade, dependendo do período de coleta. Através da triagem fitoquímica, as cumarinas são mais abundantes no período de alta precipitação. Enquanto, que os alcaloides estão presentes mais no período de baixa precipitação. Os terpenos são abundantes sempre.

### 3.4.3. Obtenção dos óleos e avaliação do efeito fungitóxico

As composições químicas voláteis do óleo resina foram analisadas por cromatografia gasosas acopladas a espectrometria de massas (CG-EM), nas quais se observou a presença de 86 constituintes no óleo resina, ressaltando-se variações modestas nas concentrações de poucos constituintes, e variações para o *α* pinene e benzyl bezoante dependendo do tipo de resina.

A composição e quantidade de cada uma destas substâncias variam de acordo com o período de colheita das amostras de *P. altsonii*. Esta característica, que compreende diferentes

quantidades de agentes antimicrobianos na composição do óleo em diferentes períodos do ano, pode ser o fator principal para selecionar um óleo com potencial ação fungitóxica.

A avaliação do efeito fungitóxico foi aplicada às amostras dos óleos resina de *P. altsonii* e se observou que os perfis dos óleos (PA A), (PA B) e (PA E) apresentaram as melhores atividades fungitóxicas frente aos fungos filamentosos *A. ninger* e *F. oxysporum* com formação de halos de inibição acima de 1,0 cm, alguns correspondendo a quase 50% de atividade a mais que o controle positivo (nitrato de miconazol). Estes resultados também foram observados nos óleos (PA F), (PA H) e (PA I), pois estes apresentaram halos de inibição que variaram entre 0,1 a 1,0 cm para ambos os microrganismos.

A investigação de inibição da levedura *C. albicans* evidenciou a formação de halos acima de 1,0 cm para as amostras de óleos PA A, PA B, PA C, PA D, PA E, PA F e PA H, porém todos apresentando atividade fungistática, já que houve o avanço de células sobre a zona inibida, porém com colônias menores e em menor quantidade quando comparadas às colônias crescidas em toda a área da placa.

**Tabela 4**

Resultados obtidos em testes preliminares por disco-difusão nos óleos brutos de *P. altsonii*. PA: ↑ precipitação, + de frutos, resina branca. PB: ↑ precipitação, s/fruto, resina seca. PC: ↓ precipitação, queda foliar, mistura de resinas. PD: ↓ precipitação, s/flor, resina branca. PE: ↓ precipitação, c/flor, resina branca. PF: ↑ precipitação, s/flor, mistura de resinas. PG: ↑ precipitação, + de frutos, mistura de resinas. PH: ↑ precipitação, s/flor, resina oxidada. PI: ↓ precipitação, s/flor, resina oxidada.

Amostras	Halo de inibição em cm		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. ninger</i>	<i>F. oxysporum</i>
Óleo bruto PA A	+++	+++	+++
Óleo bruto PA B	++	+++	+++
Óleo bruto PA C	++	-	-
Óleo bruto PA D	+++	+	-
Óleo bruto PA E	+++	+++	-
Óleo bruto PA F	++	+	++
Óleo bruto PA G	-	-	++
Óleo bruto PA H	++	++	++
Óleo bruto PA I	-	+	++
Controle positivo	+++	+++	+++
Controle negativo	-	-	-

\*Controle positivo utilizado nitrato de miconazol; controle negativo hexano, - (sem atividade), + (halo 0,1 a 0,5cm); ++ (halo 0,5 a 1,0cm); +++ (acima de 1,0cm).

Todos os perfis dos óleos de *P. altsonii* foram muito eficientes para inibir o crescimento do fungo *P. chrysogenum*. Além disto, os perfis dos óleos PA E e PA A tiveram eficiência para *A. flavus* e *F. oxysporum*, enquanto, que os outros perfis não apresentaram uma inibição (Tabela 2). Entre os perfis de óleo, o PA D, PA C e PA H apresentaram efeito inibitório distintos frente as três espécies de fungos (Tabela 3).

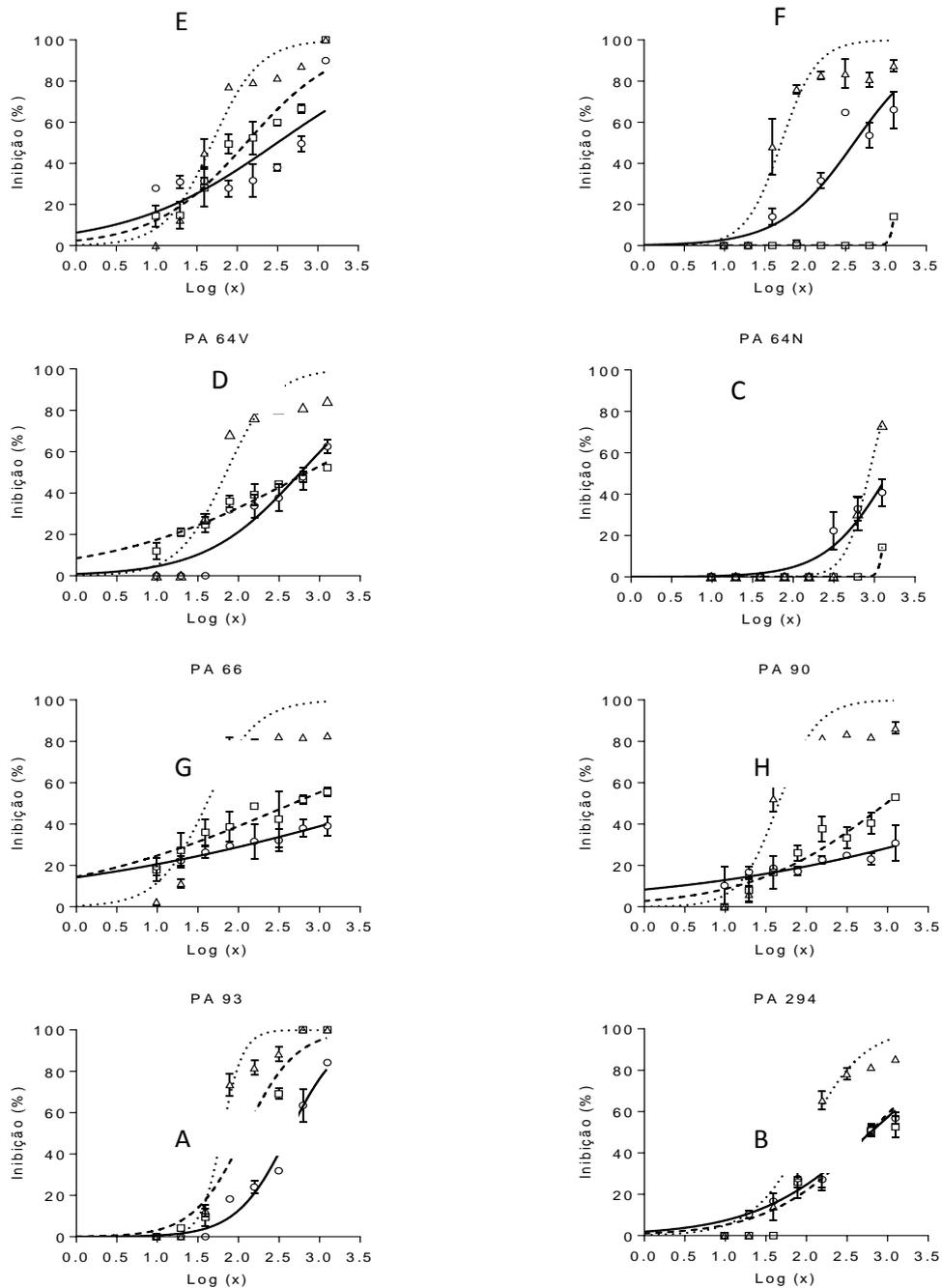
**Tabela 5**

Efeito inibitório dos óleos de *P. altsonii* (12,5 mg/ml) sobre o crescimento fungos fitopatógenos.

Perfil óleo	Inibição do crescimento fúngico (%)		
	<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. oxysporum</i>
PA E	99,95 ± 0,08 <sup>aA</sup>	89,94 ± 0,64 <sup>aB</sup>	99,78 ± 0,37 <sup>aA</sup>
PA F	87,50 ± 2,87 <sup>bA</sup>	66,05 ± 8,87 <sup>bA</sup>	17,42 ± 5,10 <sup>bB</sup>
PA D	84,47 ± 0,37 <sup>bdA</sup>	62,52 ± 3,16 <sup>bB</sup>	52,25 ± 0,95 <sup>cC</sup>
PA C	73,33 ± 0,44 <sup>cA</sup>	40,78 ± 6,55 <sup>cB</sup>	14,31 ± 0,89 <sup>bC</sup>
PA G	82,69 ± 1,35 <sup>dA</sup>	39,06 ± 4,64 <sup>cB</sup>	55,50 ± 2,31 <sup>cB</sup>
PA H	86,34 ± 2,80 <sup>bdA</sup>	30,76 ± 8,51 <sup>cB</sup>	52,93 ± 1,37 <sup>cC</sup>
PA A	99,92 ± 0,13 <sup>aA</sup>	84,21 ± 1,02 <sup>aB</sup>	99,41 ± 1,01 <sup>aA</sup>
PA B	85,42 ± 1,24 <sup>bdA</sup>	56,76 ± 2,89 <sup>bB</sup>	52,66 ± 5,26 <sup>cB</sup>

Os valores de médias seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

No gráfico abaixo (Fig. 5), está demonstrado que para *P. chrysogenum* o efeito inibitório de todos os óleos investigados acontece em nas concentrações acima de 0,39 mg/mL para ação inibitória acima de 50%. Enquanto, que para as outras espécies de fungos, esse efeito é significativo em alguns perfis (Fig. 5).



**Fig. 5.** Efeito inibitório dos óleos de *P. altsonii* em nove concentrações (0,0; 0,097; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 mg/ml) sobre o crescimento vegetativo de fungos *Penicillium chrysogenum* ( $\cdot\Delta\cdot$ ), *Aspergillus flavus* ( $\text{---}\bigcirc\text{---}$ ) e *Fusarium oxysporium* ( $\text{---}\square\text{---}$ ). As curvas de inibição foram expressas através de regressão não linear dos valores do logaritmo das diferentes concentrações *versus* percentual de inibição normalizado usando o Programa GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., California, USA).

**Tabela 6**

Valores de MIC e IC<sub>50</sub> em mg/ml dos extratos de *P. altsonii* sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos. (OBS: no ic50 entre parêntese é o intervalo de confiança a 95 % pelo teste de tukey).

Óleo	Atividade antifúngica					
	<i>P. chrysogenum</i>		<i>A. flavus</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	MIC	IC <sub>50</sub>	MIC	IC <sub>50</sub>	MIC	IC <sub>50</sub>
PA PE	12,5	0,48 (0,48 - 0,48)	12,5	3,13 (1,71 – 5,74)	12,5	1,29 (0,98 – 1,17)
PA PF	>12,5	0,50 (0,39 - 0,64)	>12,5	4,03 (2,92 – 5,55)	Ne*	Ne
PA PD	>12,5	0,70 (0,56 - 0,88)	>12,5	5,84 (4,31 – 7,91)	>12,5	7,13 (5,12 – 9,93)
PA PC	>12,5	8,62 (8,21- 9,04)	>12,5	15 (11,55 – 19,71)	Ne	Ne
PA PG	>12,5	0,40 (0,30 - 0,54)	>12,5	10,08 (2,82 - 35,98)	>12,5	4,76 (2,64 – 8,50)
PA PH	>12,5	0,45 (0,36 - 0,56)	>12,5	7,378 (6,92 - 7,869)	>12,5	9,59 (6,29 – 14,62)
PA PA	6,25	0,62 (0,56 - 0,69)	>12,5	4,18 (3,70 – 4,73)	6,25	1,18 (0,99 – 1,41)
PA PB	>12,5	1,03 (0,84 – 1,28)	>12,5	6,19 (4,76 – 8,04)	>12,5	6,03 (4,11 – 8,84)

Ne\* Não efetivo. MIC: Concentração inibitória mínima; IC<sub>50</sub>: concentração que inibe em 50% o crescimento fúngico.

A avaliação fungitóxica, por disco difusão, quando realizada nos extratos do óleo de *P. altsonii* apresentaram halos de inibição evidenciando a atividade fungistática. As frações 3, 8 e 9 foram as que apresentaram melhor resposta frente aos fungos filamentosos *A. ninger* e *F. oxysporum*, evidenciando halos com diâmetro acima de 1,0 cm.

Para a *C. albicans* as frações 4, 6, 7, 8 e 10 apresentaram halos de inibição que variaram de 0,1 a 0,5 cm, cerca de 35% menor que o halo formado com o controle positivo. As demais frações (1, 2, 3, 5 e 9) apresentaram atividade fungistática.

**Tabela 7**

Resultados obtidos em testes por disco-difusão nas frações do óleo de *P. altsonii*.

Amostras	Halo de inibição em cm		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. ninger</i>	<i>F. oxysporum</i>
1. Fração Hexano ch	f	++	++
2. Fração Hex +éter (8:2)	f	+	f

3.Fração Hex +éter (1:1)	f	+++	++
4.Fração éter	+	F	f
5.Fração acetato de etila	f	+	f
6.Fração clorofórmio	+	++	++
7.Fração Hexano s	+	+	++
8.Fração Hex +éter (8:2)	+	+++	+++
9.Fração Hex +éter (1:1)	f	+++	f
10.Fração éter	+	F	++
11.Fração clorofórmio	-	-	-
12.Fração acetato de etila	-	-	-
Controle positivo	+++	+++	+++

\*Controle positivo (nitrato de miconazol); controle negativo (solvente), - (sem atividade), + (halo 0,1 a 0,5cm); ++ (halo 0,6 a 1,0cm); +++ (acima de 1,0cm), f (apresentou halo com atividade fungistática).

As frações, após teste qualitativo, foram submetidas ao teste de atividade mínima inibitória e observou-se que a fração 8 (*Fração Hex +éter (8:2)*) foi a que apresentou melhor atividade frente aos fungos filamentosos, apresentando inibição de 70,10% para o fungo *A. ninger* enquanto que o controle positivo nitrato de miconazol apresentou atividade de 75,30% e 78,43% para o fungo *F. oxysporum* enquanto que o controle positivo apresentou atividade de 69,98% para o *F. oxysporum*.

O resultado de inibição para os fungos filamentosos *A. ninger* e *F. oxysporum*, foi para a fração 3 (*Hex +éter (1:1)*), que apresentou atividade de 72,45% e 65,70%, respectivamente. A fração 9 (*Hex +éter (1:1)*) também apresentou resultado satisfatório com uma atividade inibitória de 75,52%, apenas para o fungo *A. ninger*. Os testes de inibição não foram realizados com as leveduras por apresentarem atividade fungistática.

**Tabela 8**

Atividade mínima inibitória das frações do óleo de *P. altsonii*.

Amostras	Atividade mínima inibitória em %		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. ninger</i>	<i>F. oxysporum</i>
1. Fração Hexano ch	N	59,76±8,49	54,76±0,71
2.Fração Hex +éter (8:2)	N	10,89±1,41	8,09±4,24

3.Fração Hex +éter (1:1)	N	72,45±2,12	65,70±0,71
4.Fração éter	N	15,07±4,95	11,40±0,71
5.Fração acetato de etila	N	19,25±1,41	9,41±2,83
6.Fração clorofórmio	N	65,03±5,66	42,55±3,33
7.Fração Hexano s	N	21,97±0,71	43,08±4,24
8.Fração Hex +éter (8:2)	N	70,10±0,71	78,43±0,71
9.Fração Hex +éter (1:1)	N	75,52±0,71	10,23±2,83
10.Fração éter	N	7,45±3,54	50,77±4,95
11.Fração clorofórmio	N	75,30±0,71	69,98±0,71
12.Fração acetato de etila	N	7,45±0,00	10,54±3,54
Controle positivo	N	5,33±4,95	7,45±4,95

---

\*Controle positivo (nitrato de miconazol); n - atividade não realizada.

#### 4. Discussão

Os óleos essenciais constituem uma grande variedade de substâncias, como hidrocarbonetos terpenicos, álcoois simples e terpenicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre (Simões et al., 2005; Rudiger e Veiga Júnior, 2013). Com destaque para os terpenóides pela grande variedade estrutural. Esses óleos são produzidos em vários sítios no interior da célula e são armazenados primariamente dentro de vacúolos ou estrutura especializadas (Taiz e Zeiger, 2004). Em *P. altsonii* presença de canais intercelulares simples secretando óleo em abundância foram registrados. São sintetizados em uma parte da planta e armazenados em outra. Além disso, sua concentração na planta varia de acordo com o ciclo circadiano (24h) e sazonal, e entre outros fatores abióticos (Machado et al, 2003).

Análise química das espécies de *Protium* tem revelado uma fonte segura de compostos químicos (Maia et al., 2000; Susunaga et al., 2001; Bandeira et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Lima et al., 2005; Magalhães et al., 2006; Rudiger e Veiga Júnior, 2013; Carvalho et al., 2015). Porém, a identificação correta das espécies em campo é essencial para determinação dos componentes químicos existentes nos óleos essenciais e sua aplicação na indústria. Em *P.*

*altsonii* foram identificados terpenos em abundancia, fenilpropanoides presentes no óleo essencial e cumarinas, alcaloídes no fixo.

A presença de substâncias químicas em uma determinada espécie pode estar atrelada à sazonalidade, variando em resposta a fatores bióticos e abióticos, principalmente, aqueles ligados ao clima que podem influenciar na qualidade e quantidade do óleo essencial (Simões et al, 2000; Machado et al., 2003). Alterações nos fatores abióticos podem também afetar os processos fisiológicos e metabólicos das plantas, com destaque para o crescimento celular, síntese de proteínas, transporte de fotoassimilados, transporte de nutrientes e desempenho fotossintético, limitando o crescimento e o acúmulo de biomassa (Graciano et al., 2006; Yokota et al., 2006).

O óleo essencial da resina de *Protium* apresenta certa variação nos seus componentes majoritários, diferenças na concentração e presença ou ausência de cada constituinte entre as diferentes espécies (Machado et al., 2003; Pontes et al., 2007; Marques et al., 2010). A mesma espécie pode sofrer variação em seus componentes químicos, isso pode estar associado ao armazenamento durante a coleta, época do ano, idades e locais distintos, além do processo de extração, isso ocorreu com *P. altsonii*.

A variação sazonal exerce uma influencia direta sobre a vegetação, assim como uma influencia indireta, via solo. As informações obtidas dos diversos estudos fitoquímicos realizados sugerem que a biossíntese e o acúmulo de metabólitos secundários é suscetível à variação sazonal, geográfica e talvez até circadiana (Taiz e Zeiger, 2004). Em geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contém maior quantidade de princípios ativos no seu tecido, podendo esta variação ocorre tanto no período de um dia, como em épocas do ano (Simões et al., 1999; Nunes et al., 2009). Para *P. altsonii* ocorre diferenças na quantidade de substancias que são produzidas durante o período de sazonalidade.

Do ponto de vista de fertilidade, solos argilosos, em especial com as maiores quantidades de matéria orgânica são desejados, já que esses solos apresentam valores de capacidade de troca catiônica elevada e, com isso, maiores quantidade de cátions podendo ser armazenadas e posterior, cedidas aos vegetais através de reações de troca de íons. No entanto, como observado neste trabalho, a dinâmica de produção de metabólitos secundários pela planta é resultado de uma combinação complexa de fatores abióticos s e bióticos. Existe uma associação entre a composição química dos óleos essenciais com as substancias do solo em *P. altsonii*.

Grandes variações para o rendimento de óleo resina são comuns, em grande parte, dependente do tempo de exposição ao ar antes e depois coleta (envelhecimento da resina),

condições climáticas e outros fatores (Siani et al., 1999a). Para *P. altsonii* ocorre essa variação no rendimento e coloração quanto ao período sazonal.

*P. icicariba* (DC.) March., *P. heptaphyllum* (Aubl.) March. subsp. *ulei* (Swat) Daly e *P. heptaphyllum* (Aubl.) March. subsp. *heptaphyllum* apresentam predominantemente monoterpenos no óleo essencial da resina (Marques et al., 2010), semelhante ao encontrado no perfil de *P. altsonii*. Porém, para óleo essencial da resina de *P. decandrum* (Aubl.) March. não foi encontrado monoterpenos somente sesquiterpenos (Lima et al., 2006).

A indicação de certas classes de compostos encontrados em *P. altsonii* está de acordo com os registrados por outras espécies de *Protium* (Susunaga 1996; Siani et al., 1999; Maia et al., 2000; Bandeira et al., 2001; Bandeira et al., 2002; Pontes et al., 2010). Os metabolitos secundários são responsáveis pela coloração e odor de flores e frutos, além de atuar na defesa vegetal. Podem apresentar diferentes classes de compostos como isoprenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados como os alcalóides. São produzidos em rotas biossintéticas provenientes de processos vitais como a fotossíntese e a cadeia respiratória (Castro et al. 2004).

Dependendo da classe de compostos fenólicos como flavonoides, polifenóis podem apresentar atividades antioxidantes, antiinflamatória (Padilla et al., 2008). A cumarina é um composto que registra diversas atividades biológicas e que podem ser usadas como aromatizantes, na fixação de perfume, como antioxidantes, vasodilatadora, anticoagulante e relaxante vascular. Os alcalóides são compostos derivados das aminas e são importantes para as plantas, pois ajudam no mecanismo de defesa contra insetos e animais, auxiliam na proteção contra os raios ultravioletas. Além da produção de diversos medicamentos (Castro et al., 2004). A presença de cumarina em *P. altsonii* sugere que essa substância podem ser usada como fixador na produção de perfumes e os alcalóides podem ser usados como anti inflamatório, cicatrizante (Maia et al., 2000; Padilla et al., 2008). Em *P. altsonii* a cumarina e o alcalóide variam na quantidade que é produzida durante o período de precipitação e pelo tipo de resina que é produzida.

Os constituintes químicos isolados ou em conjuntos podem apresentar atividades biológicas. A presença de alguns terpenos encontrados em *P. altsonii* (sabinene, terpinene, cymene, borneol, pinene, pinocarveol, benzyl benzoato, phellandrene) pode indicar aroma para produção de fragrâncias. Enquanto que o terpeno camphor indica repelência ou atividade antimicrobiana bem como carvacrol. O composto methyl eugenol pode indicar atividade antisséptica e o sesquiterpeno caryophyllene pode estar relacionado com atividade anti-inflamatória, enquanto que o composto thymol, carvacrol pode agir com atividade

antifúngica. Todas essas atividades biológicas já foram registradas em algumas espécies de *Protium* (Susunaga 1996; Siani et al., 1999; Maia et al., 2000; Bandeira et al., 2002; Pontes et al., 2010).

Fazem parte da composição deste óleo essencial substâncias químicas já conhecidas na literatura e que apresentam potencial antimicrobiano, entre estas estão o *pinene*, *camphor*, *thymol*, *carvacrol*, *copaene*, *metil eugenol*, *elemol*, *elimicin*, *benzyl benzoate*, *cubebene* e *chamigrene* (Cavaleiro et al., 2006; Fenner et al., 2006). O interesse neste tipo de substâncias como alguns terpenos e fenil-propanoides por estes apresentam atividades antifúngicas (Giordano et al, 2015; Maia et al., 2015).

Nas frações de *P. altsonii* encontram-se as substâncias já conhecidas na literatura por apresentarem potencial de uso como antimicrobiano bem demonstrado por outros autores na literatura (Souza et al., 2004; Mendes et al., 2001; Giordano et al, 2015).

Os óleos essenciais possuem algum grau de atividade antimicrobiana atribuída à composição química presentes em seus compostos fenólicos, monoterpenos e terpenóides (Giordano et al., 2015). O mecanismo de ação dos monoterpenos envolve, principalmente, efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular (Giordano et al., 2015).

Em *P. bahianum* foi realizado análise química da resina fresca e envelhecida, onde o óleo da resina envelhecida apresenta em sua constituição majoritária sequiterpenos, enquanto que o óleo da resina fresca preferencialmente monoterpenos. Esses óleos tiveram a atividade antiacaricida avaliada e apenas a resina envelhecida teve indução à repelência contra *Tetranychus urticae* (Pontes et al., 2007). Em *P. altsonii* essa variação no tipo de resina ocorre também.

Em terpenos, tanto a quantidade como a diversidade de compostos parecem aumentar a eficiência de defesa como uma mistura de diversos compostos fornece uma proteção mais eficaz contra uma ampla gama de herbívoros e limita as chances de que um inimigo evolui resistência (Maia et al., 2015).

A teoria prevê que os compostos de plantas defensivas devem ser alocados diferencialmente entre os tecidos de acordo com o valor do tecido, o seu custo de construção e a pressão herbívora. Não é, no entanto, um custo de manutenção de um conjunto diverso de compostos orgânicos voláteis. A biossíntese de terpenos é especialmente voláteis caros, devido a uma alta demanda de ATP (trifosfato de adenosina) e NADPH e a necessidade de enzimas altamente específicas (terpeno-sintases) que sejam originais para estas vias biossintéticas. De um ponto de vista bioquímico, a produção de uma diversificada conjunto de compostos orgânicos voláteis em um determinado tecido vegetal, portanto, indica um

investimento significativo de recursos para as vias bioquímicas levando a que estes compostos (Castro et al., 2004).

## 5. Conclusão

A investigação das classes metabólicas mostrou a presença de cumarinas, alcaloídes, terpenos, fenil propanoides ressaltando assim o perfil metabólico presente nas resinas estudadas. Deste modo a triagem fioquímica se torna uma importante ferramenta para o direcionamento, isolamento e identificação de classes de metabólitos secundários, uma vez que não existem relatos na literatura sobre *P. altsonii*.

A presença, ausência ou a quantidade de um determinado composto químico deve estar associada a diversos fatores ambientais. Em *P. altsonii* a quantidade de uma determinada substância esta relacionada com o período da sazonalidade e tipo de resina.

Existe uma forte associação entre a composição química dos óleos essenciais com o parâmetro físico- químico do solo para alguns compostos.

Há muitos relatos na literatura sobre as propriedades antimicrobiana, antisséptica e antifúngica de óleos essenciais contendo grande porcentagem de constituintes monoterpênicos. Dentro deste contexto este trabalho apresenta grande potencial para utilização biológica desse óleo.

Os resultados mostrados aqui neste trabalho, e que *P. altsonii* (Breu Branco) tem um potencial fonte de agentes antifúngicos, devido à presença de compostos que tem atividade para estes fins. Contudo, os resultados mostram que o período de coleta é extremamente importante para a identificação de certos compostos essenciais com interesse na atividade fungicida. Os resultados deste estudo permitiram mostrar também que a resina tornando-se uma alternativa para sustentabilidade da espécie e que seu uso medicinal pode está atrelado à sazonalidade e período discreto ou não contínuo.

## Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Capes e a Fundação do Amapá-FAPEAP pelo auxílio financeiro ao primeiro autor. A Universidade Federal do Pará por toda ajuda na parte fitoquímica- LabiSisBio; ao Dr. Douglas Daly do New York Botanical Garden, USA pela identificação das espécies; ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA pelo apoio logístico e ao Instituto Nacional de

Pesquisas da Amazônia- INPA pela oportunidade de desenvolver o trabalho de doutorado; a SEMA pela autorização de coleta na RDS do Rio Iratapuru e a Comunidade de São Francisco pelo suporte em campo.

## Referências

- ADAMS, R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy. 4<sup>th</sup>, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 804 pp. 2007.
- ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JÚNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. A possible mechanism for antiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta- amyryn from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85 (4), 827-834, 2006.
- BANDEIRA, P. N.; MACHADO, M. I. L.; CAVALCANTI, F. S.; LEMOS, T. L. G. Essential Oil Composition of Leaves, Fruits and Resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl. ) March. **Journal of Essential Oil Ressearch**, v. 13, p. 33-34, 2001.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v.25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v.25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.N.; SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.
- BROEKAERT, W. F., TERRAS, F. R. G., CAMMUE, B. P. A. AND OSBORN, R. W. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108, 1353-1358. 1990.
- CARVALHO, K. M. M. B.; FILHO, J. D. B. M.; MELO, T. S.; ARAÚJO, A. J.; QUETZ, J. S.; CUNHA, M. P. S. S.; MELO, K. M.; SILVA, A. A. C. A.; TOMÉ, A. R.; HAVT, A.; FONSECA, S. G. C.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice: Scientific Evidence and Potential Mechanisms. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2015, Article ID 106157, 13 pages.
- CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O; BARBOSA, L.C.; FERREIRA, F.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. *Química nova*; 27(1): 55-57. 2004.

- CAVALEIRO, C.E., PINTO, M.J, GONC, A., SALGUEIRO, L. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains. J Appl Microbiol., 100:1333- 1338, 2006.
- CHAVAN, P.S; TUPE, S.G. Antifungal activituy and mechanism of action of carvareol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. Food Control 46, 115-120. 2014.
- DALY, D.C. Burseraceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16658>>. Acesso em: 20 Jan. 2015.
- DALY, D.C.; FINE, P. V. A. New amazonian section of Protium (Burseraceae) including both edaphic specialist and generalist taxa. Studies in neotropical Burseraceae XVI. **Syst. Bot.**, v. 36, 939-949, 2011.
- DEUS, G.; REIS, C.; DI GIORGI, K.; BRANDÃO, M. C.; AUDI, C.; FIDEL, R. A. Interfacial adaptarion of the Epiphany self-Adhesive sealer to root dentin. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiologu and Endodontics, v. 111, n. 3, p. 381-386, 2011.
- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p.369-94,2006.
- GIORDANO, D; TRAVERSO, S; GRIMAUDO, L; MELLIA, M. YouLingther: an unsupervised methodology to unveil YouTube CND changes. In: 27° International Teletraffic Congress (ITC). September 8-1-, Ghent, Belgium. 2015.
- GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. Química. Nova, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- GRACIANO, C.; GUIAMET, J. J.; GOYA, J. F. Fertilization and water stress interactions in young *Eucalyptus grandis* plants. *Canadian Journal of Forest Research*, 36: 1028-1034. 2006.
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; GUEDES, M.A.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti- inflammatory effect of alpha, beta- Amyrin a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat modelo of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16 (1), 48-52, 2008.
- KOSHI, G.; CHERIAN, K.M. *Aspergillus terreus*, an uncommon fungus causing aortic root abscess and pseudoaneurysm. **Indian Heart Journal**, v.47, p.265-7, 1995.
- LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O. Espectro antimicrobiano do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.**Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.9, n.1, p.17-24,2005.

- LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201,2006.
- LIMA, T. A. A. C.; ROCHA, K. R. A.; MELO, M. F. F.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; LIMA, M. P. Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*: Uma Contribuição Ao Conhecimento de espécies aromáticas do Bosque da Ciência do Inpa. **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 6-10, 2014.
- MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G.B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from leaves, thin branches and resin of *P. Spruceanum* (Benth.) Engl. **Flavour and Fragrance Jornal**, Sussex, v. 18, n. 4, p. 338-341, July-Aug. 2003.
- MAGALHÃES, A.; ZOGHBI, M. D.; SIANI, A. C. Methoxypropacin, a novel coumarinolignoid from *Protium unifoliolatum*. *Natural Product Research*, 20(1), 43-46. 2006.
- MAIA, R. M., BARBOSA, P. R. CRUZ, F. G. ROQUE , N. F. & FASCIO, M. Triterpenos da Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em Misturas Binárias. *Química Nova*, 23(5): 623-626. 2000.
- MARQUES, D.D; SARTORI, R.A.; LEMOS, T.L.G.; MACHADO, L.L; SOUZA ,J.S.N; MONTE, F.J.Q. Composição química do óleo essencial de duas subespecies do *Protium heptaphyllum*. **ActaAmazonica**, 40(1): 227-2230. 2010.
- MELO, R. R.; FERREIRA, A. G.; RODOLFO JUNIOR, F. Efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) em condições de laboratório. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.5, 2005.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; MURAOKA, T.; CARMO, C. A. F. S.; MELO, W. J. Análise química de tecidos vegetais. In: Silva, F. C. (Ed.). *Manual de Análise Química de Solos, Plantas e Fertilizantes*. EMBRAPA, Brasília, p. 172-223.1999.
- MYLONAKIS, E.; CALDERWOOD, S.B. Infective endocarditis in adults. **The New England Journal of Medicine**, v.345, p.1318-30, 2001.
- NUNES, E. J.; FARRAR, A. M; FONT, L; PATEL, V; SCHLAR, D. E; COLLINS, L. E.; SAGER, T. N; CORREA, M; SALAMONE, J. D. Differential Actions of Adenosine A1 and A2A Antagonists on the Effort – related Effects od Dopamine Antagonists. *Neuroscience Meting Planner*, Washington, DB, Society for Neuroscience. 2009.
- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA- JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORENCIO, M. G.; LIMA, JR. R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacology Research**, Madrid, v.49, p. 105-111, 2004.

- OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical anti-inflammatory effects of the ether extracts from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.
- PONTES, W. J. T.; SILVA, J. M. O. ; DA CAMARA, C. A. G.; GONDIM-JUNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from fruits and leaf of *Protium bahianum* Daly. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 279-282, 2010.
- RABELO, B.V. Macrodiagnóstico do Estado do Amapá: primeira aproximação do ZEE. 3. ed. **Revista. ampl.** Macapá: IEPA. 2008.
- RÜDIGER, André Luis ; Valdir F. Veiga Junior . Chemodiversity of Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. *Chemistry & Biodiversity (Print)* , v. 10, p. 1142-1153, 2013.
- RYBALCHENKO, A; SOFRONIESTOKKERMANS, V. Constraint solving for interpolation. *J. Symb. Comput.* 45(11): 1212- 1233. 2010.
- SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; LIMA JR., O. M.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, E. F.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; HENRIQUES, M. G.M.O. Evaluation of anti- inflammatory- related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.66, p. 57-69, 1999.
- SIMÕES CO, SCHENKEL EP, GOSMÃO G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC. 1999.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN C.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (Eds.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFSC, p. 387 – 415. 2000.
- SOBRINHO, T.R.G. et al. Classificação climática conforme a metodologia Köppen do município de Laranjal do Jari/Amapá/Brasil. In: **Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. Palmas, Tocantins, 2012.
- SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A.P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L.A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the  $\alpha$  –and  $\beta$ - amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 16 (6), 3377-3386, 2008.
- SOUZA, G.C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.135-43,2004.

- SUSUNAGA, G. S., SIANI, A. C., PIZZOLATTI, M. G., YUNES MONACHE. F. D. Triterpenes from resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, **72(6)**: 709-11. 2001.
- SUSUNAGA, G.S. Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* Aubl (March.) (Burseraceae). Manaus, INPA/UFAM, Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais). 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 690 p. 2004.
- WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. *Plant drug analysis*. New York: Springer-Verlag, 1984. 320p.
- WEEKS, A.; DALY, D. C.; SIMPSON, B. B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, p. 85-101. 2005.
- YOKOTA, A.; TAKAHARA, K.; AKASHI, K. Water stress. In: Madhava Rao, K. V.; Raghavendra, A. S.; Janardhan Reddy, K. (Eds.). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, Netherlands. p. 15–39. 2006.
- ZOGHBI, M. G. B; ANDRADE, E. H. A. Composition of the essential oils from leaves, woods, fruits and resin of *Protium Spruceanum* (Benth) Engl. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 14, p. 169-171, 2002.

## CONCLUSÃO GERAL

Esse estudo permitiu uma integração entre diferentes áreas do conhecimento, agregando resultados importantes para Burseraceae e o gênero *Protium*. Os resultados obtidos nessa tese através da morfologia, ecofisiologia, fitoquímica e atividade antifúngica permitem dizer que *P. altsonii* é uma espécie que apresenta uma grande capacidade de adaptação em áreas de florestas e um potencial enorme para fins industriais.

## REFERENCIAS GERAIS

- MENDES, M. M.; GAZARINI, L. C.; RODRIGUES, M. L. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments – effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. **Environmental and Experimental Botany**, n.45, p.165-178, 2001.
- ALMEIDA, E. X., CONSERVA L. M. & LEMOS, R. P. L. Coumarins, coumarinolignoids and terpenes *Protium heptaphyllum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 30(7): 685-687 2002.
- ALVES, M. C. J. L.; LIMA, P. B.; LIMA, L. F.; ZICKEL, C. S. Descrição morfológica para identificação das plantulas de nove espécies lenhosas de uma floresta de restinga. **BiotaNeotropica** vol. 13, no. 3, 2013.
- ALVES, M. V. P.; SILVA, J. C. S.; COSTA, C. J. Caracterização Morfológica de Frutos, Sementes, Plântulas e Mudanças de *Emmotum nitens* (Benth.) Miers (ICACINACEAE). **Revista Verde (Mossoró – RN - Brasil)**, v 9. n. 2 , p. 59 - 67, 2014.
- ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JÚNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. A possible mechanism for antioxytic and antidepressant effects of alpha- and beta- amyryrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 85 (4), 827-834, 2006.
- ARISAWA, M.; KINGHORN, A.D.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents. XXIII. 6 $\alpha$ -Seneciolyoxychaparrin, a new antileukemic quassinoid from *Simaba multiflora*. **Journal of Natural Products**, 46:218-221., 1983.
- BANDEIRA, P. N.; FONSECA, A. M.; COSTA, S. M. O.; LINS, M. U. D. S.; PESSOA, O. D. L.; MONTE, F. J. Q.; NOGUEIRA, N. A. P.; LEMOS, T. L. G. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of resin of *Protium heptaphyllum*. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 2, p. 117-120. 2006.

- BANDEIRA, P. N.; MACHADO, M. I. L.; CAVALCANTI, F. S.; LEMOS, T. L. G. Essential Oil Composition of Leaves, Fruits and Resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 33-34, 2001.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v.25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v.2. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 377 p. 1984.
- BLACK, G. A.; DOBZHANSKY, T. H.; PAVAN, C. Some attempts to estimate species diversity and density of trees in Amazonian forests. *Botanical Gazette* 3 (4): 413- 425, 1950.
- CARVALHO, L. E.; PINTO, D. S.; LYEGE A. M. M; LIMA, M. P. M.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R. Chemical constituents of essential oil of *Protium decadrum* (Burseraceae) from Western Amazon. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants** , v. 13, n. 2, p. 181-184, 2010.
- CARVALHO, L. E.; PINTO, D.S.; LYEGE A. M. M; LIMA, M. P. M.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R. The Chemistry of Essential Oils of *Crepidospermum rhoifolium*, *Trattinnickia rhoifolia* and *Protium elegans* of the Amazon Region. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v.12, n.1, p. 92-96, 2009.
- CASE, R. J.; TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J.; WHEELER, K. A. Wilmington, D.E. Chemistry and ethnobotany of commercial incense copals, copal blanco, copal oro, and copal negro of North America. USA. **Economic Botany**, v. 57, n. 2, p. 189- 202, 2003.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2. Ed. Visconde do Rio Branco: [s.n], 113p., 2004.
- CITÓ, A. G. L.; COSTA, F. B.; LOPES, J. A. D.; OLIVEIRA, V. M. M.; CHAVES, M. H. Identificação dos constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n 4, p. 4-7. 2006.
- COSMO, N.L.; NOGUEIRA, A.C.; LIMA, J.G. DE; KUNIYOSHI, Y.S. Morfologia de fruto, semente e plântula de *Sebastiania commersoniana*, Euphorbiaceae. **Floresta**, v. 40, n. 2, p. 419-428, 2010.
- COSTA, T. O. G.; ALMEIDA, R. A.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; PINTO, A. C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). **Acta Amazonica**. Vol 42 (4): 557-560.2012.

- DALY, D. C.; M. C. MARTÍNEZ-HABIBE , A. WEEKS;, AND M. M. HARLEY . Burseraceae . Pp. 76 – 104 in **The families and genera of vascular plants** , ed. K. Kubitzki . New York : Springer-Verlag , 2011.
- DALY, D.C. Burseraceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16658>>. Acesso em: 20 Jan. 2015.
- DALY, D.C.; FINE, P. V. A. New amazonian section of *Protium* (Burseraceae) including both edaphic specialist and generalist taxa. Studies in neotropical Burseraceae XVI. **Syst. Bot.**, v. 36, 939-949, 2011.
- DALY, D.C.B. A Taxonomic revision of the genus *Protium* (Burseraceae) in eastern Amazonia and the Guianas. v.1-2. University Microfilms International. **Tese de Doutorado**. New York, Faculty in Biology, 1987.
- DINIZ, K. S; SCUDELLER, V. V.. Estrutura fitossociológica de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 2005.
- DUKE, J.A. On Tropical Seedlings. In: **Ann. Missouri Botanical Garden** 56(2): 125-161, 1969.
- FERNANDEZ, M. H.; SCUDELLER, V. V. Identificação morfológica dos breus (*Protium* Burm. f. e *Tetragastris* Gaertn.) da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-AM. Diversidade Biológica. Capítulo 10, p. 169- 185, 2011. IN: SANTOS- SILVA, E. N.; SCUDELLER, V. V.; CAVALCANTI, M. J. (Organizadores). BioTupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central - Vol. 03. Manaus.
- FERRAZ, I.D.K.; CAMARGO, J.L.C.; MESQUITA, M.R.; EICHER, I.; PALACIOS, S.; BARBOSA, A.S.; LUIZE, B.G.; VISCARRA, T. & PEREIRA, B.T. **Guia de Propágulos & Plântulas da Amazônia**. Manaus, Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais - INPA, 2004.
- GRACIANO, C.; GUIAMET, J. J.; GOYA, J. F. Fertilization and water stress interactions in young *Eucalyptus grandis* plants. *Canadian Journal of Forest Research*, 36: 1028-1034. 2006.
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; GUEDES, M.A.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti- inflammatory effect of alpha, beta- Amyrin a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat modelo of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16 (1), 48-52, 2008.

- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 6ª ed. São Paulo, Ed. Nacional. 777 p. 1983.
- LANGENHEIN, J.H. Amber: a botanical inquiry. *Science*, Washington, v. 163, n. 3872, p. 1157-1169, Mar. 1969.
- LEON HERNANDEZ, W. J. Estudio anatómico de la madera e incidencia tecnológicas em 7 especies del género *Protium* Burm. f (Burseraceae). *Revista Forestal Venezolana*, Mérida, v. 1, n. 46, p. 73- 82, 2002.
- LIGNANI L.D.B. Respostas Ecofisiológicas Contrastantes na Vegetação Aberta da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ: Um estudo de caso em *Protium icariba* (Burseraceae), uma espécie abundante, e *Byrsonima sericea* (Malpighiaceae), uma espécie subordinada. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Unpublished). 2008.
- LIMA, M. P.; PINTO, D. S.; DE CARVALHO, L. E.; RIBEIRO, J. E. L. S.; MARQUES, M. O.; FACANALI, R. Análise dos óleos voláteis de *Protium decadrum* da reserva Ducke - AM. In: Anais da 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, águas de Lindóia, Brasil, 2006.
- LIMA, M. P.; PINTO, D. S.; LIMA, T. A. A. C.; RIBEIRO, J. E. L. S.; MARQUES, M. O. M.; FACANAL, R. Óleos essenciais de espécies de *Protium* da reserva Ducke- AM: *P. paniculatum* var. *riedelianum* e *P. aracouchini*. *Documentos IAC*, v. 77. P. 50, 2005.
- LIMA, T. A. A. C.; ROCHA, K. R. A.; MELO, M. F. F.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; LIMA, M. P. Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*: Uma Contribuição Ao Conhecimento de espécies aromáticas do Bosque da Ciência do Inpa. **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 6-10, 2014.
- LIMA-JÚNIOR, R. C.; OLIVEIRA, F. A.; GURGEL, L.A.; CAVALCANTE, I. J.; SANTOS, K.A.; CAMPOS, D.A. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Med.* 2004 Jan;72(1):34-9.
- MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G.B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from leaves, thin branches and resin of *P. Spruceanum* (Benth.) Engl. **Flavour and Fragrance Jornal**, Sussex, v. 18, n. 4, p. 338-341, July-Aug. 2003.
- MAGALHÃES, A.; ZOGHBI, M. D.; SIANI, A. C. Methoxypropacin, a novel coumarinlignoid from *Protium unifoliolatum*. *Natural Product Research*, 20(1), 43-46. 2006.

- MAIA, R. M., BARBOSA, P. R. CRUZ, F. G. ROQUE, N. F. & FASCIO, M. Triterpenos da Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em Misturas Binárias. *Química Nova*, 23(5): 623-626. 2000.
- MARENCO, R. A.; Neves, T. S.; CAMARGOS, M. A. B.; DIAS, D. P.; COSTAS, G. F.; RODRIGUES, J. C. Fotoinibição dinâmica da fotossíntese em árvores de dossel da Amazônia Central. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 150-152, jul. 2007.
- MARQUES, D.D; SARTORI, R.A.; LEMOS, T.L.G.; MACHADO, L.L; SOUZA, J.S.N; MONTE, F.J.Q. Composição química do óleo essencial de duas subespecies do *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**, 40(1): 227-2230. 2010.
- MELO, M. F. F.; MACEDO, S. T. e DALY, D. C. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de nove espécies de *Protium* Burm. f. (Burseraceae) da Amazônia central, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 21 (3): 503-520. 2007.
- MORAIS LCSL, BARBOSA-FILHO JM, ALMEIDA RN. Plants and bioactive compounds for the treatment of Parkinson's disease. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica I*: 127-132. 2003.
- OLIVEIRA, F. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; CORDEIRO, W. M.; VIEIRA- JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Pentacyclic triterpenoids,  $\alpha$ ,  $\beta$  – amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse modelo of pruritus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78 (4), 719- 725, 2004b.
- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA- JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORENCIO, M. G.; LIMA, JR. R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacology Research**, Madrid, 49 (2), 105-111, 2004a.
- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA- JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORENCIO, M. G.; LIMA, JR. R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacology Research**, Madrid, v.49, p. 105-111, 2004.
- OLIVEIRA, J. T. S. Influência dos extrativismos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 5, p. 819-826, 2005.
- OSMOND, C. B. Interactions between irradiance, nitrogen nutrition, and water stress in the sun-shade responses of *Solanum dulcamara*. *Oecologia*, 57: 316-321. 1983.
- OSORIO, A.C.; MARTINS, J.L.F. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, 40:481-486., 2004.

- OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extracts from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.
- OTUKI, M. F.; LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life sciences**, 69(19), 2225-2236. 2001.
- PAULA, J.E. ALVES, J.L.H. Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso. Brasília: Fundação Mokiti Okada, 1997. 544 p.
- PLOWDEN, J. C. The ecology, management and marketing of non-timber forest products in the Alto Rio Guamá Indigenous Reserve (Eastern Brazilian Amazon). 264 p. Tese (Ph.D.) - The Pennsylvania State University, State College, 2001.
- PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S.; CAMARA, C. A. G.; LOPES, C. H. R. Composition and acaricidal activity of the resin's essential oil of *Protium bahianum* Daly against two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 379-383, 2007.
- PONTES, W. J. T.; SILVA, J. M. O. ; DA CAMARA, C. A. G.; GONDIM-JUNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from fruits and leaf of *Protium bahianum* Daly. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 279-282, 2010.
- RIBEIRO, J. E.L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCOPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke. 9 edição, INPA, p. 534-542, 1999.
- RICARDI, M. 1996. Morfologia de los cotiledones de plántulas de algunas familias o géneros presentes en Venezuela como fuente de caracteres para su determinación. **Plantula 1**: 1-11.
- RUDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Plant Review*, 1 (1), 93- 104, 2007.
- SANTOS, T. A.; MIELKE, M. S.; PEREIRA, H. A. S.; GOMES, F. P.; SILVA, D. C. Trocas gasosas foliares e crescimento de plantas jovens de *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae) submetidas ao alagamento do solo em dois ambientes de luz. *Scientia Forestali*, Piracicaba, v. 40, n. 93, p. 047-056, mar, 2012.

- SEIFFERT, M.; ALVARENGA, A. A.; GUIMARAES, R. M.; CASTRO, E. M.; CARDOSO, M. G.; PAIVA, R.; DOUSSEAU, S.; VIEIRA, C. V. Efeito da secagem e de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Protium widgrenii* Engler. Ciênc. agrotec. Lavras, v. 30, n. 1, p. 35-42, jan./fev., 2006.
- SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO, S. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 477-489, 2004.
- SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; LIMA JR., O. M.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, E. F.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; HENRIQUES, M. G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.66, p. 57-69, 1999.
- SILVA, A. G.; COSTA, L. G. Germinação, Morfologia de frutos, sementes e plântulas de Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra*) (Vell. Fr. All. ex. Benth.). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 1871, 2014.
- SILVA, J.R.A.; ZOGHBI, M.G.B.; PINTO, A.C.; GODOY, R.L.O.; AMARAL, A.C.F. Analysis of the hexane extracts from seven oleo resins of *Protium* species. **Journal of Essential Oil Research**, 21:305-308. 2009.
- SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G; MELLO J.C.P. MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. Ed. UFSC. 2002.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN C.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (Eds.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFSC, p. 387 – 415. 2000.
- SIQUEIRA, J. B.; ZOGHBI, M. G. B.; CABRAL, J. A.; FILHO, W. W. Lignans from *Protium tenuifolium*. *Jornal of Natural Products*. V. 58, n 5, p. 730- 732, 1995.
- SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A.P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L.A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the  $\alpha$ - and  $\beta$ - amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 16 (6), 3377-3386, 2008.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 704 p. 2008.
- SUSUNAGA, G. S., SIANI, A. C., PIZZOLATTI, M. G., YUNES MONACHE. F. D. Triterpenes from resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, **72(6)**: 709-11. 2001.

- SUSUNAGA, G.S. Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* Aubl (March.) (Burseraceae). Manaus, INPA/UFAM, Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais). 1996.
- TOSTES, L. C. L.; CARIM, M. J. V.; GONÇALVES, J. F. C.; TORRES, A. M.; GUIMARAES, J. R. S. Padrão de Distribuição Espacial e Estrutura Diamétrica de *Protium* Burm. f. na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru, Sudoeste do Amapá, Amazônia Oriental, Brasil. *no prelo* Revista Árvore.
- VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, 28 (2), 183-187, 2005.
- VIEIRA, F. DE A.; APPOLINÁRIO, V.; FAJARDO, C. G.; CARVALHO, D. DE. Reproductive Biology of *Protium spruceanum* (Burseraceae), a dominant dioecious tree in vegetation corridors in Southeastern Brazil. *Revista Brasil. Bot.*, V.33, n.4, p.711-715, out. dec. 2010.
- WEEKS, A.; DALY, D. C.; SIMPSON, B. B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, v. 35, p. 85-101. 2005.
- YOKOTA, A.; TAKAHARA, K.; AKASHI, K. Water stress. In: Madhava Rao, K. V.; Raghavendra, A. S.; Janardhan Reddy, K. (Eds.). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, Netherlands. p. 15–39. 2006.
- ZOGHBI, M. D. G. B., ROQUE, N. F.; e GOTTLIEB, O. R. Propacin, a coumarinolignoid from *Protium opacum*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 1, p. 180-184, 1981.
- ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, E. V. L.; WOLTER-FILHO, W. Essential oil of *Protium unifoliolatum* ( Burseraceae ). ***Acta Amazônica***, v. 23, n. 1, p. 15-16, 1993.
- ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Composition of the essential oils from leaves, woods, fruits and resin of *Protium Spruceanum* (Benth) Engl. ***Journal of Essential Oil Research***, Carol Stream, v. 14, p. 169-171, 2002.
- ZOGHBI, M.G.B.; ROQUE, N.F.; GOTTLIEB, O.R. Propacin, a coumarinolignoid from *Protium opacum*. ***Phytochemistry***, 20:180., 1981.