



**JANICE FERREIRA DO NASCIMENTO**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E  
QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL NA  
SELEÇÃO DE CANDEIA (*Eremanthus  
erythropappus* (DC.) MacLeish)**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**JANICE FERREIRA DO NASCIMENTO**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEO  
ESSENCIAL NA SELEÇÃO DE CANDEIA (*Eremanthus erythropappus*  
(DC.) MacLeish)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutora.

Dr. Antônio Claudio Davide  
ORIENTADOR

Dr. Lucas Amaral de Melo  
COORIENTADOR

**LAVRAS – MG  
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Nascimento, Janice Ferreira do.

Diversidade genética e quantificação de óleo essencial na  
seleção de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) /  
Janice Ferreira do Nascimento. – Lavras : UFLA, 2015.

111 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Antônio Cláudio Davide.

Bibliografia.

1. Melhoramento genético. 2. Diversidade genética. 3.  
Espectroscopia. 4. Óleo essencial. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

**JANICE FERREIRA DO NASCIMENTO**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEO  
ESSENCIAL NA SELEÇÃO DE CANDEIA (*Eremanthus erythropappus*  
(DC.) MacLeish)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015.

Dr. Caio César Salgado	Monsanto
Dra. Dulcinéia de Carvalho	UFLA
Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Dr. Paulo Ricardo Gherardi Hein	UFLA

Dr. Antônio Claudio Davide  
Orientador

Dr. Lucas Amaral de Melo  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, João e Eunice, por toda confiança, carinho e amor e que, mesmo longe, estiveram sempre presentes em minha caminhada. Essa conquista também é de vocês.

Ao Paulo Roberto, pelo amor, companheirismo e extrema paciência em todos os momentos.

Ao professor Antônio Claudio Davide, pelos ensinamentos, incentivo e paciência e que, além de orientador, foi um exemplo de profissional e pessoa.

Ao professor e amigo Lucas Amaral de Melo (Luquinhas), pela amizade, incentivo, brincadeiras e ajuda indispensável neste trabalho.

Aos professores Paulo Hein, Dulcinéia de Carvalho e Maria das Graças, pelo apoio em seus laboratórios e pelas valiosas contribuições neste trabalho.

Ao Dr. Caio Césio pelas valiosas contribuições.

Ao professor José Airton, pelo auxílio, críticas e sugestões neste trabalho.

Aos meus grandes amigos: Tati, Olívia e Wilson que foram imprescindíveis em todos os momentos e que me mostraram que a caminhada com amigos é sempre mais divertida e produtiva. Amigos para a vida toda, amo vocês!

A Thiza pelo tempo dispensado em me ajudar nos experimentos, além de todo apoio, calma e tranquilidade que me ajudaram a superar os momentos difíceis.

Aos grandes amigos do LSF: Ezequiel, Túlio, Cris, José Marcio, Anderson, Andreza, Ailton, Francesca, Fabiele, Gislean, Gírlânio, Beth, Rayana, Patrick, Talita, Fabricio, Luiz, Maria Izabel, Fernando, Lorena, Rafa e Josina.

Aos funcionários do Viveiro Florestal da UFLA, pela colaboração na condução dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica e Laboratório de Conservação Genética de Espécies Florestais da UFLA, pela contribuição durante os experimentos.

A Priscila e Lidiane do Departamento de Química da UFLA pela ajuda com as análises do óleo essencial.

A todos os amigos da pós-graduação em Engenharia Florestal da UFLA que tornaram essa caminhada mais prazerosa.

Aos amigos do Núcleo de Estudos em Silvicultura por tudo! Foi muito bom aprender um pouco mais do fascinante mundo da engenharia florestal com vocês.

A Meire e seu cafezinho salvador!

A toda minha família e amigos que, mesmo de longe, sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

A todos os professores com quem tive o prazer de aprender durante minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFLA, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À CITROLEO, pela contribuição em vários momentos da condução dos experimentos e por financiar parte dos trabalhos.

*“Pensar é o trabalho mais pesado que há, e talvez seja essa a razão para tão poucos se dedicarem a isso.”*

*Henry Ford*

## RESUMO GERAL

A espécie florestal *Eremanthus erythropappus*, popularmente conhecida como candeia e característica da paisagem de Minas Gerais, é bastante explorada pela durabilidade natural de sua madeira para a confecção de moirões e extração do seu óleo essencial, rico em alfa-bisabolol, um composto muito utilizado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Assim, a identificação e seleção de materiais genéticos mais adaptados às diversas regiões e que aumentem a produtividade dos plantios, irá possibilitar maior retorno econômico aos investidores. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, selecionar materiais genéticos de *E. erythropappus* que apresentem maior crescimento volumétrico de madeira e maior rendimento de óleo essencial. Foram utilizadas amostras de madeira provenientes de candeais nativos de três procedências de Minas Gerais, além de amostras de um teste de procedências/progênes instalado em Baependi – MG. A partir desse material, foram realizadas análises laboratoriais para extração do óleo essencial, e análises não destrutivas através da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), para identificação dos materiais mais produtivos. Além disso, foi avaliada a diversidade genética entre clones de candeia de um teste clonal, através de marcadores morfológicos e ISSR. Pelos resultados obtidos, observa-se variabilidade genética entre os materiais estudados; além disso, verifica-se que é possível avaliar o rendimento de óleo essencial em amostras desconhecidas de madeira de candeia por NIRS, e que existe variação no rendimento de óleo essencial e teor de alfa-bisabolol nos diferentes materiais genéticos de candeia estudados, indicando potencial para seleção. As informações obtidas podem ser usadas para definir futuras estratégias a serem adotadas no programa de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: Melhoramento genético. Diversidade genética. Espectroscopia. Óleo essencial



## GENERAL ABSTRACT

The forest specie *Eremanthus erythropappus*, commonly known as Candeia, is characteristic of landscape of the State of Minas Gerais, Brazil, and is widely exploited due to natural durability of its wood to build fence posts and extract essential oil, which is rich in alpha-bisabolol, a compound widely used in pharmaceutical and cosmetics industries. Thus, the identification and selection of the most suitable genetic material to various regions and, which increases plantations productivity, will make possible obtaining economic income by investors. In this study, we aimed to select genetic material of *E. erythropappus* with greater volumetric growth of wood and greater yield in essential oil. Samples of wood of native Candeia trees obtained from three places in the State of Minas Gerais, as well as samples of a test from a progeny established in Baependi, State of Minas Gerais, were used. Laboratory analyses were carried out to extract essential oil and, non-destructive analysis was carried out by means of Near-infrared Spectroscopy (NIRS) to identify the most yield material. Besides, the genetic diversity was assessed among clones of Candeia of a clonal test by means of morphological markers and ISSR. According to results, the genetic variability among materials was found. In addition, was found that it is possible assessing essential oil yield of unknown wood samples of Candeia by means of NIRS, as well as that there is yield variation in essential oil and in content of alpha-bisabolol among different material, which indicates potential for selection. Therefore, data obtained may be used to define future strategies to be adopted in plant breeding programs for this specie.

Key-words: Plant breeding. Genetic diversity. Spectroscopy. Essential oils.

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.....	25
Figura 2 Estrutura química do alfa-bisabolol.....	26
<b>ARTIGO 1</b>	
Figura 1 Variações fenotípicas em folhas de clones de <i>E. erythropappus</i> em um teste clonal com 20 meses de idade. A – Clone 07; B – Clone 02; C – Clone 03; D – Clone 06; E – Clone 13; F – Clone 05.....	55
Figura 2 Exemplos de variações fenotípicas na margem das folhas de <i>E. erythropappus</i> (DC) MacLeish. em um teste clonal com 20 meses de idade. A – Clone 05 com margem inteira; B – Clone 14 com margem ondulada; C – Clone 03 com margem denteada.....	59
Figura 3 Análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA, com base na matriz de distâncias de Mahalanobis, a partir de caracteres morfológicos de 17 clones de <i>E. erythropappus</i> .....	63
Figura 4 Análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA de clones de <i>E. erythropappus</i> , com base na matriz de similaridade de Jaccard, a partir de marcadores ISSR.....	66
<b>ARTIGO 2</b>	
Figura 1 Rendimento de óleo essencial e teor de alfa-bisabolol na madeira de árvores de um teste de procedências/progênes de <i>E. erythropappus</i> aos cinco anos e meio de idade em Baependi – MG.....	83

Figura 2	Rendimento de óleo essencial na madeira de galhos de matrizes de <i>E.erythropappus</i> de diferentes procedências em Minas Gerais.....	84
----------	---	----

**ARTIGO 3**

Figure 1	NIR predicted versus lab-measured values plot for essential oil content for both calibration (filled circles) and cross-validation sets (open diamonds).....	100
Figure 2	NIR predicted versus lab-measured values plot for essential oil content for both training (open circles) and test sets (open diamonds).....	101
Figure 3	PLS regression coefficients for predicting essential oil content in <i>E. erythropappus</i> wood .....	102

## LISTA DE TABELAS

pág.

### ARTIGO 1

Tabela 1	Média dos valores mensurados para os caracteres morfológicos relacionados às folhas em três posições da copa (ápice, meio e base da copa) de 17 clones de <i>E. erythropappus</i> em um teste clonal aos 20 meses de idade em Lavras – MG.....	56
Tabela 2	Média dos valores mensurados para os ângulos de inserção dos galhos no fuste principal em três posições da copa (ápice, meio e base da copa) de 17 clones de <i>E. erythropappus</i> em um teste clonal aos 20 meses de idade em Lavras – MG.....	60
Tabela 3	Matriz de distâncias de Mahalanobis, com base nos caracteres morfológicos dos 17 clones de <i>E. erythropappus</i> , em um teste clonal aos 20 meses de idade em Lavras – MG.....	61
Tabela 4	Contribuição relativa dos caracteres morfológicos para a divergência genética em clones de <i>E. erythropappus</i> .....	62
Tabela 5	Nome, sequência e número de fragmentos produzidos pelos nove <i>primers</i> ISSR selecionados para a amplificação de clones de <i>E. erythropappus</i> .....	64
Tabela 6	Índices de diversidade genética entre os clones de <i>E. erythropappus</i> . P: porcentagem de locos polimórficos; I: Índice de Shannon; He: diversidade genética de Nei; ( ): Desvio padrão.....	65

## ARTIGO 2

Tabela 1	Expectativa de receita (US\$/ha) com a venda do óleo essencial extraído de diferentes materiais genéticos de <i>E. erythropappus</i> selecionados em um teste de procedências/progênes, aos cinco anos e meio de idade, considerando o rendimento em óleo essencial (%), o volume individual das árvores (m <sup>3</sup> ), a densidade da madeira de candeia igual a 632,39 kg/m <sup>3</sup> , a densidade de plantio de 2000 plantas por hectare e o valor de venda do óleo essencial de US\$ 55.00.....	86
----------	---	----

## ARTIGO 3

Table 1	Descriptive analysis of calibration and test set for estimating essential oil content and statistics associated to the PLS-R model validations.....	99
---------	---	----

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE – Introdução Geral</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2.1 Caracterização da espécie <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish</b> .....	18
<b>2.2 Óleos essenciais</b> .....	22
<b>2.3 Avaliação das propriedades da madeira por meio da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS)</b> .....	28
<b>2.4 Diversidade genética através de marcadores morfológicos e moleculares</b> .....	30
<b>3. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>SEGUNDA PARTE – Artigos</b> .....	45
<b>ARTIGO 1 Diversidade genética entre clones de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) MacLeish por marcadores morfológicos e moleculares</b> .....	45
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>5. AGRADECIMENTOS</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

<b>ARTIGO 2</b> Rendimento qualitativo do óleo essencial de diferentes materiais genéticos de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) MacLeish .....	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4. CONCLUSÃO.....	88
5. AGRADECIMENTOS .....	88
REFERÊNCIAS.....	88
<b>ARTIGO 3</b> ESSENTIAL OIL CONTENT IN <i>EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS</i> WOOD POWDER CAN BE ESTIMATED USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY.....	92
1. INTRODUCTION .....	94
2. MATERIAL AND METHODS .....	95
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	99
4. CONCLUDING REMARKS .....	104
5. ACKNOWLEDGMENTS .....	104
6. REFERENCES.....	105

## PRIMEIRA PARTE – Introdução Geral

### 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, popularmente conhecida como candeia, é uma espécie abundante em sítios acima de 900 metros de altitude, em Minas Gerais e sua madeira é muito utilizada para a confecção de moirões para cerca e para a extração de óleo essencial, cujo composto majoritário, o alfa-bisabolol, é utilizado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, por possuir características inseticidas (ANDRADE et al., 2004), antibacterianas (VILA et al., 2010), fungicidas (TABANCA et al., 2007) e anti-inflamatória.

Após uma denúncia no ano 2000 sobre a “Máfia da candeia”, onde a espécie, em função da sua importância econômica, estava sendo ameaçada em razão do corte indiscriminado, a Universidade Federal de Lavras – UFLA, juntamente com o Ministério do Meio Ambiente desenvolveram um projeto, “O manejo sustentável da candeia”, para estudar melhor a espécie. A partir de então, inúmeros trabalhos estão sendo desenvolvidos e executados pelo Departamento de Ciências Florestais da UFLA.

Com isso, nos últimos anos, tem-se observado a implantação de inúmeros povoamentos no estado de Minas Gerais, principalmente nas áreas mais ao sul do estado, porém esses plantios têm sido realizados com materiais sem grau de melhoramento genético. Galdino et al. (2006) observaram que existem diferenças no rendimento de óleo essencial e teor de alfa-bisabolol de diferentes materiais genéticos de candeia, o que possibilita a seleção de materiais mais produtivos.

Diante da necessidade de identificação de clones mais indicados para a produção de óleo essencial e da produção de sementes e mudas com melhor



qualidade genética, está sendo desenvolvido no Departamento de Ciências Florestais um programa de melhoramento genético da candeia, o que irá trazer benefícios para os produtores dessa espécie, que irão trabalhar com materiais genéticos mais produtivos. Porém, um programa de melhoramento genético de uma espécie, principalmente daquelas perenes, é um processo demorado e de longo prazo, mas que irá possibilitar, ao longo dos anos, incrementos em produtividade e qualidade do produto final.

No caso da candeia, a avaliação do rendimento de óleo essencial é uma etapa demorada e onerosa, que necessita do abate da árvore, tornando difícil a análise de um grande número de amostras. Nesse sentido, avaliações não destrutivas da madeira são uma opção para a caracterização rápida, simples e confiável, onde as informações sobre o material são obtidas por medidas indiretas, o que reduz o tempo das avaliações (VIANA et al., 2010). A espectroscopia no infravermelho próximo (Near Infrared Spectroscopy – NIRS) é um desses métodos não destrutivos capaz de prever propriedades químicas, físicas, mecânicas e anatômicas de diversos materiais (KELLEY et al., 2004; MEDER et al., 1999; SCHIMLECK et al., 1999; SCHIMLECK; EVANS, 2004), inclusive da madeira. Com esse método de análise, é possível identificar os materiais mais produtivos em relação ao rendimento de óleo essencial e selecioná-los.

Além da identificação dos genótipos mais produtivos, num programa de melhoramento genético é indispensável que exista variabilidade genética entre os materiais, pois ela é ferramenta básica para definir as estratégias de melhoramento a serem aplicadas. Existem diversas maneiras de avaliar essa diversidade entre indivíduos e populações, entre elas destaca-se a utilização de marcadores, que são algumas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares que sejam herdadas geneticamente e que possam ser utilizados na identificação de diferentes materiais genéticos.

A determinação da variabilidade genética para uso no melhoramento da candeia em características relacionadas ao aumento volumétrico das árvores, qualidade da madeira e maior rendimento em óleo essencial, tornam-se interessantes, em decorrência da possibilidade de ganhos em qualidade e quantidade no produto final, trazendo bons resultados econômicos para os produtores da espécie e compensando o custo envolvido com pesquisa e tecnologia aplicadas.

Dessa forma, conduziu-se este trabalho com o objetivo geral de selecionar materiais genéticos de *E. erythropappus* que apresentem maior aumento volumétrico de madeira e maior rendimento de óleo essencial.

De forma mais específica, os objetivos deste trabalho podem ser elucidados, de acordo com os três artigos que o compõem:

Artigo 1, com o objetivo de avaliar a diversidade genética em clones de *E. erythropappus*, por meio de marcadores morfológicos e moleculares.

Artigo 2, com o objetivo de avaliar o rendimento de óleo essencial e o teor de alfa-bisabolol em diferentes materiais genéticos de *E. erythropappus*, tanto em matrizes de candeais nativos, quanto em progênies com cinco anos e meio de idade.

Artigo 3, com o objetivo de verificar a viabilidade da aplicação da espectroscopia no infravermelho próximo para estimar o teor de óleo essencial na madeira de *E. erythropappus*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Caracterização da espécie *Eremanthus erythropapus* (DC.) MacLeish

A candeia (*Eremanthus erythropapus* (DC.) MacLeish) é uma espécie arbórea, pertencente à família Asteraceae, exigente de luz, que se desenvolve rapidamente em campos abertos, formando povoamentos mais ou menos puros, os candeais.

Apesar de ter sido classificada, inicialmente, como pioneira, estudos com a espécie corrigiram essa classificação, passando-a a espécie de ecótono, nas áreas de transição entre as matas semidecíduais e os campos abertos (cerrado) ou, também, campos de altitude. Mesmo apresentando várias características de espécie pioneira, como alta produção de sementes, dispersão pelo vento e alta taxa de regeneração natural, ela não apresenta ciclo de vida curto, sendo encontrados exemplares com idade superior a 70 anos (SCOLFORO; LOEUILLE; ALTOÉ, 2012).

O gênero *Eremanthus* é composto por 18 espécies (MACLEISH, 1987), onde a *Eremanthus erythropapus* (DC) MacLeish e a *Eremanthus incanus* (Less.) Less são as espécies de maior interesse econômico e que apresentam maior distribuição no Estado de Minas Gerais. A *Eremanthus erythropappus* é largamente comercializada para a produção de moirões e a extração de óleo essencial e a *Eremanthus incanus* é utilizada para a comercialização de moirões.

Segundo Araújo (1944), o nome candeia deve-se a combustão da madeira e das folhas, que produzem uma chama semelhante a das candeias, com luz clara e brilhante, não deixando quase resíduos, em razão da presença de óleo essencial.

No Brasil, a espécie está distribuída em toda parte sudeste do Planalto Central, sendo bastante comum em colônias no meio da floresta secundária da faixa costeira, do cerrado e campos rupestres do planalto interior no centro-oeste e sudeste (LOEUILLE; LOPES; PIRANI, 2012; MACLEISH, 1987). Em Minas Gerais, os candeais formam uma ampla faixa de nordeste ao sul do estado e segue em sentido oeste (ALTOÉ, 2012).

Pela sua baixa exigência edáfica, a candeia se desenvolve em locais em que seria difícil a implantação de culturas agrícolas ou mesmo de alguma outra espécie florestal. O seu desenvolvimento ocorre nas áreas de transição entre a floresta e as formações mais abertas, particularmente em áreas de campos de altitudes, entre 400 e 2.200 m e em sítios com solos pouco férteis e rasos (SCOLFORO; LOEUILLE; ALTOÉ, 2012).

O sombreamento é um dos fatores que afeta a regeneração, por semente, uma vez que a semente de candeia é exigente de luz para germinar e se estabelecer. Esse fato explica a menor quantidade de plântulas de candeia no interior das matas e a abundância em áreas mais abertas (PÉREZ, 2001). Os candeais apresentam árvores com baixa estatura que variam entre 6 e 10 metros em média, e distribuição diamétrica decrescente, com diâmetros em torno de 15 cm (SCOLFORO; LOEUILLE; ALTOÉ, 2012).

Essa espécie possui casca grossa e cheia de fendas no fuste. Nos galhos mais novos, a casca torna-se menos rústica. Suas folhas são simples, opostas e apresentam uma dupla coloração característica, onde, na parte superior, são verdes e glabras e, na parte inferior, possuem um tom branco, tomentoso e são aveludadas (CHAVES; RAMALHO, 1996; CORREA, 1931). Dutra et al. (2010) comentam que as folhas de candeia apresentam estruturas tipicamente xeromorfas, o que contribui para uma proteção mecânica e química foliar para a adaptação dessa espécie no seu ambiente natural. Possui inflorescência de cor púrpura nas extremidades dos ramos, com flores hermafroditas (ARAÚJO,

1944). As características das folhas e das inflorescências facilitam a identificação da espécie mesmo à distância.

A floração das candeias começa aos três anos de vida da planta e ocorre de julho a setembro, período seco e frio do ano. A sua frutificação e dispersão ocorrem de agosto a setembro, período de elevação da temperatura, e estende-se aos meses de outubro e novembro, quando ocorre o início do período das chuvas (SCOLFORO; LOEUILLE; ALTOÉ, 2012). O fruto é um aquênio cilíndrico, seco deiscente, de coloração cinza-escura. Cada fruto contém uma só semente com, aproximadamente, 0,5 mg e 2 mm de comprimento (CHAVES; RAMALHO, 1996; DAVIDE et al., 2000). Sua propagação é, principalmente, via seminal e apresenta altos índices de germinação, desde que seja realizado o processo de beneficiamento adequado (DAVIDE et al., 2011).

Com relação à madeira, a candeia apresenta cerne bem demarcado, de coloração amarelo ou castanho, em relação ao alburno branco ou acinzentado, com grã mais escura e exala um odor peculiar e intenso, lembrando a essência de valeriana e o ácido valeriano (RIZZINI, 1979). Os anéis de crescimento são distintos, caracterizados pela alternância de lenhos inicial e tardio, demarcados por zonas fibrosas e fina linha de parênquima marginal (CHAGAS; TOMAZELLO FILHO; LISI, 2007). A faixa de densidade situa-se entre 0,60 e 0,78 g/cm<sup>3</sup>, com tendência de decréscimo no sentido base-topo, dentro de uma mesma classe diamétrica e tendência de aumento das menores para as maiores classes diamétricas (SCOLFORO et al., 2004).

A madeira de candeia apresenta múltiplos usos. Tradicionalmente, foi empregada na construção naval, construção de canoas, lenha e postes. Porém, ultimamente, os principais produtos obtidos da candeia são moirões para cerca e seu óleo essencial, que apresenta altos teores de alfa-bisabolol, um composto de grande importância econômica, obtido a partir da destilação do óleo de candeia bruto. Esse princípio ativo é muito utilizado na indústria farmacêutica e de

cosméticos, por suas propriedades antiflogísticas, antibacteriana, antimicóticas, dermatológicas e espasmódicas (TEIXEIRA et al., 1996). O alfa-bisabolol está presente em diversos produtos como cremes, bronzeadores, protetores solares, veículo para medicamentos, além de uso na profilaxia e cuidados da pele de bebês e adultos, entre outros (BHATIA et al., 2008).

Os produtos obtidos da candeia apresentam preços relativamente altos no mercado. O preço da dúzia de moirões cortados e retirados do candeal pode variar de R\$ 85,00 a R\$ 125,00, dependendo do diâmetro. O quilo do óleo essencial de candeia é vendido pelas indústrias produtoras por US\$ 50.00 a US\$ 55.00. O alfa-bisabolol produzido pelas indústrias brasileiras é vendido para distribuidores e para indústrias de cosméticos e medicamentos do Brasil e do exterior, por um preço que varia de US\$ 90.00 a US\$ 100.00 o quilo. Já, o preço do alfa-bisabolol ofertado por distribuidores situa-se na faixa de US\$ 120.00 a US\$ 130.00/kg (OLIVEIRA; ANDRADE; SCOLFORO, 2012).

No Brasil, existem sete indústrias de óleo de candeia natural bruto, com uma produção anual de 170 mil quilos, sendo grande parte exportada, principalmente, para países europeus. Já, o alfa-bisabolol é produzido por três indústrias brasileiras que o vendem para distribuidores e indústrias de cosméticos e fármacos (SCOLFORO; OLIVEIRA; ACERBI JÚNIOR, 2012).

Alguns trabalhos afirmam que o peso do óleo extraído do fuste aumenta com o aumento da classe diamétrica, sendo possível extrair o óleo dos galhos finos e das folhas de candeia, além do óleo já extraído, tradicionalmente, do fuste (CAMOLESI, 2007; PÉREZ, 2001).

O rendimento do óleo essencial da candeia nativa é bem variável. Foram encontrados rendimentos que variam de 1,02 a 2,46%, em diversos municípios de Minas Gerais (CAMOLESI, 2007; SCOLFORO et al., 2004; SCOLFORO; OLIVEIRA; ACERBI JÚNIOR, 2008). Para a candeia plantada com nove anos de idade Altoé (2012) encontrou rendimentos de 0,97 e 0,89% para a madeira

sem casca e com casca, respectivamente. Segundo a autora, essas variações dos rendimentos estão relacionadas com a variabilidade genética, com as variações ambientais e com os estágios de desenvolvimento da planta.

Diante a importância da candeia para o mercado de moirões e de óleo essencial, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com a espécie, tais como: produção e tecnologia de sementes e mudas (DAVIDE et al., 2008; DAVIDE; TONETTI; SILVA, 2011; FEITOSA et al., 2009; MELO et al., 2014; TONETTI; DAVIDE; SILVA, 2006; VENTURIN et al., 2005), propagação vegetativa (MELO, 2012; REZENDE, 2007), micropropagação (ROSAL, 2004), aspectos genéticos (BARREIRA et al., 2006; ESTOPA et al., 2006; SILVA et al., 2007), caracterização e manejo de povoamentos naturais (OLIVEIRA et al., 2011; PÉREZ et al., 2004), análise econômica (OLIVEIRA et al., 2009), características da madeira (CHAGAS; TOMAZELLO FILHO; LISI, 2007; MORI; MORI; MENDES, 2010) e produção de óleo essencial (ALTOÉ, 2012; CAMOLESI, 2007; GALDINO et al., 2006; MORI et al., 2009; PÉREZ et al., 2004; SCOLFORO et al., 2004).

## **2.2 Óleos essenciais**

O metabolismo pode ser definido como o conjunto de reações químicas que, continuamente, estão ocorrendo em cada célula. No caso das plantas, existe o metabolismo primário, responsável pelos processos vitais como: fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos, e o metabolismo secundário que não apresenta função aparente nos processos de crescimento e desenvolvimento do vegetal, porém alguns estudos sugerem que estes metabólitos têm funções ecológicas importantes, como proteção contra herbivoria e infecção por microrganismos patogênicos, atrativos para animais

polinizadores e dispersores de sementes, bem como agentes na competição planta-planta (SIMÕES et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Dentre esses metabólitos secundários estão os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. A ISO (Internacional Standard Organization) os define como produtos obtidos de partes de plantas, por meio de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES et al., 2007).

De uma forma geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, e apresentam consistência semelhante aos óleos fixos. Têm sabor geralmente acre e picante, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. Quando recentemente extraídos, são incolores ou ligeiramente amarelados; alguns podem apresentar coloração intensa, como o óleo de camomila que é azul intenso, em razão da presença dos derivados do azuleno (BANDONI; CZEPAK, 2008; SIMÕES et al., 2007).

O conhecimento sobre óleos essenciais de plantas data de alguns séculos antes da era cristã. As referências históricas de obtenção e utilização desses óleos estão ligadas, originalmente, aos países orientais, com destaque para o Egito, Pérsia, Japão, China e Índia. No Brasil, a produção de óleos essenciais teve início ao final da segunda década dos anos 1920, tendo como base o puro extrativismo de essências nativas, principalmente do pau-rosa. Na década de 1950, importantes empresas internacionais especializadas em óleos essenciais se instalaram no país, provocando um aumento no consumo interno e dando maior estabilidade à produção brasileira (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos essenciais apresentam diversos usos dentre os quais a utilização crescente nas áreas de alimentos (condimentos, antioxidantes, aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticos (perfumes e produtos de higiene), no controle de microrganismos, agindo como: bactericidas, fungicidas



e virucidas, e no controle de nematoides, insetos e parasitas (BAKKALI et al., 2008).

Todos os órgãos da planta (flores, folhas, cascas, madeira, frutos e sementes) podem acumular óleos essenciais, porém sua composição pode variar segundo a localização. Os óleos essenciais podem estar presentes em estruturas secretoras especializadas, dependendo da família, tais como em pelos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae) (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais podem conter em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em concentrações diferenciadas, porém são caracterizados, na maioria das vezes, por dois ou três componentes em concentrações bastante elevadas, ou seja, compostos majoritários (20-70%), em comparação com os outros componentes presentes em pequenas quantidades (BAKKALI et al., 2008).

Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos de derivados dos fenilpropanóides ou de terpenóides (SIMÕES et al., 2007). Os fenilpropanóides são compostos aromáticos, que possuem uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático, formam-se, a partir do ácido chiquímico, precursor de vários aminoácidos aromáticos, entre eles a L-fenilalanina e a tirosina. O ácido chiquímico forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico, que, por meio de reduções enzimáticas, produzem propenilbenzenos e alilbenzenos. Estes, por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais, geram diversos compostos presentes na constituição de muitos óleos essenciais (BARRETO; VEIGA JÚNIOR, 2005; SIMÕES et al., 2007) (Figura 1).

Os terpenóides fazem parte de uma grande variedade de substâncias vegetais, e são constituídos de duas ou mais moléculas de isopreno, ocorrendo

de forma mais abundante nas espécies produtoras de óleo essencial. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpênicos, formados por duas moléculas de isopreno (cerca de 90% dos óleos essenciais) e os sesquiterpênicos, formados por três moléculas de isopreno (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMÕES et al., 2007).

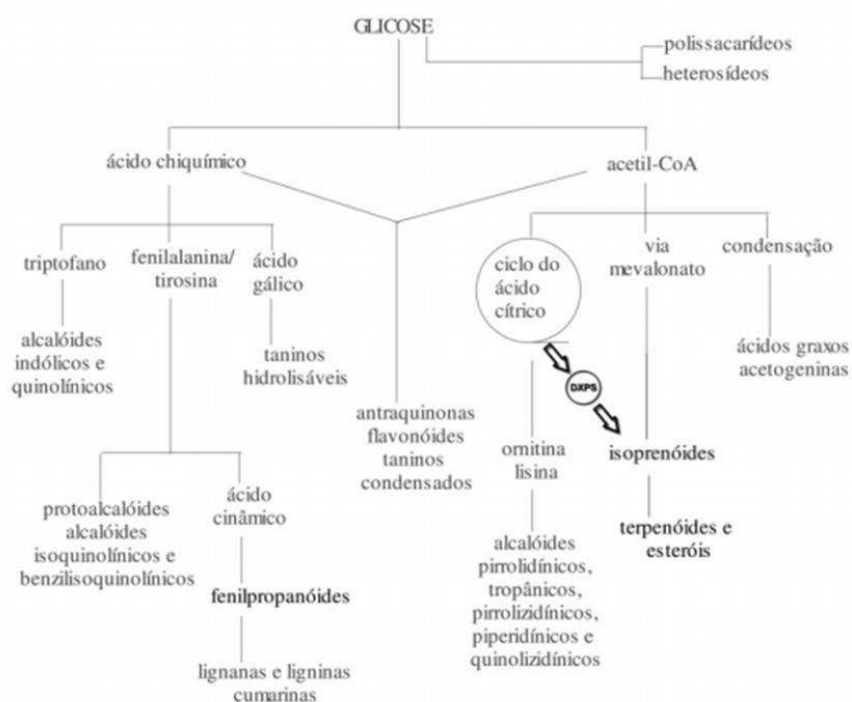


Figura 1 - Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários  
Adaptado de Simões et al. (2007)

Diversos fatores influenciam na composição e na produção dos óleos essenciais pelas plantas. Fatores como genética, sazonalidade, ritmo circadiano, idade, estágio de desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrição mineral, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos e ataque de patógenos, são citados por Gobbo

Neto e Lopes (2007) e Simões et al. (2007). Além desses, os métodos utilizados para extração também podem influenciar na produção.

Os métodos utilizados para extração dos óleos essenciais são: hidrodestilação; maceração; extração por solvente; enfloração; destilação por arraste a vapor; extração por micro-ondas; extração por fluidos supercríticos; prensagem. A utilização de cada uma vai de acordo com a necessidade e o material disponível, variando, assim, a pureza do produto final (BANDONI; CZEPK, 2008; SANTOS et al., 2004; SIMÕES et al., 2007).

O óleo essencial da candeia, objeto deste estudo, tem como componente majoritário o  $\alpha$ -bisabolol (Figura 2), (2S)-6-methyl-2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)hept-5-en-2-ol. É um álcool terciário de fórmula molecular  $C_{15}H_{26}O$ , monocíclico, sesquiterpênico, insaturado e opticamente ativo, que provém da condensação de moléculas de acetil CoA. Também conhecido por levomenol, para o isômero natural alfa, trata-se de um líquido ligeiramente amarelado, pouco solúvel em água e que possui massa molar de 222,36 g/mol, temperatura de ebulição em  $153^{\circ}C$  e índice de refração ( $20^{\circ}C$ ) de 1,493 a 1,497 (THE MERCK..., 1996).

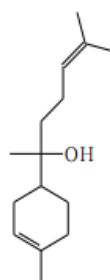


Figura 2 Estrutura química do alfa-bisabolol

Fonte: Altoé (2012)

O alfa-bisabolol apresenta diversas funções biológicas como: inseticida (ANDRADE et al., 2004), antibacteriano (VILA et al., 2010), fungicida (TABANCA et al., 2007) e anti-inflamatório. Pesquisas relatam o seu potencial no tratamento de leishmaniose causada por *Leishmania infantum* (MORALES-YUSTE et al., 2010), contra câncer de pâncreas (SEKI et al., 2011), como gastroprotetor (BEZERRA et al., 2009; LEITE et al., 2009), como atuante no aumento da permeabilidade da membrana de bactérias à antibióticos (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003), como agente pró-apoptótico no tratamento de leucemia aguda (CAVALIERI et al., 2011), na ação seletiva no combate a células tumorais (DARRA et al., 2007), no tratamento de doenças de pele (KIM et al., 2008), como analgésico, antialérgico, antiespasmódico e vermífugo (KAMATOU; VILJOEN, 2010).

Diante da baixa toxicidade, o alfa-bisabolol foi classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Regarded as Safe* (GRAS), ou seja, foi considerado como um aditivo alimentar seguro, estendendo seu uso às indústrias de alimentos (KAMATOU; VILJOEN, 2010). Esse componente está presente na composição de cosméticos, perfumaria, produtos para pele sensível, medicamentos, dentre outros (BHATIA et al., 2008).

Segundo Scolforo et al. (2012), dentre as espécies que apresentam o alfa-bisabolol, a *Eremanthus erythropappus* destaca-se, por ser abundante na natureza e ter a vantajosa combinação de apresentar elevado teor desse álcool, com um rendimento de óleo essencial satisfatório por planta, associado à considerável produção de biomassa por área. Camolesi (2007) afirma que o rendimento médio de alfa-bisabolol, no óleo da candeia pode chegar até a 75% e que a qualidade desse princípio ativo é determinada pelo mercado consumidor que aceita o produto com, no mínimo, 95% de pureza.

Diversos autores (ALTOÉ, 2012; CAMOLESI, 2007; SCOLFORO et al., 2004; SCOLFORO; OLIVEIRA; ACERBI JÚNIOR, 2008) encontraram

variação no rendimento de óleo essencial de diferentes materiais de *E. erythropapus*, tanto em candeais nativos quanto em plantios. A variabilidade das espécies produtoras de óleo possibilita a identificação e seleção de materiais genéticos, procedências e/ou progênies, que apresentem um maior rendimento e qualidade de óleo essencial.

### **2.3 Avaliação das propriedades da madeira por meio da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS)**

Atualmente, os métodos de análises das propriedades da madeira são, geralmente, demorados e caros, o que torna onerosa a análise de um grande número de amostras. As avaliações não destrutivas da madeira são uma opção para a caracterização rápida, simples e confiável, onde as informações sobre o material são obtidas por medidas indiretas, o que reduz o custo e o tempo despendido nas análises de rotina em laboratórios (VIANA et al., 2010).

A espectroscopia no infravermelho próximo (Near Infrared Spectroscopy – NIRS) é um método não destrutivo, capaz de prever propriedades químicas, físicas, mecânicas e anatômicas de diversos materiais (KELLEY et al., 2004; MEDER et al., 1999; SCHIMLECK et al., 1999; SCHIMLECK; EVANS, 2004). A espectroscopia é uma técnica instrumental analítica que se baseia nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética das moléculas em regiões do espectro eletromagnético para obter informações qualitativas e quantitativas da amostra em estudo (PASQUINI, 2003; WORKMAN; WEYWER, 2007). Na espectroscopia NIR, essa região do espectro localiza-se entre 750 e 2.500 nm, o infravermelho próximo.

Após a interação da radiação com o material, captadores registram a intensidade da energia e o equipamento produz um espectro de absorbância,

reflectância ou transmitância, dependendo do modo de funcionamento do espectrômetro. A informação contida no espectro é correlacionada com os valores obtidos por métodos analíticos convencionais. Após essa etapa, um modelo multivariado é calibrado, validado (testado) e utilizado para predição das propriedades de amostras desconhecidas (SANTOS; GOMIDE; SOUSA, 2009; SEFARA; CONRADIE; TURNER, 2000). Segundo Pasquini (2003), o método mais comum de regressão para o desenvolvimento de calibração é o de mínimos quadrados parciais (PLS).

O infravermelho próximo foi a primeira parte não visível do espectro eletromagnético a ser relatada pelo cientista, astrônomo e músico alemão Frederick William Herschel, por volta do ano 1800. Ao utilizar termômetros e prismas de vidros ele observou que a temperatura de objetos expostos à luz branca continuava a subir, mesmo ao fim da região de cor vermelha visível da luz (PASQUINI, 2003). Por muito tempo, a espectroscopia no infravermelho próximo ficou esquecida e apenas a partir da década de 80 houve um maior interesse pela técnica (BURNS; CIURCZAK, 1992).

A técnica do NIRS apresenta diversas vantagens quando comparada aos métodos tradicionais de análise. De acordo com Pasquini (2003), é uma técnica rápida (cerca de um minuto por amostra); não destrutiva; não invasiva; é adequada para o uso em linha de produção; pode ser aplicado em qualquer molécula que apresente ligações C-H, O-H, N-H, S-H e C = O e exige preparo mínimo da amostra. Uma desvantagem é que a precisão das estimativas por NIRS depende da acurácia do método de referência (VIANA et al., 2010).

A área agrícola foi a primeira a fazer uso intensivo da espectroscopia NIR, principalmente na agricultura de precisão (PASQUINI, 2003). Diversos outros setores também utilizam o NIRS, para estudar características quantitativas e qualitativas de suas matérias-primas, como as indústrias farmacêuticas, têxtil (TSUCHIKAWA, 2007), petroquímica (GUCHARDI et al., 1998), de polímeros

(VIEIRA et al., 2002), alimentos (MORGANO et al., 2005); medicina (SEVERCAN; HARIS, 2012), entre outras.

No setor florestal, os primeiros trabalhos que utilizaram a espectroscopia no infravermelho próximo investigaram as propriedades químicas da madeira, como o teor de celulose (BIRKETT; GAMBINO, 1988; EASTY et al., 1990). Atualmente, a técnica tem sido amplamente utilizada na caracterização de matérias-primas de diversas empresas do setor, como o rendimento da polpa celulósica (MORA; SCHIMLECK, 2008; SANTOS; GOMIDE; SOUSA, 2009); rendimento de fenol (ZAHRI et al., 2008); teor de óleo (SOUSA-CORREIA et al., 2007), análise de carvão vegetal (MONTEIRO et al., 2010), cristalinidade de madeira (JIANG et al., 2007), propriedades mecânicas (SCHIMLECK et al., 2002; THUMM; MEDER, 2001) e químicas da madeira (HEIN; LIMA; CHAIX, 2010, MAGALHÃES et al., 2005) e densidade básica (HEIN et al., 2009; HEIN; LIMA; CHAIX, 2009).

Um importante uso dessa técnica está na predição de características da madeira para a seleção de árvores em programas de melhoramento genético (BAILLERES; DAVRIEUX; HAM-PICHAVANT, 2002). Hein et al. (2009) mostraram que é possível ajustar modelos preditivos baseados em regressão dos mínimos quadrados parciais para estimativa da densidade básica em madeiras juvenis de *Eucalyptus*. Viana et al. (2010) desenvolveram modelos de calibração eficientes para estimar as propriedades químicas e a densidade básica da madeira de clones de *Eucalyptus*.

#### **2.4 Diversidade genética através de marcadores morfológicos e moleculares**

A diversidade genética pode ser entendida como a distância genética entre populações, indivíduos ou organismos, baseada em características morfoagronômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Os estudos sobre

diversidade podem estar voltados tanto para o melhoramento genético, quanto para as associações evolutivas e para conservação e manejo de material genético (CRUZ; CARNEIRO; REGAZZI, 2014).

Essa diversidade é importante para entender como as populações naturais se estruturam no tempo e no espaço e quais os efeitos das atividades antrópicas nessa estruturação. Além disso, no melhoramento genético a variabilidade genética que existe em uma população é ferramenta básica para o melhorista definir as estratégias de melhoramento a serem aplicadas. O interesse da diversidade genética para o melhoramento está no fato de que cruzamentos entre genitores geneticamente divergentes podem produzir alto efeito heterótico na progênie e uma maior probabilidade de se obter genótipos superiores em gerações segregantes (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003).

Existem diversas maneiras de avaliar a diversidade genética entre indivíduos e populações, dentre as quais, a utilização de marcadores. Segundo Alfenas et al. (2009), estes podem ser definidos como algumas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares que sejam herdadas geneticamente e possam ser utilizadas na identificação do clone ou cultivar. Segundo os mesmos autores, esses descritores devem ser homogêneos quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo e estáveis quanto à repetição das mesmas características, ao longo de gerações sucessivas.

Por serem de fácil identificação, os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados para avaliar a variabilidade fenotípica entre indivíduos (HOOGENDIJK; WILLIAMS, 2001). A caracterização morfológica é feita com base em observações e/ou mensurações de vários caracteres morfológicos facilmente diferenciáveis a olho nu, denominados de descritores morfológicos. Esses descritores são caracteres altamente herdáveis, normalmente controlados por poucos genes, que se expressam, igualmente, em todos os ambientes (BURLE; OLIVEIRA, 2010). O uso desses marcadores ficou



limitado, em razão de suas características: reduzido número de marcadores e dependência do desenvolvimento da planta (CARVALHO; TORRES, 2002; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Já, os marcadores moleculares, baseados no genótipo do indivíduo, tem o potencial de distinguir genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003; TOPPA; JADOSKI, 2003). Esses marcadores complementam os morfológicos, pois suas análises independem do ambiente, do tipo de tecido e da fase de desenvolvimento da planta (LAHOZ et al., 2011).

Atualmente, existe grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diferentes tipos de estudos genéticos como os RAPDs, RFLPs, AFLPs, SSRs e ISSRs (BENDHIFI et al., 2013; CAIXETA et al., 2006). Dentre estes, destacam-se os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), por apresentarem elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade, relativo baixo custo e por utilizarem *primers* universais, ou seja, *primers* aleatórios, cuja sequência independe da espécie em estudo (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; SALIMATH et al., 1995).

O método ISSR é baseado na amplificação de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que envolve a amplificação de fragmentos de DNA presentes em uma distância amplificável entre dois microssatélites idênticos repetidos, orientados em direções opostas (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). A técnica do ISSR-PCR permite, portanto, a detecção de polimorfismos em locos localizados entre os microssatélites, utilizando sequências simples repetidas como *primers* (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). O polimorfismo é evidenciado quando há presença e ausência de um fragmento de DNA após a amplificação e eletroforese em gel. No caso do ISSR, a fonte de variabilidade pode ser atribuída à amostra do DNA, à natureza do *primer* utilizado ou ao método de detecção (REDDY; SARLA; SIDDIQ,

2002). Os produtos resultantes da amplificação do tipo ISSR segregam como marcadores mendelianos dominantes simples (RATNAPARKHE; TEKEOGLU; MUEHLBAUER, 1998; WANG; MAHALINGAN; KNAP, 1998).

O uso de diferentes tipos de marcadores em conjunto, como os morfológicos e moleculares, permite uma identificação mais completa do material em estudo. Vários trabalhos mostram o uso desses dois tipos de marcadores para identificar genótipos contrastantes (ALMAJALI; ABDEL-GHANI; MIGDADIA, 2012; BENDHIFI et al., 2013; D'IMPERIOA et al., 2011; LAHOZ et al., 2011; LINDÉN; IWARSSON, 2014). Em estudos de diversidade genética em populações naturais de candeia, diversos marcadores já foram utilizados, como os baseados em isoenzimas (BARREIRA et al., 2006), RAPD (ESTOPA et al., 2006) e ISSR (PÁDUA, 2011).

### **3. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A candeia surge no setor florestal brasileiro como uma alternativa e oportunidade de geração de renda em áreas antes degradadas ou sem perspectiva de rentabilidade econômica. Dessa forma, trabalhos que investiguem formas de melhorar a produção de madeira e de óleo essencial são imprescindíveis, pois com materiais mais produtivos, será possível agregar valor ao produto final, resultando em maior rendimento da atividade florestal para os produtores rurais e utilizadores da espécie de forma industrial, diminuindo, dessa forma, a pressão sobre os candeais nativos.

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 442 p.

ALMAJALI, D.; ABDEL-GHANI, A. H.; MIGDADIA, H. Evaluation of genetic diversity among Jordanian fig germplasm accessions by morphological traits and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 8-19, Nov. 2012.

ALTOÉ, T. F. **Sustentabilidade de plantações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) na produção e qualidade de óleo essencial**. 2012. 154 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ANDRADE, I. L. et al. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 19, p. 5879-5881, 2004.

ARAÚJO, L. C. **Vanillosmopsis erythropappa (DC) Sch.Bip: sua exploração florestal**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1944. 58 p.

BAILLÈRES, H.; DAVRIEUX, F.; HAMPICHAVANT, F. Near infrared analysis as a tool for rapid screening of some major wood characteristics in a eucalyptus breeding program. **Forestry Science**, Rotorua, v. 59, n. 5/6, p. 479-490, July/Oct. 2002.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil, seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 624 p.

BARREIRA, S. et al. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 1, n. 71, p. 119-130, ago. 2006.

BARRETO, A. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F. **Inteligência vegetal na arte da sedução: interações biológicas, evolução, utilização, extração, identificação**,

química e farmácia de óleos essenciais de plantas. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 116 p.

BENDHIFI, M. et al. Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus indica*) cultivars by RAPD markers and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 158, n. 1, p. 1-7, July 2013.

BEZERRA, S. B. et al. Bisabolol-Induced Gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP + channels. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 12, n. 6, p. 1403-1406, 2009.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on  $\alpha$ -bisabolol. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 11, p. 72-76, 2008. Supplement.

BIRKETT, M. D.; GAMBINO, M. J. T. Potential applications for Near Infrared Spectroscopy in the pulping industry. **Paper Southern Africa**, Pretoria, v. 11, n. 12, p. 34-38, 1988.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apitone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, 2003.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. do S. P. **Manual de curadores de germoplasma-vegetal: caracterização morfológica**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 15 p.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis**. New York: M. Dekker, 1992. 834 p.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 9-78.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68.

CAMOLESI, J. F. **Volúmetria e teor  $\alpha$ -bisabolol para a candeia *Eremanthus erythropappus***. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CARVALHO, D.; TORRES, G. A. **Marcadores moleculares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 35 p.

CAVALIERI, E. et al. Pro-apoptotic activity of  $\alpha$ -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 9, p. 1-13, Apr. 2011.

CHAGAS, M. P.; TOMAZELLO FILHO, M.; LISI, C. S. Caracterização macro e microscópica da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 156-158, jul. 2007. Suplemento 1.

CHAVES, M. M. F.; RAMALHO, R. S. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip e *Vernonia discolor* (Spreng.) Less). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 1-7, jan./fev. 1996.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. v. 1, 433 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2014. v. 2, 668 p.

D'IMPERIOA, M. et al. Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 229-240, Aug. 2011.

DARRA, E. et al. Alpha-bisabolol: unexpected plant-derived weapon in the struggle against tumour survival? **Italian Journal of Biochemistry**, New York, v. 56, n. 4, p. 323-328, 2007.

DAVIDE, A. C. et al. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de candeinha (*Eremanthus incanus* Less.) - Asteraceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 127-133, 2000.

DAVIDE, A. C. et al. Estudo morfo-anatômicos, bioquímicos e fisiológicos durante a germinação de sementes de candeia (*Eremanthus erythropappus*) (DC.) MacLeish. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 171-176, 2008.

DAVIDE, A. C.; TONETTI, O. A. O.; SILVA, E. A. A. da. Improvement to the physical quality and imbibition pattern in seeds of candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less.). **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 321-326, 2011.

DUTRA, R. C. et al. Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeisch, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 6, p. 818-824, dez. 2010.

EASTY, D. B. et al. Near infrared Spectroscopy for the analysis of wood pulp: quantifying hardwood-softwood mixtures and estimating lignin content. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 73, n. 10, p. 257-261, 1990.

ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 97-106, set. 2006.

FEITOSA, S. S. et al. Estudos de viabilidade de sementes de candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por meio de testes de germinação e raios X. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 2, p. 393-399, abr./jun. 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

GALDINO, A. P. P. et al. Estudo sobre o rendimento e qualidade do óleo de candeia (*Eremanthus ssp*) e a influência das diferentes origens comerciais de sua madeira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 44-46, 2006.

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

GUCHARDI, R. et al. Determination of ethanol and methyl tert-butyl ether (MTBE) in gasoline by NIR–AOTF-based spectroscopy and multiple linear regression with variables selected by genetic algorithm. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Chichester, v. 6, n. 1, p. 333-339, 1998.

HEIN, P. R. G. et al. Near infrared spectroscopy for estimating wood basic density in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis*. **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 2, p. 133-141, abr./jun. 2009.

HEIN, P. R. G.; LIMA, J. T.; CHAIX, G. Effects of sample preparation on NIR spectroscopic estimation of chemical properties of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake wood. **Holzforschung**, Berlin, v. 64, n. 1, p. 45-54, Dec. 2010.

HEIN, P. R. G.; LIMA, J. T.; CHAIX, G. Robustness of models based on near infrared spectra to predict the basic density in *Eucalyptus urophylla* wood. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Chichester, v. 17, n. 3, p. 141-150, 2009.

HOOGENDIJK, M.; WILLIAMS, D. E. Characterizing the genetic diversity of home garden crops: some examples from the Americas. In: INTERNATIONAL HOME GARDENS WORKSHOP: CONTRIBUTION OF HOME GARDENS AND IN SITU CONSERVATION OF PLANT GENETIC RESOURCES IN FARMING SYSTEMS, 2., 2001, Berlin. **Proceedings...** Berlin: IPGRI, 2001. p. 34-40.

JIANG, Z. H. et al. Rapid prediction of wood crystallinity in *Pinus elliotii* plantation wood by near-infrared spectroscopy. **Journal of Wood Science**, London, v. 53, n. 5, p. 449-453, Oct. 2007.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of  $\alpha$ -Bisabolol and  $\alpha$ -Bisabolol-Rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KELLEY, S. S. et al. Use of near infrared spectroscopy to predict the mechanical properties of six softwoods. **Holzforschung**, Berlin, v. 58, n. 3, p. 252-260, May/June 2004.

KIM, S. et al. Mechanisms of depigmentation by  $\alpha$ -bisabolol. **Journal of Dermatological Science**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 219-222, 2008.

LAHOZ, I. et al. Using molecular markers, nutritional traits and field performance data to characterize cultivated cardoon germplasm resources. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 188-197, Aug. 2011.

LEITE, G. O. et al. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. **Fitoterapia**, Milano, v. 80, n. 1, p. 77-80, 2009.

LINDÉN, L.; IWARSSON, M. Identification of weeping crabapple cultivars by microsatellite DNA markers and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 221-226, Nov. 2014.

LOEUILLE, B.; LOPES, J. C.; PIRANI, J. R. Taxonomic novelties in *Eremanthus* (Compositae: Veronieae) from Brazil. **The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens**, Kew, v. 67, n. 1, p. 1-9, Mar. 2012.

MACLEISH, N. F. F. Revision of *Eremanthus* (Compositae: Vernonieae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 47, n. 2, p. 265-290, 1987.

MAGALHÃES, W. L. E. et al. Determinação de propriedades químicas e anatômicas de madeira com o uso da reflexão difusa de infravermelho próximo. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 50, p. 25-36, jan./jun. 2005.

MEDER, R. et al. Rapid determination of the chemical composition and density of *Pinus radiata* by PLS modelling of transmission and diffuse reflectance FTIR spectra. **Holzforschung**, Berlin, v. 53, n. 3, p. 261-266, May 1999.

MELO, L. A. **Seleção e resgate de árvores superiores de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MELO, L. A. et al. Crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eremanthus erythropappus* sob diferentes formulações de substrato. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 21, n. 2, p. 234-242, 2014.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 4, p. 1235-1248, July 2003.

MONTEIRO, T. C. et al. Use of a near infrared spectroscopy to distinguish carbonization processes and charcoal sources. **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 3, p. 381-390, jul./set. 2010.

MORA, C. R.; SCHIMLECK, L. R. On the selection of samples for multivariate regression analysis: application to nearinfrared (NIR) calibration models for the prediction of pulp yield in *Eucalyptus nitens*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 38, n. 10, p. 2626-2634, 2008.

MORALES-YUSTE, M. et al. Activity of(-)- $\alpha$ -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 3/4, p. 279-281, 2010.



- MORGANO, M. A. et al. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 25-31, jan./mar. 2005.
- MORI, C. L. S. O. et al. Influence of altitude, age and diameter on yield and  $\alpha$ -bisabolol content of candeia trees (*Eremanthus erythropappus*). **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2009.
- MORI, C. L. S. O.; MORI, F. A.; MENDES, L. M. Caracterização anatômica e, química e física da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus* DC. MacLeish). **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 4, p. 451-456, jul./set. 2010.
- OLIVEIRA, A. D.; ANDRADE, I. S.; SCOLFORO, J. R. S. Análise econômica do manejo sustentável da candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 281-293.
- OLIVEIRA, A. D. et al. Market chain analysis of candeia timber (*Eremanthus erythropappus*). **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 257-264, jul./set. 2009.
- OLIVEIRA, G. M. V. et al. Tamanho e forma de parcelas experimentais para *Eremanthus erythropappus*. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2011.
- PÁDUA, J. A. R. **Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish no Estado de Minas Gerais**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.
- PERÉZ, J. F. M. **Sistema de manejo para a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2001. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- RATNAPARKHE, M. B.; TEKEOGLU, M.; MUEHLBAUER, F. J. Intersimple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 4, p. 515-519, Sept. 1998.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, n. 1, p. 9-17, Nov. 2002.

REZENDE, A. A. **Enraizamento de estacas de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2007. 85 p. (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: E. Blücher, 1979. 296 p.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327 p.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SALIMATH, S. S. et al. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, Ottawa, v. 38, n. 4, p. 757-763, Aug. 1995.

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2004. 6 p. (Comunicado Técnico).

SANTOS, R. B.; GOMIDE, J. L.; SOUSA, L. C. Predição de qualidade da madeira e da polpa celulósica por espectroscopia de infravermelho próximo (nirs). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 4, p. 759-767, 2009.

SCHIMLECK, L. R. et al. Estimation of basic density of *Eucalyptus globulus* using near-infrared spectroscopy. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 29, p. 194-201, 1999.

SCHIMLECK, L. R. et al. Estimation of wood stiffness of increment cores by near-infrared spectroscopy. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 32, n. 1, p. 129-135, 2002.

SCHIMLECK, L. R.; EVANS, R. Estimation of *Pinus radiata* D. Don tracheid morphological characteristics by near infrared spectroscopy. **Holzforschung**, Berlin, v. 58, n. 1, p. 66-73, Feb. 2004.

SCOLFORO, J. R. S. et al. Estimativa de volume, peso seco, peso de óleo e quantidade de moirões para a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 89-102, 2004.

SCOLFORO, J. R. S.; LOEUILLE, B.; ALTOÉ, T. F. Caracterização da candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 19-27.

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; ACERBI JÚNIOR, F. W. **Inventário florestal de Minas Gerais: equações de volume, peso de matéria seca e carbono para diferentes fisionomias da flora nativa**. Lavras: UFLA, 2008. 216 p.

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. 329 p.

SEFARA, N. L.; CONRADIE, D.; TURNER, P. Progress in the use of near-infrared absorption spectroscopy as a tool for the rapid determination of pulp yield in plantation eucalypts. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 53, n. 11, p. 15-17, 2000.

SEKI, T. et al. Antitumor effects of  $\alpha$ -bisabolol against pancreatic cancer. **Cancer Science**, Tokyo, v. 102, n. 12, p. 2199-2205, 2011.

SEVERCAN, F.; HARIS, P. I. Vibrational spectroscopy in diagnosis and screening. **Advances in Biomedical Spectroscopy**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2012.

SILVA, A. C. et al. Variações genéticas na qualidade do sistema radicular de mudas de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 609-617, jul./ago. 2007.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1104 p.

SOUSA-CORREIA, C. et al. Oil content estimation of individuals kernels of *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* [(Lam) O. Schwarz] acorns by Fourier transform near infrared spectroscopy and partial least squares regression. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Chichester, v. 15, n. 4, p. 247-260, 2007.

- TABANCA, N. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 21, p. 8430-8435, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TEIXEIRA, M. C. B. et al. Influência da luz na germinação de sementes de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip). In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICA, 28., 1996, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBB, 1996. p. 35-41.
- THE MERCK index. 12<sup>th</sup> ed. London: Chapman and Hill, 1996.
- THUMM, A.; MEDER, R. Stiffness prediction of radiata pine clearwood test pieces using near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Chichester, v. 9, n. 2, p. 117-122, 2001.
- TONETTI, O. A. O.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. da. Qualidade física e fisiológica de sementes de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 114-121, 2006.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2013.
- TSUCHIKAWA, S. A review of recent near infrared research for wood and paper. **Applied Spectroscopy Reviews**, London, v. 42, n. 1, p. 43-71, 2007.
- VENTURIN, N. et al. Adubação Mineral da Candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Revista Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 211-219, maio/ago. 2005.
- VIANA, L. C. et al. Modelos de calibração e a espectroscopia no infravermelho próximo para predição das propriedades químicas e da densidade básica da madeira de *Eucalyptus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 2, p. 367-376, abr./jun. 2010.
- VIEIRA, R. A. M. et al. Closed-loop composition and molecular weight control of a copolymer latex using near-infrared spectroscopy. **Industrial &**

**Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 41, n. 12, p. 2915-2930, 2002.

VILA, R. et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of  $\alpha$ -bisabolol. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 7, p. 2510-2514, 2010.

VITTI, A. M. S.; BRITO, O. J. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 26 p. (Documentos Florestais).

WANG, G.; MAHALINGAN, R.; KNAP, H. T. (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 8, p. 1086-1096, June 1998.

WORKMAN, J.; WEYWER, L. **Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy**. Boca Raton: CRC, 2007. 332 p.

ZAHRI, S. et al. Quantitative assessment of total phenols content of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) by diffuse reflectance NIR spectroscopy on solid wood surfaces. **Holzforschung**, Berlin, v. 62, n. 6, p. 679-687, Jan. 2008.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR): anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, Ottawa, v. 20, n. 2, p. 176-183, Mar. 1994.

## SEGUNDA PARTE – Artigos

### **ARTIGO 1 - Diversidade genética entre clones de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por marcadores morfológicos e moleculares**

Janice Ferreira do Nascimento; Antônio Claudio Davide; Dulcinéia de Carvalho;  
Lucas Amaral de Melo

**RESUMO** – Conduziu-se, este trabalho, com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre clones de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish, por meio de suas características morfológicas e moleculares. Foram analisados 17 clones de candeia provenientes de um teste clonal com 20 meses de idade, instalado em Lavras-MG. Foram avaliadas oito características morfológicas (área foliar, comprimento e largura das folhas, comprimento do pecíolo, forma da margem foliar, ápice e base da folha e ângulo de inserção dos galhos no fuste principal) e nove *primers* ISSR foram utilizados para avaliar a divergência. Foi utilizada a distância de Mahalanobis, com base nos dados morfológicos e o coeficiente de Jaccard, com base nos marcadores ISSR para estimar a distância genética entre os clones e o método de agrupamento UPGMA. Em ambas as análises, foram observadas divergência entre os clones. De acordo com a matriz de distâncias de Mahalanobis, foram formados quatro grupos distintos e, com base no coeficiente de Jaccard, observou-se a formação de seis grupos. Além de constatar a existência de variabilidade genética entre os clones avaliados, as informações obtidas podem ser usadas para definir futuras estratégias a serem adotadas no programa de melhoramento genético da espécie.

**Palavras-chave:** Candeia; Dissimilaridade genética; Marcadores ISSR.

**ABSTRACT** - The purpose of this study was to assess genetic diversity of clones of *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish by means of morphological and molecular markers. Seventeen clones of Candeia from a clonal test about 20-month-old, established in Lavras, State of Minas Gerais, were analyzed. Eight morphological markers were assessed, namely, leaf area; leaf length and width; petiole length; shape of leaf margins, apex and base, and branches insertion angle on the trunk. Nine ISSR primers were used to assess diversity. The Mahalanobis distance based on morphological data was used, and

the Jaccard coefficient based on ISSR marker was used to estimate genetic distance between clones, as well as the unweighted pair-group method with arithmetic mean. Divergences between clones were found in all analyses. According to Mahalanobis distance matrix, four distinct groups were formed, and six groups were formed based on Jaccard coefficient. Besides finding genetic variability between clones, these data may be used to define future strategies to be adopted in plant breeding programs for this specie.

**Key-words:** Candeia. Genetic dissimilarity. ISSR markers.

## 1. INTRODUÇÃO

A candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish) é uma espécie florestal de uso múltiplo pertencente à família Asteraceae, de ocorrência nos Cerrados e Campos Rupestres do Planalto Central Brasileiro (SCOLFORO; LOEUILLE; ALTOÉ, 2012). Sua madeira tem grande importância econômica, pois é utilizada para a confecção de moirões de cerca e para a extração de óleo essencial, cujo princípio ativo, o alfa-bisabolol, é amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (BHATIA et al., 2008).

Pela sua importância econômica, a candeia já foi objeto de vários estudos sobre o rendimento e a caracterização de seu óleo essencial (ALTOÉ et al., 2012; CAMOLESI, 2007; MORI et al., 2012). Dentre esses estudos, Galdino et al. (2006) demonstraram haver diferenças entre o rendimento de óleo essencial e o teor de alfa-bisabolol, quando se comparam diferentes materiais genéticos da espécie. Nesse sentido, estabelecer um programa de melhoramento no qual se conheça a variabilidade genética dessa espécie é de fundamental importância para que se possam selecionar as procedências, progênies ou clones com maior potencial de produção de alfa-bisabolol e adaptados para diversos ambientes (DAVIDE et al., 2012).

Essa variabilidade genética presente na população base é importante na implantação de pomares de sementes clonais, onde é possível a manipulação e

obtenção de propágulos com melhor qualidade genética para a produção de mudas, além de possibilitar a realização de cruzamentos controlados como forma de obter novos materiais genéticos. Portanto, ao se realizar cruzamentos entre genitores divergentes, as chances de se obter indivíduos geneticamente superiores nas próximas gerações aumentam (CROSSA; FRANCO, 2004; MOHAMMADI; PRASANNA, 2003; SUDRÉ et al., 2010).

Existem diversas maneiras de avaliar a diversidade genética entre indivíduos e populações, dentre as quais, a utilização de marcadores. De acordo com Alfenas et al. (2009), os marcadores estão relacionados a características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares que sejam herdadas geneticamente e possam ser utilizadas na identificação do clone ou cultivar. Além disso, esses marcadores devem ser homogêneos quanto as suas características em cada ciclo reprodutivo e estáveis quanto à repetição das mesmas características ao longo de gerações sucessivas.

Por serem de fácil identificação, os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados para avaliar a variabilidade fenotípica entre indivíduos, conforme discutido por Hoogendijk e Williams (2001). Esses marcadores são características altamente herdáveis, normalmente controlados por poucos genes e que se expressam igualmente em todos os ambientes (BURLE; OLIVEIRA, 2010). Porém, o reduzido número de marcadores morfológicos e a dependência do desenvolvimento da planta são algumas limitações importantes (CARVALHO; TORRES, 2002; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Apesar das limitações, Hoogendijk e Williams (2001) recomendam a caracterização morfológica como um primeiro passo antes de iniciar os estudos baseados em marcadores moleculares.

Já, os marcadores moleculares, baseados no genótipo do indivíduo, tem o potencial de distinguir genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003; TOPPA; JADOSKI, 2003).



As vantagens desses marcadores é que são independentes do ambiente, do tipo de tecido e da fase de desenvolvimento da planta (LAHOZ et al., 2011).

Atualmente, existe grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diferentes tipos de estudos genéticos como os RAPDs, RFLPs, AFLPs, SSRs e ISSRs (BENDHIFI et al., 2013; CAIXETA et al., 2006). Dentre estes, destacam-se os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), por apresentarem elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade, relativo baixo custo e por utilizarem *primers* universais, ou seja, *primers* aleatórios, cuja sequência independe da espécie em estudo (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; SALIMATH et al., 1995). Em estudos de diversidade genética em populações naturais de candeia, diversos marcadores já foram utilizados, como os baseados em isoenzimas (BARREIRA, 2005; MOURA, 2005), RAPD (ESTOPA et al., 2006) e ISSR (PÁDUA, 2011).

O uso de diferentes tipos de marcadores em conjunto permite uma identificação mais completa do material em estudo. Vários trabalhos mostram o uso de marcadores moleculares e morfológicos para identificar genótipos contrastantes (ALMAJALI; ABDEL-GHANI; MIGDADIA, 2012; BENDHIFI et al., 2013; D'IMPERIOA et al., 2011; LAHOZ et al., 2011; LINDÉN; IWARSSON, 2014). Dessa forma, neste trabalho objetivou-se avaliar a diversidade genética em clones de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por meio de marcadores morfológicos e moleculares.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### *2.1 Material vegetal e localização da área de estudo*

Os clones utilizados neste trabalho foram obtidos, a partir da seleção de árvores em um teste de procedências/progênes, originalmente com 4.872

plantas, instalados no município de Baependi – MG, segundo a metodologia de Melo (2012). A partir da seleção, resgate e clonagem desses materiais genéticos, foi implantado um minijardim clonal no Viveiro Florestal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e iniciada a propagação desses clones por meio do processo de miniestaquia.

Com a obtenção das mudas propagadas vegetativamente, em dezembro de 2012 foi instalado um teste clonal com 17 clones de *E. erythropappus*, em Lavras – MG. O teste clonal possui uma área de 4142 m<sup>2</sup>, com 11 linhas de 100 m cada, onde foram distribuídas 363 mudas em um arranjo espacial de 3 x 3 m, contando com 33 plantas/linha e 17 clones. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos incompletos.

O clima do município de Lavras é do tipo Cwa, conforme a classificação climática de Köppen. A temperatura média anual está em torno de 19,3°C, tendo, no mês mais quente e no mês mais frio, temperaturas médias de 22,1° e 15,8°, respectivamente. A precipitação anual normal é de 1.530 mm, a evaporação total do ano é igual a 1.343 mm e a umidade relativa média anual de 76% (BRASIL, 1992).

## *2.2 Avaliação e análise dos marcadores morfológicos em clones de E. erythropappus*

Para a caracterização morfológica, aos 20 meses de idade, foram selecionadas cinco plantas de cada clone presente no teste clonal, totalizando 85 plantas avaliadas. Foram selecionadas plantas sadias (plantas que não apresentavam sintomas de ataques por pragas e doenças) e com bom crescimento vegetativo. De cada planta, foram avaliadas as seguintes características: área foliar, comprimento e largura das folhas, comprimento do

pecíolo, margem foliar, ápice e base da folha e ângulo de inserção dos galhos no fuste principal da planta.

Para os caracteres relacionados à folha, como as árvores apresentaram altura média de 2,31 metros, a copa de cada árvore foi dividida em três posições: ápice, meio e base da copa, sendo coletadas três folhas de cada posição. As folhas, recém coletadas, foram digitalizadas em Scanner Hp Photosmart C4480. O software ImageJ® foi utilizado para o dimensionamento da área foliar, do comprimento e largura das folhas e do comprimento do pecíolo. A classificação do tipo de margem, do ápice e da base das folhas foi feita de acordo com Vidal e Vidal (2007). Assim, conforme realizado para as folhas, o ângulo de inserção dos galhos no fuste principal foi avaliado em três posições na copa da planta, obtendo-se duas medidas em cada posição com o auxílio de um transferidor de 180°.

A análise estatística foi realizada, utilizando o delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema de parcelas subdivididas. A unidade de parcela foi constituída pelas plantas dos clones em cinco repetições, e a subparcela compreendeu as três posições na copa da planta (ápice, meio e base). Realizou-se a análise de variância e o teste de média de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

Para avaliar a divergência genética entre os 17 clones foi adotada a distância de Mahalanobis ( $D^2$ ) como medida de dissimilaridade, por meio da expressão:

$$D_{ii'}^2 = \delta' \Psi^{-1} \delta \quad (1)$$

Em que:

$D_{ii'}^2$  = Distância de Mahalanobis entre os genótipos  $i$  e  $i'$ ;

$\Psi$  = Matriz de variâncias e covariâncias residuais;

$\delta' = [d_1 \ d_2 \ \dots \ d_v]$ , sendo  $d_j = Y_{ij} - Y_{i\cdot}$ ;

$Y_{ij}$  = média do  $i$ -ésimo genótipo em relação à  $j$ -ésima variável.

Além disso, foi possível estimar a contribuição relativa dos caracteres para a divergência genética, utilizando o critério proposto por Singh (1981), por meio da avaliação da contribuição desses caracteres para os valores de  $D^2$ . A partir da matriz de dissimilaridade, foi construído um dendrograma pelo critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*), utilizando o Software genético-estatístico GENES (CRUZ, 2006) para o processamento dos dados.

### 2.3 Avaliação e análise dos marcadores ISSR em clones de *E. erythropappus*

Para a análise molecular dos clones, foram coletadas folhas juvenis de dois indivíduos de cada clone, totalizando 34 amostras, que foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas em freezer até o momento da extração do DNA.

Para a extração do DNA, foi utilizado o protocolo do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com modificações. Nesse método, utilizou-se entre 150 e 200 mg de tecido foliar de cada indivíduo para maceração, utilizando polivinilpirrolidona (PVP insolúvel). Adicionaram-se 800  $\mu$ L de tampão de extração pré-aquecido a 65°C. O tampão constitui-se de 2% de CTAB (cationic hexadecyl bromide), Tris HCL 1M (pH 8,0), EDTA (ethylenediaminetetracetate) 0,2 M (pH8,0), NaCl 1,4 M, 1% PVP (40) e 0,2 % de  $\beta$ -mercaptoetanol. Após a maceração, o material identificado e homogeneizado foi colocado em tubos de 2 mL e colocado em banho-maria por 60 minutos a 65°C, com agitações periódicas em intervalos de 10 minutos.

A primeira extração dos ácidos nucléicos foi realizada com 600  $\mu\text{L}$  de solvente orgânico clorofórmio álcool isoamílico na proporção de 24 partes de clorofórmio para uma parte de álcool isoamílico (CAI 24:1). Em seguida, os tubos foram agitados manualmente, durante cinco minutos. As amostras foram colocadas em centrifugação (12.000 rpm), por dez minutos, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. O sobrenadante foi retirado, e transferido para novo tubo, no qual se adicionaram 60  $\mu\text{L}$  de solução 10% CTAB e 1,4 M NaCl. Após homogeneização, nova extração com 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi feita e as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por dez minutos. A nova fase aquosa superior foi transferida para novo tubo, adicionando-se 450  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado e deixado para precipitar (overnight) no freezer.

Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 12.000 rpm, a 4°C. Posterior a essa etapa, formou-se um pellet visível, contendo o DNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, por cinco minutos. Após nova centrifugação (10.000 rpm por cinco minutos), o etanol foi descartado. O pellet foi lavado novamente com etanol a 100% por cinco minutos. Após a lavagem, as amostras foram secas em temperatura ambiente até total evaporação do etanol. O DNA foi ressuspendido em 100  $\mu\text{L}$  de solução TE (1% v/v Tris-HCL 1M pH 8,0 e 0,2% v/v de EDTA 0,5 M pH 8,0 com água ultrapura autoclavada). As amostras de DNA foram acondicionadas em freezer a -20°C. Realizaram-se diluições padronizadas em todas as amostras para realização da reação de amplificação, utilizando-se 1  $\mu\text{L}$  do DNA ressuspendido e adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  de TE (diluição 1:100).

Foram utilizados nove *primers* ISSR (UBC825, UBC834, UBC807, UBC841, UBC844, UBC857, UBC848, Manny e Mao) (PÁDUA, 2011) nas amostras de DNA. As reações foram preparadas em microplacas para PCR (PCR – 96 – Axygen Scientific), sendo aplicada, em cada poço, a alíquota de 2  $\mu\text{L}$  do

DNA diluído (1:100). Às amostras de DNA foram acrescentados 10 µL de coquetel de reação, contendo: 1,2 µL de tampão PCR 10X (constituído de 500 mM de TrisHCl pH 8,0; 200 mM de KCl; 2,5 ng/mL de BSA; 200 mM de Tartazine e 1% de Ficol, 1,2 µL de dNTP + MgCl<sub>2</sub> (dNTP a 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> a 25 mM), 0,15 µL de Taq polimerase (5 u/µL) e 2 µL de primer, completando o volume final com água ultrapura (5,45 µL).

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700, onde as amostras sofreram desnaturação inicial a 94°C, por dois minutos, seguida de 37 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C e um minuto a 72°C. Ao final do último ciclo, a extensão final foi por sete minutos, a 72°C.

Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (5 mg/ml). As corridas eletroforéticas foram efetuadas em cuba horizontal (Bio-Rad Sub-Cell®, modelo 192) em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato EDTA) com duração de 2 horas e 30 minutos, a 70 V.

Após a eletroforese, os géis foram retirados da cuba e levados para transluminador de luz ultravioleta onde foram fotodocumentados por meio do software de análise de imagens UVP Doc Itls. Os géis foram interpretados quanto à presença (1) e ausência (0) de fragmentos amplificados de DNA. Com base nesses resultados, construiu-se uma matriz de dados binários em que se avaliou o nível de polimorfismo dos indivíduos. Cada fragmento amplificado foi considerado como um loco. Os fragmentos que apresentaram coloração fraca ou difícil definição foram descartados da análise.

Para a análise da variabilidade genética entre os clones, utilizou-se o software POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1997), em que, para dados dominantes, assume que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Foram estimados a porcentagem de locos polimórficos, o índice de

Shannon (I) e a diversidade genética de Nei (He) (NEI, 1978). O programa NTSYS, versão 2.11 (ROHLF, 2000), foi utilizado para estimar a similaridade genética ( $sg_{ij}$ ) entre os clones, usando o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908), por meio da seguinte expressão:

$$sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c} \quad (2)$$

Sendo:

$sg_{ij}$  = similaridade genética entre os clones;

$a$  – número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;

$b$  – número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo  $i$ ;

$c$  – número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo  $j$ .

A representação das similaridades foi feita pela construção de um dendrograma para a população. O dendrograma foi definido pelo critério de agrupamento UPGMA, adotando a rotina SAHN (*Sequential Agglomerative, Hierarchical and Nested Clustering*) no software NTSYS versão 2.11 (ROHLF, 2000).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização morfológica dos clones *E. erythropappus*

Com relação à caracterização morfológica, observou-se variação entre os clones de candeia, a partir dos nove descritores morfológicos avaliados, principalmente nas folhas para as quais foram observadas diferenças visuais significativas em termos de tamanho e forma (Figura 1).

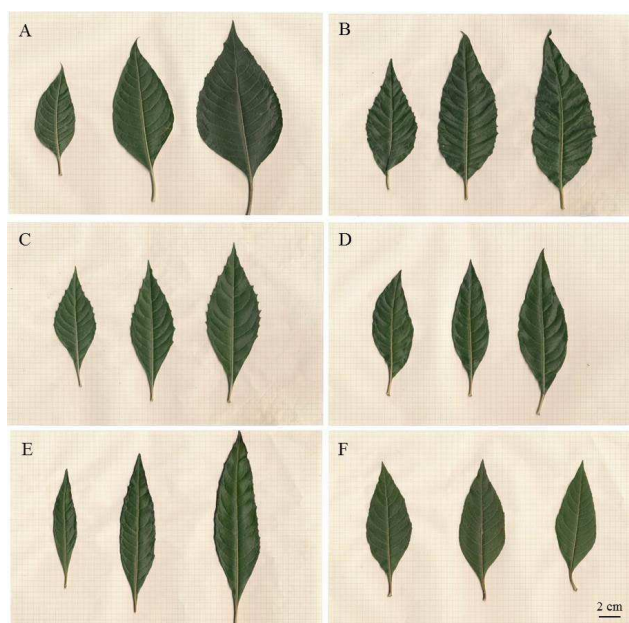


Figura 1 – Variações fenotípicas em folhas de clones de *E. erythropappus* em um teste clonal com 20 meses de idade. A – Clone 07; B – Clone 02; C – Clone 03; D – Clone 06; E – Clone 13; F – Clone 05. Para cada clone, e cada posição da copa, foram fotografadas três folhas coletadas aleatoriamente

Todos os caracteres analisados por meio da análise de variância revelaram a existência de variabilidade genética entre os clones a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (Tabela 1).



Tabela 1 – Média dos valores mensurados para os caracteres morfológicos relacionados às folhas em três posições da copa (ápice, meio e base da copa) de 17 clones de *E. erythropappus* em um teste clonal aos 20 meses de idade em Lavras – MG.

Continua

Clone	Área foliar (cm <sup>2</sup> )			Comprimento (cm)			Largura (cm)			Comprimento pecíolo (cm)		
	Ápice	Meio	Base	Ápice	Meio	Base	Ápice	Meio	Base	Ápice	Meio	Base
1	31,47	34,30	30,26	11,68	12,00	11,43	4,03	4,27	3,79	1,38	1,39	1,28
	Ba	Ba	Ba	Ca	Ba	Aa	Ca	Ca	Da	Ba	Ca	Ca
2	36,47	36,82	30,84	11,60	11,34	10,28	4,64	4,81	4,29	1,14	1,16	1,15
	Ba	Aa	Ba	Ca	Ba	Bb	Ba	Ba	Ca	Ba	Da	Da
3	33,67	32,24	29,47	12,06	11,95	11,38	4,26	4,12	3,94	1,37	1,33	1,28
	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	Aa	Ca	Ca	Ca	Ba	Ca	Ca
4	45,17	43,77	37,68	11,62	11,87	10,84	5,42	5,23	4,78	1,63	1,60	1,32
	Aa	Aa	Ab	Ca	Ba	Ba	Aa	Aa	Bb	Aa	Ba	Cb
5	26,73	27,35	24,19	10,70	10,96	10,07	3,79	3,92	3,70	1,22	0,93	1,03
	Ba	Ba	Ba	Da	Ba	Ba	Da	Da	Da	Ba	Da	Da
6	34,69	39,57	32,19	11,57	11,99	11,32	4,33	4,66	3,94	1,18	1,50	1,42
	Bb	Aa	Bb	Ca	Ba	Aa	Ca	Ba	Cb	Bb	Ba	Ca
7	43,74	39,17	40,71	12,31	11,84	11,74	5,64	5,21	5,32	1,87	2,11	2,38
	Aa	Aa	Aa	Ba	Ba	Aa	Aa	Aa	Aa	Ab	Ab	Aa
8	36,00	37,01	38,25	12,36	11,74	12,07	4,16	4,43	4,46	1,70	1,62	1,79
	Ba	Aa	Aa	Ba	Ba	Aa	Ca	Ca	Ba	Aa	Ba	Ba
9	33,20	35,55	29,74	12,27	12,59	11,71	3,86	3,99	3,53	1,23	1,38	1,39
	Ba	Ba	Ba	Ba	Aa	Aa	Da	Da	Da	Ba	Ca	Ca
10	40,00	39,76	33,53	13,14	12,69	11,92	4,40	4,64	3,92	1,52	1,23	1,37
	Aa	Aa	Bb	Aa	Aa	Ab	Ca	Ba	Cb	Aa	Ca	Ca

Tabela 1, conclusão

Clone	Área foliar (cm <sup>2</sup> )			Comprimento (cm)			Largura (cm)			Comprimento pecíolo (cm)		
	Ápice	Meio	Base	Ápice	Meio	Base	Ápice	Meio	Base	Ápice	Meio	Base
11	34,94	41,42	31,20	12,49	12,74	11,24	4,21	4,77	4,02	1,58	1,72	1,57
	Bb	Aa	Bb	Ba	Aa	Ab	Cb	Ba	Cb	Aa	Ba	Ba
12	35,76	43,36	32,70	10,86	11,65	10,12	4,80	5,40	4,69	1,80	1,98	1,83
	Bb	Aa	Bb	Db	Ba	Bb	Bb	Aa	Bb	Aa	Aa	Ba
13	29,84	30,98	30,64	12,99	12,67	12,31	3,34	3,57	3,47	1,17	1,56	1,40
	Ba	Ba	Ba	Aa	Aa	Aa	Da	Da	Da	Bb	Ba	Ca
14	32,96	28,98	29,64	13,03	11,79	11,61	3,74	3,65	3,55	1,41	1,49	1,67
	Ba	Ba	Ba	Aa	Bb	Ab	Da	Da	Da	Ba	Ba	Ba
15	37,46	42,44	34,22	13,30	13,29	11,87	4,12	4,69	4,17	0,91	1,10	1,05
	Bb	Aa	Bb	Aa	Aa	Ab	Cb	Ba	Cb	Ba	Da	Da
16	34,90	33,71	33,66	12,29	11,85	11,65	4,36	4,31	4,22	1,33	1,60	1,67
	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	Aa	Ca	Ca	Ca	Bb	Ba	Ba
17	31,96	33,01	28,81	11,83	11,82	10,78	4,05	4,25	4,05	1,30	1,76	1,63
	Ba	Ba	Ba	Ca	Ba	Bb	Ca	Ca	Ca	Bb	Ba	Ba

Para cada característica, letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

As maiores variações, com relação ao tamanho das folhas, foram entre os clones 5 e 7, que apresentaram valores de área foliar de 27,35 e 43,74 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Com relação ao comprimento da lâmina foliar, foram observadas variações entre 10,07 a 13,30 cm nos clones 05 e 15, respectivamente. Os clones 13 e 07 foram os mais contrastantes com relação à largura da lâmina foliar, com valores entre 3,34 e 5,64 cm (Tabela 1).

Dutra et al. (2010), ao realizarem uma caracterização morfoanatômica em folhas de *E. erythropappus* observaram folhas de 8 a 15 cm de comprimento por 5 a 8 cm de largura, valores parecidos com os encontrados neste trabalho. Os autores ainda descrevem as folhas de candeia como alternas ou fasciculadas, papiráceas a coriáceas, com margem inteira, oblongo-elípticas a ovaladas, de ápice obtuso ou acuminado, base obtusa, margem inteira. Nos clones de candeia avaliados neste estudo, foram observadas algumas diferenças quanto ao tipo de margem, onde além do tipo inteira, as margens onduladas e denteadas também foram observadas. A margem inteira foi observada em 64,7% dos clones (clones 1, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15 e 16), margem do tipo ondulada 23,5% (clones 2, 8, 13 e 14) e 11,8% dos clones com margem denteada (clones 3 e 17) (Figura 2).

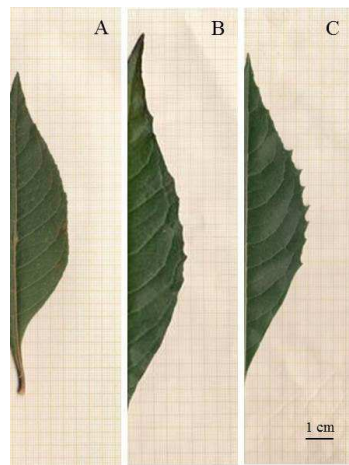


Figura 2 – Exemplos de variações fenotípicas na margem das folhas de *E. erythropappus* (DC) MacLeish. em um teste clonal com 20 meses de idade. A – Clone 05 com margem inteira; B – Clone 14 com margem ondulada; C – Clone 03 com margem denteada.

Com relação ao ângulo de inserção dos galhos no fuste principal, foi observada uma variação tanto entre os clones, quanto entre as posições na copa (Tabela 2). De uma forma geral, os ângulos da base são mais abertos (próximos de  $90^\circ$ ) do que os ângulos do meio e do ápice. Os clones com ângulos de inserção dos galhos mais fechados foram o 4 e o 7, com valores entre de  $23^\circ$  e  $32^\circ$ , respectivamente. Já, aqueles com ângulos mais abertos foram os clones 10, com média de  $56^\circ$  e o clone 15, com  $58^\circ$ . Os galhos que são mais paralelos ao chão, ou seja, mais abertos, tem mais chance de serem sombreados do que galhos mais perpendiculares, conseqüentemente, apresentam desrama mais cedo.

Tabela 2 – Média dos valores mensurados para os ângulos de inserção dos galhos no fuste principal em três posições da copa (ápice, meio e base da copa) de 17 clones de *E. erythropappus* em um teste clonal aos 20 meses de idade em Lavras – MG.

Clone	Ápice	Meio	Base
1	36,0 Bb	39,5 Cb	60,0 Aa
2	40,5 Ab	47,0 Bb	58,0 Aa
3	37,0 Bb	48,5 Ba	52,0 Ba
4	23,0 Cb	42,0 Ca	45,0 Ba
5	42,0 Ab	49,0 Bb	60,0 Aa
6	32,5 Bb	40,5 Cb	49,0 Ba
7	32,0 Bb	34,5 Cb	45,0 Ba
8	45,0 Ab	59,0 Aa	62,5 Aa
9	41,5 Ab	51,5 Ba	59,5 Aa
10	47,5 Ab	59,5 Aa	61,0 Aa
11	38,5 Ab	41,5 Cb	53,0 Ba
12	32,5 Bb	39,5 Cb	56,5 Aa
13	44,5 Ab	51,0 Bb	66,5 Aa
14	43,5 Ab	49,0 Bb	63,0 Aa
15	47,5 Ac	57,0 Ab	69,5 Aa
16	41,5 Ab	45,0 Cb	64,5 Aa
17	36,0 Bb	43,0 Cb	53,0 Ba

Para cada característica, letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Segundo Cruz, Carneiro e Regazzi (2014), o sucesso de um programa de melhoramento reside na existência de variabilidade na população de trabalho, e as variações fenotípicas encontradas nos clones de candeia indicam a existência de variabilidade, porém em estudos genéticos as medidas de dissimilaridade são mais utilizadas para essa avaliação, como a distância de Mahalanobis.

As estimativas das medidas de dissimilaridade, obtidas pela distância de Mahalanobis ( $D^2$ ), com base nos caracteres morfológicos, indicam uma divergência entre os clones (Tabela 3).

Tabela 3 – Matriz de distâncias de Mahalanobis, com base nos caracteres morfológicos dos 17 clones de *E. erythropappus* em um teste clonal aos 20 meses de idade em Lavras – MG.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	0,0																
2	7,7	0,0															
3	<b>0,7</b>	8,0	0,0														
4	20,4	7,1	23,2	0,0													
5	2,8	5,4	2,3	21,7	0,0												
6	2,8	4,4	5,2	9,5	6,0	0,0											
7	26,3	19,2	23,8	18,1	27,4	24,5	0,0										
8	3,5	10,5	5,5	18,3	9,4	4,3	24,6	0,0									
9	3,0	17,1	5,1	32,6	9,0	7,4	44,1	5,0	0,0								
10	3,2	11,5	4,4	25,3	8,4	6,0	35,6	3,0	2,0	0,0							
11	1,1	8,5	1,9	17,7	5,9	3,1	19,7	1,8	4,9	3,8	0,0						
12	18,9	9,5	19,6	5,9	19,1	13,0	5,4	16,1	33,8	27,2	14,5	0,0					
13	11,1	35,0	12,3	58,1	19,0	21,5	<b>62,3</b>	14,4	3,9	8,8	13,7	55,5	0,0				
14	4,7	23,4	5,9	41,3	11,3	12,3	43,6	6,6	1,6	5,0	5,9	37,0	2,1	0,0			
15	7,7	14,4	8,3	32,5	11,2	11,0	48,7	10,1	5,1	2,3	10,5	38,9	11,4	10,2	0,0		
16	1,2	7,5	0,8	20,3	3,8	4,8	19,6	2,8	5,6	3,6	0,8	15,6	13,6	6,1	9,0	0,0	
17	1,5	8,6	1,4	19,8	3,9	4,8	17,4	4,3	7,5	7,2	1,1	13,3	16,1	7,2	14,6	1,0	0,0

A maior distância foi verificada entre os clones 07 e 13 ( $D^2 = 62,34$ ), e a menor entre os clones 01 e 03 ( $D^2 = 0,73$ ). A distância média foi de 13,23.

O caractere de maior contribuição relativa para a obtenção das distâncias genéticas entre os clones foi a largura da folha com 44%, seguido do comprimento da folha e do comprimento do pecíolo com contribuição de 17,59% e 15,99%, respectivamente (Tabela 4). Assim, a largura da folha pode ser priorizada durante a identificação de genótipos contrastantes. O ângulo de inserção dos galhos na planta foi a característica que menos contribuiu para diferenciar os genótipos, com apenas 8,25%. Por meio desse valor, consideram-se de menor importância as características que apresentam menor variabilidade ou que estão representadas por outras (CRUZ; CARNEIRO; REGAZZI, 2014).

Tabela 4 – Contribuição relativa dos caracteres morfológicos para a divergência genética em clones de *E. erythropappus*.

Caractere	Valor (%)
Largura da folha	44,40
Comprimento da folha	17,59
Comprimento pecíolo	15,99
Área foliar	13,78
Ângulo dos galhos	8,25

Ao analisar o dendrograma, com base na matriz de distâncias de Mahalanobis, pode-se observar a formação de quatro grupos distintos (Figura 3). Grupo I que inclui os clones 1, 3, 5, 6, 8, 11, 16 e 17. Os clones 9, 10, 13, 14 e 15 formam o grupo II; o grupo III formado pelos clones 7 e 12 e o grupo IV com os clones 2 e 4. Comparando-se esse resultado com o teste de médias (Tabela 1), observa-se que os clones do grupo IV, realmente, apresentam características que os diferenciam dos demais, como área foliar, largura da folha e comprimento do

pecíolo. Dessa forma, a distância de Mahalanobis, com base nas características morfológicas, mostrou-se eficiente em alocar os clones em grupos distintos.

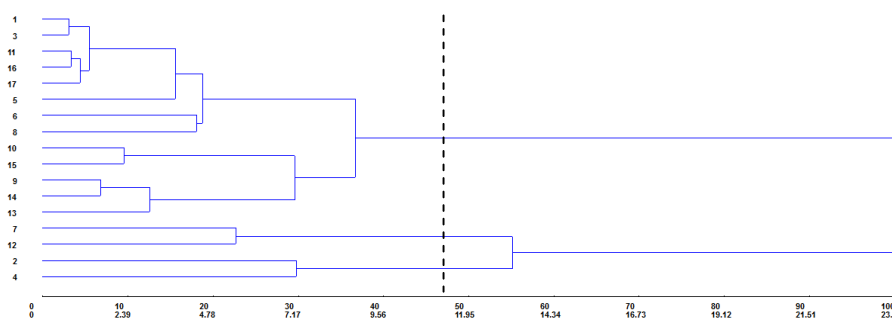


Figura 3 - Análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA, com base na matriz de distâncias de Mahalanobis a partir de caracteres morfológicos de 17 clones de *E. erythropappus*.

Segundo Negreiros et al. (2008) a escolha correta de genitores e o planejamento dos cruzamentos podem otimizar a utilização de genes favoráveis e, dessa forma, maximizar a heterose, a partir do cruzamento de indivíduos com bons caracteres de produção e divergentes, possibilitando a obtenção de genótipos superiores. No caso dos clones de candeia, o cruzamento entre indivíduos divergentes, como os pertencentes ao grupo I e IV, por exemplo, poderão ser direcionados para a combinação de características produtivas.

### 3.2 Diversidade genética por marcadores ISSR em clones de *E. erythropappus*

Os nove *primers* ISSR utilizados geraram um total de 66 bandas (Tabela 5) e desses 69,7% foram polimórficos. Foram consideradas polimórficas as bandas em que a frequência do alelo mais comum foi menor ou igual a 95%, conforme Nei (1987). Em populações naturais de *E. erythropappus*, Pádua (2011) obteve 78,61% e Arriel (2009) 94,31% de locos polimórficos com marcadores ISSR. Esses resultados são superiores aos encontrados neste



trabalho, o que pode indicar uma menor variabilidade, quando se compara aos materiais genéticos analisados por Arriel (2009) e Pádua (2011).

Tabela 5 – Nome, sequência e número de fragmentos produzidos pelos nove *primers* ISSR selecionados para a amplificação de clones de *E. erythropappus*.

Primer	Sequência 5' - 3'	Nº de Fragmentos
UBC 807 (AG)8-T	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GT</b>	6
UBC 825 (AC)8-T	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CT</b>	8
UBC 834 (AG)8-YT	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GYT</b>	6
UBC 841 (GA)8-YC	GAG AGA GAG AGA GAG <b>AYC</b>	6
UBC 844 (CT)8-RC	CTC TCT CTC TCT CTC <b>TRC</b>	9
UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC <b>ARG</b>	7
UBC 857 (AC)8YG	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CYG</b>	5
Manny (CAC)4-RC	CAC CAC CAC CAC <b>RC</b>	9
Mao (CTC)4-RC	CTC CTC CTC CTC <b>RC</b>	10
<b>Total</b>		<b>66</b>

Xia et al. (2007) usam a porcentagem de bandas polimórficas como uma medida de diversidade, porém Pádua (2011) relata que em trabalhos realizados com marcadores dominantes, como o ISSR, existe uma alta variação nos percentuais de bandas polimórficas e que essa variação deve ocorrer, em razão das características ecológicas da espécie e variação do número de indivíduos e populações.

Os clones analisados no presente trabalho apresentaram polimorfismo relativamente baixo, quando comparados com trabalhos em populações naturais, o que pode ser explicado pelo fato dos 17 clones analisados terem sido selecionados dentre os melhores indivíduos em um teste de procedência/progênie. Na prática, isso significa que já havia sido feita uma seleção fenotípica para a coleta de sementes e instalação do teste de procedência e progênies, somada à seleção genotípica dos 17 clones.

Os índices de diversidade genética entre os 17 clones estão apresentados na tabela 6. Para o índice de Shannon (I), foi encontrado o valor de 0,35. Esse índice varia de 0 a 1 e considera-se que quanto mais próximo de zero, mais baixa é a diversidade. Em trabalhos com a mesma espécie, porém em populações naturais, Estopa et al. (2006) encontraram índices variando de 0,45 a 0,49; Moura (2005), índices entre 0,50 e 0,54; Arriel (2009), 0,53 e Pádua (2011) uma variação de 0,39 a 0,54.

Tabela 6 – Índices de diversidade genética entre os clones de *E. erythropappus*. P: porcentagem de locos polimórficos; I: Índice de Shannon; He: diversidade genética de Nei; ( ): Desvio padrão.

População	P (%)	I	He
<i>E. erythropappus</i>	69,70	0,3497 (0,28)	0,2324 (0,19)

A diversidade genética de Nei (He) foi de 0,23, valor considerado baixo quando comparado aos obtidos em estudos de populações naturais dessa espécie. Estopa et al. (2006) utilizando marcador RAPD encontraram valores de He com variação 0,32 a 0,33. Utilizando isoenzimas Barreira (2005), encontraram valores de He de 0,48. Arriel (2009) e Pádua (2011), utilizando marcadores ISSR obtiveram valores de 0,36 e 0,30, respectivamente.

Pode ter ocorrido uma redução na diversidade genética entre os clones, após a seleção dos materiais no teste de procedência/progênie, o que ocorre porque foram selecionadas as árvores para a característica de interesse. Em trabalho com *Pinus caribaea* var. *bahamensis* e *Pinus caribaea* var. *caribaea*, Missio, Moraes e Dias (2007) e Silva et al. (2012) observaram uma redução na variabilidade genética após o desbaste com intensidade de 50%, o que ocorreu em decorrência da seleção que foi efetuada.

A partir da análise dos dados moleculares, foi gerada uma matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard, sendo essa matriz utilizada para agrupar os indivíduos por meio da construção de um dendrograma (Figura 4). Pode-se observar a formação de seis grupos distintos. Grupo I formado pelos clones 1, 8, 11, 12, 5 e 7; o grupo II com os clones 2, 3, 13, 14, e 16; os clones 4 e 17 no grupo III; no grupo IV os clones 6 e 9, enquanto os grupos V e VI foram constituídos por apenas um clone cada, 10 e 15, respectivamente. Os clones mais similares foram o 13 e o 14 com coeficiente de 0,87. O clone 15 foi o mais distante dos demais.

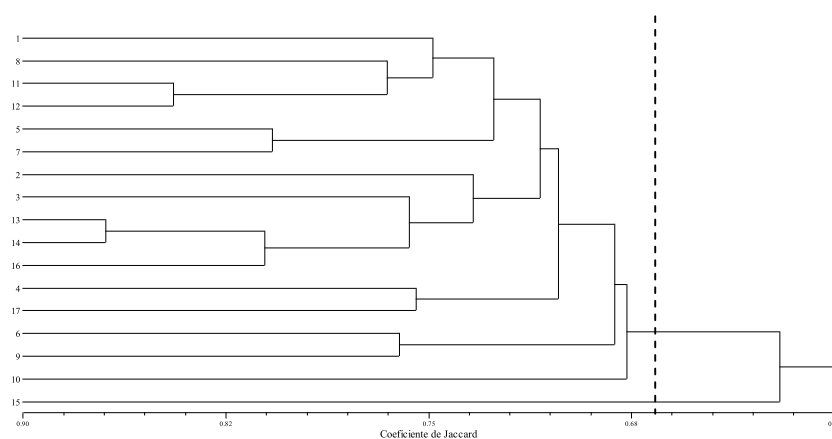


Figura 4 – Análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA de clones de *E. erythropappus*, com base na matriz de similaridade de Jaccard, a partir de marcadores ISSR.

Comparando-se a formação dos grupos a partir dos descritores morfológicos e dos marcadores ISSR (Figuras 3 e 4), observa-se um agrupamento diferenciado em função da análise realizada. Apenas os clones 13 e 14 foram alocados no mesmo grupo, em ambas as análises, indicando que esses clones são similares. Para os demais clones, não foi observada a mesma relação entre os dois agrupamentos. O número de marcadores, o tamanho e a

variabilidade da população analisada são alguns fatores que afetam a distância obtida, a partir de dados moleculares (MOSER; LEE, 1994). Além disso, a relação entre a variação genotípica e fenotípica é complexa, pois genótipos que são fenotipicamente diferentes podem variar em apenas poucos locos, e genótipos similares na aparência ou desempenho podem ser completamente diferentes. Portanto, para obter um melhor conhecimento do grau de divergência entre os genótipos, é necessário considerar cada análise em separado (VIEIRA et al., 2007).

A identificação de progênies com alta divergência tem sido objetivo de vários estudos de melhoramento de espécies florestais, como *Eucalyptus* (MARTINS; PIRES; OLIVEIRA, 2002; SANTOS, 2012; SOUZA et al., 2010), *Hevea* sp. (BICALHO et al., 2008), *Pinus* (MISSIO; MORAES; DIAS, 2007; SILVA et al., 2012), dentre outros.

A importância da diversidade genética para o melhoramento está no fato de que cruzamentos que envolvam progenitores geneticamente divergentes são os mais convenientes para produzir maior variabilidade genética nas gerações futuras. Porém, segundo Martins, Pires e Oliveira (2002) deve-se evitar fazer a escolha de progenitores, com base apenas em suas divergências, sem levar em consideração seus desempenhos em relação às características econômicas de interesse. Dessa forma, estudos relacionados ao rendimento de óleo essencial dos clones de candeia analisados, neste trabalho, são importantes para a continuação do programa de melhoramento genético da espécie.

#### **4. CONCLUSÃO**

A análise da diversidade genética com base nas características morfológicas e marcadores ISSR indicaram variabilidade genética entre os clones e permitiram identificar aqueles mais distantes.

Os marcadores moleculares ISSR também foram eficientes em identificar a diversidade genética nos clones avaliados, porém indicou uma baixa diversidade, quando comparada com populações naturais da espécie.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento desta pesquisa. Ao Departamento de Engenharia Florestal da UFLA, pela disponibilização de toda infraestrutura necessária.

## REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 442 p.

ALMAJALI, D.; ABDEL-GHANI, A. H.; MIGDADIA, H. Evaluation of genetic diversity among Jordanian fig germplasm accessions by morphological traits and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 8-19, Nov. 2012.

ALTOÉ, T. F. et al. Sustentabilidade de plantações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) na produção e qualidade de óleo essencial. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 117-143.

ARRIEL, D. A. A. **Diversidade genética e distribuição genética espacial de três espécies de *Eremanthus erythropappus* no parque ecológico Quedas do Rio Bonito, Lavras, Minas Gerais**. 2009. 47 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish como base para o manejo florestal**. 2005. 73 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

BENDHIFI, M. et al. Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus indica*) cultivars by RAPD markers and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 158, n. 1, p. 1-7, July 2013.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on  $\alpha$ -bisabolol. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 11, p. 72-76, 2008. Supplement.

BICALHO, K. C. et al. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1510-1515, set./out. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais climatológicas 1961-1990**. Brasília, 1992. 84 p.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. do S. P. **Manual de curadores de germoplasma-vegetal: caracterização morfológica**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 15 p.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 9-78.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68.

CAMOLESI, J. F. **Volumetria e teor  $\alpha$ -bisabolol para a candeia *Eremanthus erythropappus***. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CARVALHO, D.; TORRES, G. A. **Marcadores moleculares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 35 p.

CROSSA, J.; FRANCO, J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, n. 1, p. 19-37, June 2004.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 382 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2014. v. 2, 668 p.

D'IMPERIOA, M. et al. Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 229-240, Aug. 2011.

DAVIDE, A. C. et al. Produção e tecnologia de sementes de candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 29-39.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, Feb. 1990.

DUTRA, R. C. et al. Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 6, p. 818-824, dez. 2010.

ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 97-106, set. 2006.

FERREIRA, D. F. **Programa computacional SISVAR**. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010. Software.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

GALDINO, A. P. P. et al. Estudo sobre o rendimento e qualidade do óleo de candeia (*Eremanthus ssp*) e a influência das diferentes origens comerciais de sua madeira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 44-46, 2006.

HOOGENDIJK, M.; WILLIAMS, D. E. Characterizing the genetic diversity of home garden crops: some examples from the Americas. In: INTERNATIONAL HOME GARDENS WORKSHOP: CONTRIBUTION OF HOME GARDENS AND IN SITU CONSERVATION OF PLANT GENETIC RESOURCES IN FARMING SYSTEMS, 2., 2001, Berlin. **Proceedings...** Berlin: IPGRI, 2001. p. 34-40.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, Lausanne, v. 44, n. 2, p. 223-270, 1908.

- LAHOZ, I. et al. Using molecular markers, nutritional traits and field performance data to characterize cultivated cardoon germplasm resources. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 188-197, Aug. 2011.
- LINDÉN, L.; IWARSSON, M. Identification of weeping crabapple cultivars by microsatellite DNA markers and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 221-226, Nov. 2014.
- MARTINS, I. S.; PIRES, I. E.; OLIVEIRA, M. C. Divergência genética em progênies de uma população de *Eucalyptus camaldulensis* DEHNH. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 9, n. 1, p. 81-89, jan./dez. 2002.
- MELO, L. A. **Seleção e resgate de árvores superiores de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MISSIO, R. F.; MORAES, M. L. T.; DIAS, L. A. S. Efeito do desbaste seletivo sobre a divergência genética em progênies de *Pinus caribaea* var. *bahamensis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 73, p. 27-36, mar. 2007.
- MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 4, p. 1235-1248, July 2003.
- MORI, C. L. S. O. et al. Influência da idade da árvore e das características do local de crescimento sobre o rendimento e a qualidade do óleo essencial de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) nativa. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 265-278.
- MOSER, H.; LEE, M. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis and genetic variance in oats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 8, p. 947-956, Mar. 1994.
- MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) por marcadores isoenzimáticos e RAPD**. 2005. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.



NEGREIROS, J. R. S. et al. Divergência genética entre progênes de maracujazeiro amarelo com base em características das plântulas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 197-201, 2008.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n. 3, p. 586-590, 1978.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

PÁDUA, J. A. R. **Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish no Estado de Minas Gerais**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ROHLF, J. F. **NTSYS - PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. Setauket: Exeter Software, 2000. Software.

SALIMATH, S. S. et al. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, Ottawa, v. 38, n. 4, p. 757-763, Aug. 1995.

SANTOS, L. F. **Avaliação da diversidade genética em *Eucalyptus* ssp. por meio de marcadores moleculares e métodos quantitativos**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2012.

SCOLFORO, J. R. S.; LOEUILLE, B.; ALTOÉ, T. F. Caracterização da candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 19-27.

SILVA, J. M. et al. Divergência genética entre progênes de *Pinus caribaea* var. *Caribaea* com base em caracteres quantitativos. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 69, p. 69-77, jan./mar. 2012.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, p. 237-245, 1981.

SOUZA, H. G. et al. Diversidade genética em populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 621-625, 2010.

SUDRÉ, C. P. et al. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 283-294, 2010.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2013.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica organografia**: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. Viçosa, MG: UFV, 2007. 124 p.

VIEIRA, E. A. et al. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 392-399, 2007.

XIA, T. et al. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 209-214, Apr. 2007.

YEH, F. C. et al. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre**. Edmonton: University of Alberta, 1997. 143 p.

**ARTIGO 2 – Rendimento qualitativo do óleo essencial de diferentes materiais genéticos de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish**

Janice Ferreira do Nascimento; Antônio Claudio Davide; Lucas Amaral de Melo; Maria das Graças Cardoso; Thiza Falqueto Altoé

**RESUMO** – A espécie *Eremanthus erythropappus* é bastante explorada em função do seu óleo essencial, rico em alfa-bisabolol, um composto muito utilizado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, por isso, a identificação e seleção de materiais genéticos com maior rendimento de óleo essencial é importante, pois irá possibilitar maior retorno econômico aos investidores. Dessa forma, neste trabalho, objetivou-se avaliar o rendimento qualitativo do óleo essencial de diferentes materiais genéticos de *E. erythropappus*, tanto em matrizes de candeais nativos, quanto em progênies com cinco anos e meio de idade. Foram utilizadas amostras de madeira provenientes de um teste de procedências/progênies instalado em Baependi - MG, além de amostras de candeais nativas de três procedências de Minas Gerais (Carrancas, Baependi e Itabirito). O óleo essencial foi extraído da madeira pelo método de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado, por um período de oito horas. A análise do óleo essencial foi feita por cromatografia em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massa CG-EM. Foi observada uma variação no rendimento qualitativo do óleo essencial nos diferentes materiais genéticos de *E. erythropappus*, tanto em candeais nativos, quanto no teste de procedências/progênies, indicando potencial para seleção. No teste de procedências/progênies o genótipo 10 foi o menos produtivo, com rendimento de 0,42% e o genótipo 22 o mais produtivo com 1,67%. Já, nas árvores matrizes, aquela que apresentou maior rendimento foi proveniente de Itabirito (Ita 15) com 1,67% e a com menor rendimento foi proveniente de Carrancas (Car 11), com 0,74% de óleo essencial.

**Palavras-chave:** Candeia, hidrodestilação, variabilidade genética, melhoramento genético.

**ABSTRACT** - The specie *Eremanthus erythropappus* is widely exploited due to its essential oil, which is rich in alpha-bisabolol, a compound widely used in pharmaceutical and cosmetics industries. Thus, the identification and selection of the high yield genetic material in essential oil is important because will make possible obtaining economic income by investors. The purpose of this study was

to assess the qualitative yield of essential oil in different genetic material of *E. erythropappus*, either in native Candeia matrices or in progenies about 5.5 years old. Samples of wood obtained from test of progeny established in Baependi, State of Minas Gerais were used, as well as were used samples of native Candeia collected in three places in the State of Minas Gerais, namely, Carrancas, Baependi and Itabirito. The essential oil was extracted using the hydrodistillation method, by means of a modified Clevenger-type separator for about eight hours. The gas chromatography combined with mass spectrometry was carried out. Variation in qualitative yield of essential oil was found in different genetic material of *E. erythropappus*, either in native Candeia or in progeny test, indicating potential for selection. The genotype 10 was found to be less yielding in progeny test, about 0.42%, while the genotype 22 was found to be high yielding, about 1.67%. In matrix trees, the high yield was found for Itabirito, about 1.67%, and the lower yield was for Carrancas, about 0.74% essential oil.

**Key-words:** Candeia. Hydrodistillation. Genetic variability. Plant breeding.

## 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, estão presentes em diversas plantas, participando do metabolismo secundário com funções ecológicas importantes, como proteção contra herbivoria e infecção por microrganismos patogênicos, atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agentes na competição planta-planta (SIMÕES et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O conhecimento e a utilização desses óleos essenciais datam desde alguns séculos antes da era cristã, conforme relatado por Vitti e Brito (2003). Atualmente, existe um grande número de plantas que têm seu óleo essencial explorado comercialmente, desde plantas rasteiras, como é o caso da hortelã, até espécies de porte arbóreo como o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), o *Eucalyptus* spp., e a candeia (*Eremanthus erythropappus*) (BIZZO; HOVELL; RESENDE, 2009; SCOLFORO; OLIVEIRA; DAVIDE, 2012). Esta última tem se destacado no mercado por seu óleo essencial ser rico em alfa-bisabolol, um composto

muito utilizado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, por possuir características inseticidas (ANDRADE et al., 2004), antibacterianas (VILA et al., 2010), fungicidas (TABANCA et al., 2007) e anti-inflamatória.

A candeia é uma espécie florestal pertencente à família Asteraceae, de ocorrência nos Cerrados e Campos Rupestres do Planalto Central Brasileiro, com estatura entre 6 e 10 metros em média, e distribuição diamétrica decrescente, com diâmetros em torno de 15 cm (SCOLFORO; LOEUILLE; ALTOÉ, 2012). Além da extração do seu óleo essencial, a madeira da candeia também é utilizada como moirões para cerca, por apresentar grande durabilidade natural. O óleo essencial está presente em todas as partes da planta (folhas, galhos, casca, raiz, lenho), porém sua extração comercial é realizada da madeira do tronco por possuir maior rendimento (ALTOÉ et al., 2012).

O óleo essencial de candeia apresenta como componente majoritário o alfa-bisabolol, um álcool terciário de fórmula molecular  $C_{15}H_{26}O$ , monocíclico, sesquiterpênico, insaturado e opticamente ativo que, por possuir baixa toxicidade, está presente na composição de cosméticos, perfumaria, produtos para pele sensível, medicamentos, dentre outros (BHATIA et al., 2008). Além da candeia, diversas outras plantas possuem o alfa-bisabolol na composição química de seu óleo essencial, mas, comercialmente, este é extraído, principalmente, da candeia e da camomila (*Matricaria chamomilla* L.).

Por essa importância econômica, tanto o óleo essencial, quanto o alfa-bisabolol extraídos da candeia apresentam preços relativamente altos no mercado. O quilo do óleo essencial é vendido pelas indústrias produtoras por US\$ 50.00 a US\$ 55.00. Enquanto o alfa-bisabolol é vendido para distribuidores e para indústrias de cosméticos e medicamentos do Brasil e do exterior, por um preço que varia de US\$ 90.00 a US\$ 100.00 o quilo (OLIVEIRA; ANDRADE; SCOLFORO, 2012).

O rendimento do óleo essencial da candeia é variável, o que pode ser observado a partir dos resultados de Altoé et al. (2012), Camolesi (2007), Scolforo et al. (2004) e Scolforo, Oliveira e Acerbi Júnior (2008), que encontraram variação no rendimento de óleo essencial de diferentes materiais genéticos de *E. erythropappus*, tanto em candeais nativos, quanto em plantios, porém ainda não existe nenhum trabalho com o objetivo de selecionar materiais genéticos com base no rendimento de óleo.

A identificação e seleção de materiais genéticos mais adaptados às diversas regiões e que apresentem um maior rendimento de óleo essencial e alfa-bisabolol, possibilita maior retorno econômico aos investidores. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o rendimento qualitativo do óleo essencial de diferentes materiais genéticos de candeia, tanto em árvores de candeais nativos quanto em progênies com cinco anos e meio de idade selecionadas em um teste de procedências/progênies.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### *2.1 Material vegetal*

O material vegetal para a extração de óleo essencial foi obtido a partir da seleção de árvores em um teste de procedências/progênies de *E. erythropappus*. A instalação do teste de procedências/progênies se deu em janeiro de 2005, na zona rural do município de Baependi, no sul de Minas Gerais. Segundo a classificação de Köppen, a região possui clima Cwb (tropical de altitude) com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos. A temperatura média anual varia entre 18 e 19°C e a média pluviométrica é de 1.400 mm, com chuvas mais concentradas entre dezembro e março, e os meses de junho, julho e agosto compreendendo o período seco (BRASIL, 1992).

O teste é resultante do plantio de mudas advindas de sementes de cinco regiões do Estado de Minas Gerais (Morro do Pilar, Itabirito, Carrancas, Baependi e Delfim Moreira). Cada uma dessas regiões foi considerada como sendo uma procedência. Para cada procedência, foram coletadas sementes de 24 matrizes com polinização livre, exceto Morro do Pilar, onde foram coletadas sementes de 20 árvores matrizes. As mudas foram plantadas em parcelas lineares com seis plantas, em sete blocos casualizados, totalizando 116 progênies. O espaçamento de plantio foi de 2,5 m entre linhas e 2,0 metros entre plantas com bordadura externa única em cada bloco.

Com base nos dados de diâmetro do fuste principal à altura do peito (DAP), aos cinco anos e meio de idade, foi realizada uma seleção dentro do teste de procedências/progênies, segundo a metodologia adotada por Melo (2012). Na ocasião, as 26 árvores selecionadas foram decepadas a 50 cm de altura com o intuito de obter brotações das cepas para o processo de enraizamento de estacas. Ao serem decepadas, todas as 26 árvores foram cubadas, obtendo-se, assim, o volume real, ao passo que o sistema radicular foi escarificado com o intuito de emitir as brotações, conforme recomendação de Melo, Davide e Teixeira (2012). Depois de coletadas as brotações existentes, os tocos remanescentes foram coletados com o auxílio de uma motosserra, colocados em sacos plásticos identificados e levados para a Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Além dos tocos coletados no teste de procedências/progênies, galhos de 8 a 12 cm de algumas das árvores matrizes que, originalmente, haviam fornecido as sementes para o teste de procedências/progênies, foram coletados. A coleta dessas amostras foi possível, pois todas as árvores haviam sido georreferenciadas no momento da coleta de sementes, em 2004. No entanto, como a candeia é uma espécie intensamente explorada, não foi possível encontrar todas as 116 matrizes, pois a maioria havia sido cortada, conforme se constatou no campo. Das 116 árvores, apenas 14 foram encontradas: duas da

procedência Baependi; três de Carrancas e nove de Itabirito. Esta última procedência teve um número maior de árvores por estar localizada nas proximidades de uma área de proteção ambiental.

Após a coleta, todo o material vegetal foi levado a UFLA. As amostras foram descascadas com o auxílio de um facão e as cascas descartadas. O lenho foi seccionado em partes menores e moído em um desintegrador na Unidade Experimental em Painéis de Madeira da UFLA. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em câmara fria com temperatura de 5°C e umidade relativa de 45% até o momento da extração do óleo essencial.

## *2.2 Extração do óleo essencial*

As extrações foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da UFLA, empregando-se o método de hidrodestilação. Foi utilizado um aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão redondo com capacidade de 5 L, onde as amostras de madeira foram colocadas e recobertas com água. O processo de extração foi realizado por um período de oito horas, mantendo-se a solução em ebulição, segundo a recomendação de Altoé et al. (2012). Após esse período, o hidrolato (solução contendo óleo + água) foi coletado e centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x G por 15 minutos. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro e armazenados em refrigerador.

Paralelamente às extrações, determinou-se a umidade de cada amostra, de acordo com o método oficial da American Oil Chemist's Society - AOCS (1994), adaptado por Pimentel et al. (2006). O rendimento do óleo essencial de cada amostra foi dado pela razão entre a massa de óleo essencial extraída e a massa seca da amostra (GUIMARÃES et al., 2014).



### *2.3 Análise qualitativa do teor de alfa-bisabolol no óleo essencial de E. erythropappus*

Após a extração, foi realizada a análise das amostras de óleo essencial para cada material genético. Para isso, amostras de óleo essencial de cada material genético foram diluídas em 1,0  $\mu\text{L}$  de diclorometano, na concentração de 1% de óleo essencial. As análises foram realizadas no Departamento de Química da UFLA, por cromatografia em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massa CG-MS.

Foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) e uma coluna RTX-5MS (5% phenyl- 95% dimethyl siloxane) 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  temperatura do injetor foi mantida à 220°C modo split 1:80. Gás de arraste utilizado foi He 5.0 com um fluxo de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . A temperatura do forno foi programada de 50°C até 200°C com uma rampa de aquecimento de 4°C  $\text{min}^{-1}$  e até 300°C com rampa de 10°C  $\text{min}^{-1}$ . O espectrômetro de massas utilizado foi o de impacto de elétrons (70 eV), utilizando o modo scan (40 a 500 Da) com um corte de solvente em 2,5 min. A temperatura da interface do detector e do íon source foram de 240°C e 200°C, respectivamente. Foi injetada, nas mesmas condições da amostra, uma série de padrões de hidrocarbonetos lineares ( $\text{C}_8\text{H}_{20}$ ). Os espectros obtidos foram comparados ao banco de dados da biblioteca do espectrômetro de massas FFNSC 1.2 Library e o índice Kovats, calculado para cada constituinte, foi comparado ao tabelado, de acordo com Adams (2007). Identificação feita pela biblioteca. A quantificação do teor de alfa-bisabolol foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

#### 2.4 Análise dos dados

A partir do rendimento de óleo essencial de cada material genético, foi feita uma análise de variância e aplicado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Além disso, foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson entre o rendimento de óleo essencial e o teor de alfa-bisabolol para as matrizes de candeais nativos e as árvores do teste de procedências/progênes. Os gráficos foram confeccionados no programa Sigmaplot® versão 11.

A possibilidade de seleção de materiais genéticos com maior rendimento de óleo essencial, atrelado às árvores que apresentem um bom crescimento, é essencial para garantir um maior retorno econômico para os investidores. Com base nisso, foi proposta uma simulação das diferenças de ganho em produtividade e receita para os materiais genéticos do teste de procedências/progênes a partir dos valores de rendimento do óleo essencial e crescimento volumétrico das árvores do teste de procedências/progênes, aos cinco anos e meio de idade.

Uma vez obtidos os rendimentos de óleo (a partir das análises laboratoriais) e o volume de madeira (a partir da cubagem rigorosa para cada uma das 26 árvores selecionadas), o rendimento foi recalculado para quilograma de óleo por metro cúbico de madeira, considerando a densidade da madeira de *E. erythropappus* igual a  $0,63 \text{ kg.m}^{-3}$ , conforme obtido por Altoé et al. (2012), trabalhando com árvores de candeia em um plantio com nove anos de idade. Para os cálculos de receita para cada material genético, foram utilizados como base os valores indicados por Oliveira, Andrade e Scolforo (2012), em que o preço de venda do kg de óleo essencial de candeia pelas indústrias produtoras situa-se na faixa de US\$ 50.00 a US\$ 55.00.

Além disso, os dados foram extrapolados para um hectare, aos cinco anos e meio de idade, considerando uma densidade de 2000 plantas por hectare

(arranjo de plantio de 2,5 x 2,0 m). É válido ressaltar que, até o momento, nenhum plantio da espécie *E. erythropappus* chegou ao seu ciclo de corte, sendo que estudos tais como os de Silva (2009) projetam, a partir de avaliações em parcelas permanentes, ciclos de corte de 15 anos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma variação no rendimento de óleo essencial nas árvores selecionadas no teste de procedências/progênes, evidenciando a existência de variação genética no rendimento de óleo em diferentes genótipos de *E. erythropappus*. O rendimento de óleo essencial nas árvores do teste de procedências/progênes variou de 0,42%, no genótipo 10, a 1,67% no genótipo 22, e o rendimento médio de óleo essencial foi de 0,85% (Figura 1). Em um estudo conduzido por Altoé et al. (2012), que avaliaram o rendimento de óleo essencial de *E. erythropappus*, em diferentes espaçamentos, foram obtidos rendimentos de 0,89% e 0,97% para a madeira com e sem casca, respectivamente, aos nove anos de idade, dados que corroboram com aqueles aqui obtidos.

O óleo essencial de *E. erythropappus* é uma mistura de substâncias nas quais o componente majoritário é o alfa-bisabolol (ALTOÉ et al., 2012). Com relação aos teores desse composto não foi observada uma correlação quando comparado com o rendimento de óleo essencial (Figura 1). Foram observadas variações entre 72,88% de alfa-bisabolol no óleo essencial do genótipo 23 a 88,01%, no genótipo 7.

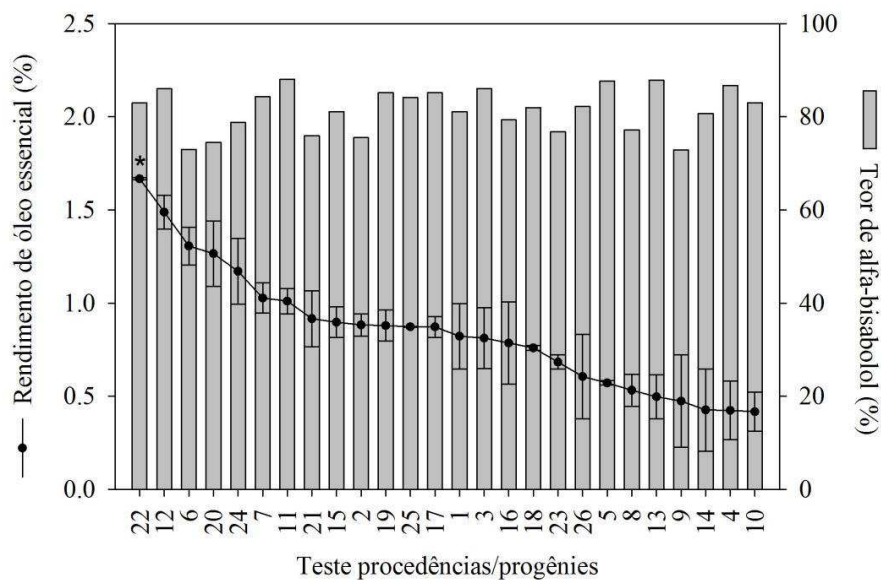


Figura 1 – Rendimento de óleo essencial e teor de alfa-bisabolol na madeira de árvores de um teste de procedências/progênes de *E. erythropappus* aos cinco anos e meio de idade em Baependi – MG. O símbolo (\*) indica o genótipo com melhor rendimento em óleo essencial pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Com relação às árvores matrizes dos candeais nativos, o rendimento de óleo essencial também apresentou variação, conforme pode ser observado na figura 2. A média dos rendimentos entre as matrizes foi de 1,25%. A matriz que apresentou maior rendimento foi proveniente de Itabirito (Ita 15) com 1,67% e a com menor rendimento foi proveniente de Carrancas (Car 11), com 0,74% de óleo essencial. Em outros estudos com árvores em candeais nativos de Minas Gerais, foram encontrados rendimentos que variaram de 1,02 a 2,46% (CAMOLESI, 2007; SCOLFORO et al., 2004; SCOLFORO; OLIVEIRA; ACERBI JÚNIOR, 2008).

Assim como ocorreu nas árvores do teste de procedências/progênes, o teor de alfa-bisabolol nas árvores matrizes não apresentou uma correlação, quando comparado com o rendimento de óleo essencial (Figura 2). O teor desse

composto apresentou variação entre 87,97%, em uma amostra de Baependi (Bae 5), a 70,49% em uma amostra de Carrancas (Car 23).

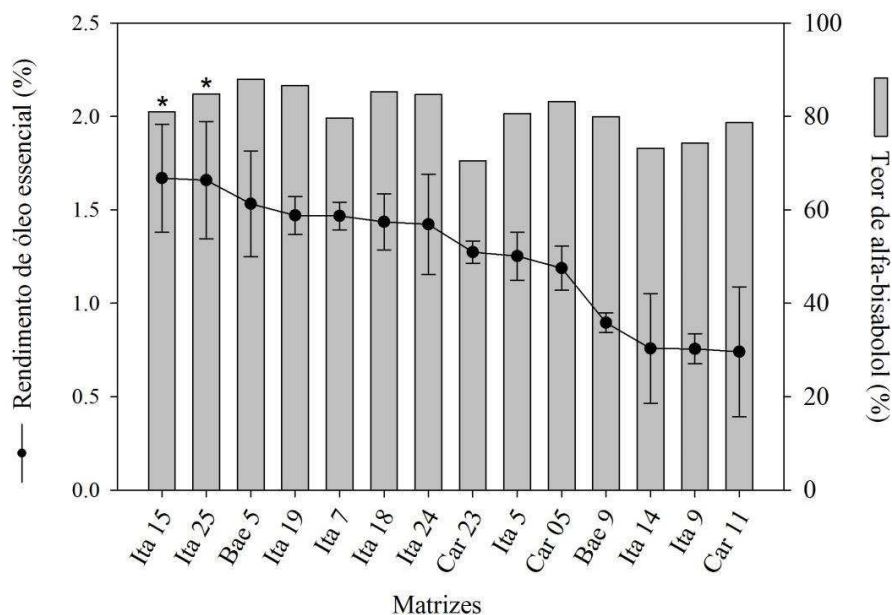


Figura 2 – Rendimento de óleo essencial na madeira de galhos de matrizes de *E. erythropappus* de diferentes procedências em Minas Gerais. O símbolo (\*) indica as matrizes com melhor rendimento em óleo essencial pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em ambos os casos, árvores nativas e plantadas, não foi observada uma relação entre o rendimento de óleo essencial e o teor de alfa-bisabolol. Tanto para as árvores nativas, quanto para as plantadas no teste de procedências/progênes, existe uma correlação positiva e de magnitude moderada entre o rendimento de óleo essencial e o teor de alfa-bisabolol. Para as matrizes de candeais nativos a correlação foi de 0,62 ( $p=0,016$ ) e para as árvores do teste de procedências/progênes foi de 0,55 ( $p=0,003$ ).

Em estudos com óleo essencial de *Eucalyptus*, Doran (1991), Vitti e Brito (2003), relatam que existe maior variação genética natural no rendimento

de óleo essencial quando comparado com a composição química do óleo. Dessa forma, segundo o autor, seria mais fácil selecionar materiais com maior quantidade de óleo essencial do que trabalhar na tentativa de se obter um maior teor do componente químico desejado no óleo. No caso da candeia, como a variação genética do rendimento de óleo essencial é maior do que a variação do teor de alfa-bisabolol, deve-se direcionar a seleção para aqueles indivíduos com maior produção de óleo essencial.

De maneira geral, as árvores matrizes apresentaram rendimento médio de óleo essencial superior ao das árvores plantadas, porém no teste de procedências/progênes, os genótipos 22 e 12 apresentaram rendimentos de óleo equivalente às matrizes, mesmo aos cinco anos e meio de idade, indicando o potencial de seleção desses indivíduos para a produção de óleo essencial.

De acordo com Gobbo Neto e Lopes (2007) e Simões et al. (2007) a idade da planta é um dos fatores que pode afetar a produção de óleo essencial. Mori et al. (2012), em um estudo que relacionou o rendimento de óleo essencial com a idade das árvores de *E. erythropappus*, concluíram que o rendimento em óleo essencial apresentou uma correlação positiva com a idade, ou seja, quanto maior a idade das árvores de candeia, maior será o rendimento em óleo essencial.

Todas as 26 árvores selecionadas no teste de procedências/progênes eram plantas consideradas geneticamente superiores em um plantio com 4872 plantas originalmente, tendo como parâmetro de seleção o DAP, porém, mesmo assim, pode-se perceber que existe uma variação em relação ao rendimento de óleo essencial. O interesse no melhoramento genético é possibilitar maior retorno econômico aos investidores, ao trabalharem com materiais mais produtivos. Dessa forma, foi feita uma simulação dos ganhos econômicos ao se trabalhar com materiais mais produtivos, considerando-se o preço do quilo de óleo essencial praticado pelas indústrias produtoras (Tabela 1).

Tabela 1 – Expectativa de receita (US\$/ha) com a venda do óleo essencial extraído de diferentes materiais genéticos de *E. erythropappus* selecionados em um teste de procedências/progênes, aos cinco anos e meio de idade, considerando o rendimento em óleo essencial (%), o volume individual das árvores (m<sup>3</sup>), a densidade da madeira de candeia igual a 632,39 kg/m<sup>3</sup>, a densidade de plantio de 2000 plantas por hectare e o valor de venda do óleo essencial de US\$ 55.00.

Material genético	Rendimento de óleo essencial (%)	Volume por árvore (m <sup>3</sup> )	Óleo essencial kg/ha	Expectativa de receita (US\$/ha)
12	1,49	0,014	272,31	14976.87
22	1,67	0,010	210,82	11595.42
20	1,27	0,012	189,77	10437.41
2	0,88	0,014	161,41	8877.58
7	1,03	0,012	154,46	8495.21
6	1,31	0,007	107,35	5904.22
3	0,81	0,010	106,28	5845.25
1	0,82	0,010	105,87	5822.70
24	1,17	0,007	105,09	5780.02
17	0,87	0,009	102,06	5613.43
16	0,79	0,010	100,21	5511.75
11	1,01	0,008	98,75	5431.42
9	0,47	0,015	90,35	4969.51
19	0,88	0,007	72,26	3974.40
13	0,50	0,011	70,01	3850.61
21	0,92	0,006	67,54	3714.59
25	0,87	0,006	66,30	3646.57
5	0,57	0,009	65,85	3621.89
15	0,90	0,006	65,35	3594.04
8	0,53	0,010	64,69	3558.04
14	0,43	0,012	63,14	3472.61
18	0,76	0,006	62,00	3410.12
23	0,68	0,006	47,88	2633.20
4	0,42	0,008	44,44	2444.44
26	0,61	0,006	42,51	2337.81
10	0,42	0,004	20,45	1124.63

Observa-se o genótipo 12 como o mais rentável, com uma receita de US\$ 14976.87 por hectare, um valor 1.232% superior ao genótipo 10, que apresenta uma receita de US\$ 1124.63 por hectare. Esses valores mostram o quanto é importante trabalhar com materiais melhorados. Devem-se considerar, ainda, os custos relacionados à implantação, colheita, transporte e extração do óleo essencial. Além disso, ressalta-se que, nessa simulação, não foi considerada a mortalidade dos genótipos em questão, o que poderia influenciar os dados de produtividade.

Ao selecionar os melhores indivíduos, deve-se levar em consideração, não apenas o rendimento de óleo essencial, mas também o volume da árvore. Quando se analisa apenas o rendimento, o genótipo 22 apresentou um valor superior aos demais, com 1,67%, porém, ao levar em consideração o volume de madeira da árvore, esse ranqueamento muda, como pode ser observado na tabela 1. O genótipo 22, mesmo com um rendimento superior aos demais possui 0,010 m<sup>3</sup> de volume, o que irá gerar uma receita de US\$ 11595.42 por hectare. No entanto, o genótipo 12, mesmo com um rendimento menor (1,49%), o seu volume é maior, 0,014 m<sup>3</sup> e, por isso, a receita gerada é 26,6% maior (US\$ 14976.87).

De acordo com os dados apresentados, pode-se verificar a possibilidade de seleção de materiais genéticos de *E. erythropappus* mais produtivos, relacionando, ao mesmo tempo, a produtividade volumétrica de madeira e o rendimento em óleo essencial, o que possibilitará uma maior expectativa de retorno econômico aos produtores rurais e empresas que veem na cultura dessa espécie uma possibilidade de investimento.

Pode-se observar que a seleção dos melhores genótipos, quando os valores são extrapolados para um hectare, mesmo numa idade jovem de apenas cinco anos e meio, possibilita ganhos expressivos na receita bruta de venda do



óleo essencial, na ordem de até 1.232%, justificando a condução de pesquisas em silvicultura e manejo da espécie.

#### 4. CONCLUSÃO

Existe uma variação no rendimento de óleo essencial e no teor de alfa-bisabolol de diferentes materiais genéticos de *E. erythropappus*, tanto em candeais nativos, quanto em um plantio com cinco anos e meio de idade.

Mesmo em uma idade jovem, alguns materiais genéticos do teste de procedências/progênes apresentam rendimentos de óleo essencial equivalentes aos de árvores nativas, indicando potencial de seleção precoce desses materiais.

Além disso, a seleção dos materiais genéticos mais produtivos possibilita ganhos expressivos na receita bruta de venda do óleo essencial, na ordem de até 1.232%.

#### 5. AGRADECIMENTOS

À empresa Citróleo pela disponibilização do material vegetal, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa, ao Departamento de Química e Departamento de Engenharia Florestal da UFLA, pela disponibilização de toda infraestrutura necessária.

#### REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream: Allured, 2007. 469 p.

ALTOÉ, T. F. et al. Sustentabilidade de plantações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) na produção e qualidade de óleo essencial. In:

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia**: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais. Lavras: UFLA, 2012. p. 117-143.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official Method Da2b-42**: official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 4<sup>th</sup> ed. Champaign, 1994.

ANDRADE, I. L. et al. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 19, p. 5879-5881, 2004.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on  $\alpha$ -bisabolol. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 11, p. 72-76, 2008. Supplement.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais climatológicas 1961-1990**. Brasília, 1992. 84 p.

CAMOLESI, J. F. **Volumetria e teor  $\alpha$ -bisabolol para a candeia *Eremanthus erythropappus***. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

DORAN, J. C. Commercial sources, uses, formation, and biology. In: BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. (Ed.). **Eucalyptus leaf oils**: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: Inkata, 1991. p. 11-28.

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

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 267-275, abr./jun. 2014.

MELO, L. A. **Seleção e resgate de árvores superiores de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)**. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MELO, L. A.; DAVIDE, A. C.; TEIXEIRA, L. A. F. Metodologia para resgate de matrizes e enraizamento de estacas de *Eremanthus erythropappus*. **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 631-638, out./dez. 2012.

MORI, C. L. S. O. et al. Influência da idade da árvore e das características do local de crescimento sobre o rendimento e a qualidade do óleo essencial de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) nativa. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 265-278.

OLIVEIRA, A. D.; ANDRADE, I. S.; SCOLFORO, J. R. S. Análise econômica do manejo sustentável da candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 281-293.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

SCOLFORO, J. R. S. et al. Estimativa de volume, peso seco, peso de óleo e quantidade de moirões para a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 87-102, 2004.

SCOLFORO, J. R. S.; LOEUILLE, B.; ALTOÉ, T. F. Caracterização da candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. (Ed.). **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. p. 19-27.

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; ACERBI JÚNIOR, F. W. **Inventário florestal de Minas Gerais: equações de volume, peso de matéria seca e carbono para diferentes fisionomias da flora nativa**. Lavras: UFLA, 2008. 216 p.

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. **Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012. 329 p.

SILVA, C. P. C. **Crescimento e produção da candeia em plantio sujeito a diferentes espaçamentos e podas**. 2009. 153 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1104 p.

TABANCA, N. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 21, p. 8430-8435, 2007.

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

VILA, R. et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of  $\alpha$ -bisabolol. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 7, p. 2510-2514, 2010.

VITTI, A. M. S.; BRITO, O. J. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 26 p. (Documentos Florestais).

**ARTIGO 3 - ESSENTIAL OIL CONTENT IN *EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS* WOOD POWDER CAN BE ESTIMATED USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY**

Janice Ferreira do NASCIMENTO<sup>1</sup>, Paulo Ricardo Gherardi HEIN<sup>1\*</sup>, Antônio Claudio DAVIDE<sup>1</sup>, Lucas Amaral de MELO<sup>1</sup> e Paulo Fernando TRUGILHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000 Lavras – MG, Brasil

\* e-mail: [paulo.hein@dcf.ufla.br](mailto:paulo.hein@dcf.ufla.br)

Artigo nas normas do periódico “Journal of Near Infrared Spectroscopy” (versão aceita)

ESSENTIAL OIL CONTENT IN *EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS* WOOD POWDER CAN BE ESTIMATED USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

**ABSTRACT:** *Candeia (Eremanthus erythropappus (DC.) MacLeish)*, a Brazilian tree species, is being threatened by indiscriminate logging because the essential oil present in its wood has economic importance. The aim of this study was to develop a near-infrared spectroscopic model for estimating the essential oil content in *E. erythropappus* wood to select trees with a high amount of essential oil before harvesting them. Essential oil from 103 wood powders was extracted via hydrodistillation. The values were calculated as the ratio between the mass of essential oil extracted and the oven dry mass of wood, and correlated to the NIR spectra recorded from the wood powders. The statistic associated with the predictive models has demonstrated that NIR has the potential to be a fast and feasible method to replace standard procedures for selecting trees with high essential oil content. The NIR-based predictions in an independent validation set yielded a high correlation ( $r=0.89$ ) with the laboratory-determined values for essential oil content in *E. erythropappus* wood. That NIR-model can be applied to guide wood managers for selecting high oil content trees before harvesting them and for developing sustainable strategies for industrial utilization of *Candeia* populations.

**KEYWORDS:** NIR predictions, essential oil,  $\alpha$ -bisabolol

## 1. INTRODUCTION

Candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) is a Brazilian tree species of economic importance, mainly because of the essential oil present in the wood.<sup>1</sup> The oil exhibits high levels of  $\alpha$ -bisabolol, a chemical component widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries due to its insecticidal,<sup>2</sup> antibacterial,<sup>3</sup> fungicidal<sup>4</sup> and anti-inflammatory properties. The Candeia usually occurs in the transition areas between the forest and open areas of fields at altitudes between 400 and 2,200 meters and on sites with infertile and shallow soils, forming more or less pure stands, the *candeais*.<sup>1,5</sup> These stands are found in mountain-field areas in the states of Bahia, Minas Gerais and Rio de Janeiro, Brazil.<sup>6</sup>

Although the Candeia presents a large distribution in the southeastern region of Brazil, the species is threatened by indiscriminate logging because of great economic interest. Galdino *et al.*<sup>7</sup> showed that there are differences in essential oil yield and in the amount of  $\alpha$ -bisabolol from different genetic materials of this species, which allows the selection of more productive individuals. However, the evaluation of the essential oil yield, as well as being destructive, is time-consuming, which makes it difficult to analyze a large number of samples. In this sense, the non-destructive evaluation of wood is an option for fast, simple and reliable characterization, where information concerning the material is obtained by indirect measurements, which reduces the time and cost of evaluations.

Near-infrared (NIR) spectroscopy is a frequent method of choice for the nondestructive analysis of agricultural products.<sup>8</sup> Several chemical characteristics related to wood and wood products have been estimated using NIR spectroscopy.<sup>9,10</sup> The NIR analyses rely on developing a calibration that relates the NIR spectra of the samples to their known chemical constitution, such

as oil content or moisture.<sup>11</sup> The measurement is fast (one minute or less per sample), requires minimal or no sample preparation and is suitable for online process control.<sup>12</sup> In short, the method involves collecting the NIR spectra of a set of characterized samples, developing a multivariate regression equation and using the calibration to estimate the properties of further, unknown samples based on their NIR spectra.<sup>13</sup>

Some studies have used vibrational spectroscopy measurements for investigating the quality of the essential oil in plants because these oils can be used for fragrances, cosmetic materials and aroma preparations.<sup>14</sup> Most of these studies applied NIR spectroscopy for investigating essential oils obtained from various aromatic and medical species<sup>15</sup> and secondary plant metabolites.<sup>16,17</sup> For quantitative purposes, many studies have successfully applied NIR spectroscopy to estimate essential oil content in herbaceous plants such as geranium,<sup>18</sup> *Scutellariae*<sup>19</sup> and thyme, oregano and chamomile chemotypes.<sup>20</sup> However, relatively few studies have used NIR-based models to estimate essential oil in the wood of perennial plants like those of the genera *Santalum*<sup>21,22</sup> and *Eucalyptus*.<sup>23</sup>

To our knowledge, there is no reference presenting evidence that NIR spectroscopy can be used for estimating the essential oil content from wood of *E. erythropappus* trees. To help forest managers, methods allowing the selection of trees with high oil content before harvesting them would be useful for sustainable management plans of Candeia populations. Thus, the aim of this study was to verify the feasibility of applying NIR spectroscopy for estimating the oil content in wood of *Eremanthus erythropappus* trees.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Vegetal material and preparation**



Wood of 14 trees was collected from branches in natural stands of *E. erythropappus* in three municipalities of Minas Gerais State, Brazil: nine samples were collected from the Itabirito (20°15'S:43°47'W), three samples were collected from the Carrancas (21°29'S:44°38'W), and two samples were collected from the Baependi (21°57'S:44°53'W) regions. The branches were removed from the living trees measuring from 8 to 12 cm in diameter. Furthermore, wood discs (thickness: 15 cm) were collected from the trunks of 27 trees with seven years old grown in a provenance/progeny trial located in Baependi city.

After collection, the 41 samples were cut into smaller pieces, debarked and ground into a wood powder using a rotating-knife grinder. The wood powder used in analysis passed through a 40-mesh screen but it was retained on a 60-mesh screen. The powder samples were placed in labeled plastic bags and stored in a cold chamber at 5 °C with a relative humidity of 45%, until the wet chemistry and NIR analysis were performed. Three replicates of each tree (in most cases) were analyzed.

## **2.2 Essential Oil Extraction**

The extraction process of the essential oil was conducted in the Laboratory of Organic Chemistry of the Federal University of Lavras. The method used was hydrodistillation using a modified Clevenger device coupled to a balloon with a round bottom and a capacity of 5 L according to the procedure applied in Gomes *et al.*<sup>24</sup> The extraction process was carried out over 8 hours with samples consisting of 300 to 400 g (dried mass) of wood powder (particle size 4.5 mm), and the solution was kept boiling.

After that, the hydrolact was collected, which was centrifuged in a centrifugal horizontal crosshead at 965.36 X g for 15 minutes. Next, the essential oil was

removed with a Pasteur micropipette, packed in a glass bottle, stored under refrigeration at 4 °C and protected from light.

Alongside extractions, the moisture was determined according to the official method of the American Oil Chemists Society (AOCS), adapted by Pimentel *et al.*<sup>25</sup> The yield of essential oil of each sample was given by the ratio between the mass of essential oil extracted and dry mass of wood (mass/mass) on a moisture-free basis.

### **2.3 NIR spectra acquisition**

A Bruker FT-NIR (model MPA, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) was used in diffuse reflectance mode. This Fourier transform spectrometer is designed for reflectance analysis of solids with an integrating sphere that measures the diffuse reflected infrared energy from a 150 mm<sup>2</sup> spot. The spectral analysis was performed from 9000 to 4000 cm<sup>-1</sup> with 8 cm<sup>-1</sup> resolution. Thirty-two scans were recorded and averaged for each sample and compared to a sintered gold standard (used as background) to obtain the diffuse reflectance spectrum of the sample. NIR spectra were directly recorded on wood powder samples using quartz recipient with flat bottom. The powder sample timber occupied at least 75% of the container presenting a depth of 25 mm. The powder sample was shaken and an aliquot belonging to the top of the package was selected to be placed in the container in order to homogenize the particle size. The degree of compaction of the powder in the container was not measured, but was similar for all samples in order to avoid effect of density.

### **2.4 PLS-R model statistics**

The relationship of the essential oil with the NIR spectra was developed via partial least squares (PLS) regressions using the The Unscrambler (CAMO AS, Norway, v. 9.7) software. First derivatives (13-point filter and a second order

polynomial) using the Savitsky and Golay<sup>26</sup> algorithm was applied to the NIR spectra to reduce the noise and enhance the calibrations.

Firstly, the PLS-R calibrations based on the complete data set of 103 samples (it was not possible to carry out triplicate analysis for each tree) were performed in cross-validation mode with a maximum of twelve latent variables (LV) using 8 segments with 12-13 samples selected randomly. Four outliers were identified and removed from a visual examination of the student residuals and leverage value scatter plot. The Martens uncertainty test<sup>27</sup> was used to select the wavenumbers with regression coefficients significantly different from zero for oil content calibrations. The number of LV's adopted for each model corresponded to the first minimal residual variance. As suggested in Hein *et al.*,<sup>28</sup> these preliminary cross-validations were used to identify the best pre-treatments, the optimal number of latent variables, the outlier samples and the wavenumbers with significant regression coefficients. Thus, final PLS-R model was then developed based on the parameters defined in cross-validation model (pre-treatment, wavelength range, outliers) using a separate calibration set and validated by a test set. The calibration subset had 67 samples, and the validation subset had 32 samples. The complete sample set was ranked in ascending order and split into two uniformly distributed subsets to form the training and the test sets. This procedure, as performed in Hein *et al.*,<sup>29</sup> allowed high control of the variation of traits within each subset.

The cross-validations and test set-validations were examined using the following statistics: (i) coefficient of determination between measured and predicted values ( $R^2$ ); (ii) root mean of standard error of cross-validation (RMSECV) and test set validation (RMSET); (iii) ratio of performance to deviation (RPD); and (iv) the number of latent variables (LV). RMSE's and LV should be as low as possible, and the  $R^2$  and RPD should be high. The RPD value is the ratio of the root mean standard error to the standard deviation (sd) of the reference data<sup>30</sup>

and according to Williams and Sobering<sup>30</sup> and William's tutorial<sup>31</sup> RPD makes possible a comparison between PLS-R calibrations and validations from different wood or fiber traits.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The descriptive statistics of essential oil content in *E. erythropappus* wood are listed in Table 1. "Laboratory" represents the complete database used as reference values to develop the NIR models. The descriptive statistics for the calibration and validation sets and the statistics associated to the NIR-based validations are also given in Table 1.

Table 1. Descriptive analysis of calibration and test set for estimating essential oil content and statistics associated to the PLS-R model validations

	Mean	Stand. Dev.	Min.	Max.	CV (%)	N
Laboratory	0.987	0.424	0.083	2.194	43.0	103
Calibration Set	0.991	0.351	0.401	2.040	35.4	67
Test Set	0.996	0.363	0.445	1.934	36.4	32
	R <sup>2</sup> val	RMSEV	Bias	LV	Outliers	RPD
Cross-validation	0.74	0.2156	-0.0365	3	4 of 103	1.71
Test set validation	0.79	0.2102	-0.0041	3	4 of 103	1.72

CV - coefficient of variation in percentage.

The essential oil yield of the native Candeia can vary from 1.0% to 2.0% depending on genetic and environmental factors, as shown by research conducted in different municipalities of Minas Gerais.<sup>32-34</sup> Among the investigated samples, both native and planted trees presented values for essential oil yield ranging from 0.08% to 2.19% (Table 1). In plantations of nine-year-old Candeia, Altoé<sup>35</sup> reported yields of 0.97% and 0.89% for debarked samples and

wood with bark, respectively. The amplitude of variation in oil yield is supposed to be related to genetic variability, environmental changes, stages of plant development, induction by mechanical stimuli and pathogen attack.<sup>36</sup>

The cross-validated PLS-R model developed for the 99 samples is shown in Figure 1 (4 outliers were removed). The NIR-based model for estimating essential oil content from wood yielded good coefficients of determination with a  $R^2_{cv}$  value of 0.74 and RMSECV of 0.22%. Only four outliers were identified and removed from a visual examination of the student residuals and leverage value scatter plot. This PLS-R cross-validation was developed from the first derivative NIR spectra and required three latent variables. The bias, the average difference between the NIR-predicted and lab-measured values, was calculated as -0.0365 for cross-validation.

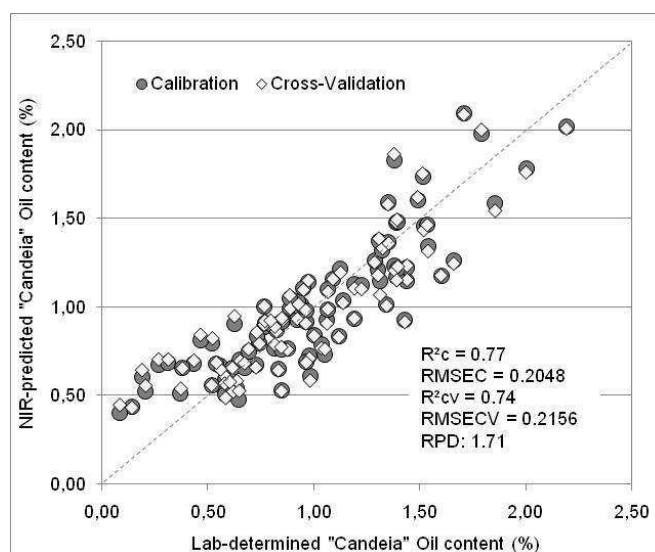


Figure 1. NIR predicted versus lab-measured values plot for essential oil content for both calibration (filled circles) and cross-validation sets (open diamonds)

Figure 2 presents the NIR-predicted versus measured essential oil content plot. The PLS-R model validation using first derivative NIR spectra also requires three latent variables and presented a  $R^2_p$  of 0.79 and RMSET of 0.21%. The dispersion of points shows a slightly non-linear relationship. Further samples would be necessary in order to verify if the lower oil content samples are being over-estimated. As with the precedent model (Figure 1), this NIR-based model for the validation test also resulted in an acceptable RPD value (1.7) for initial screenings. According to Schimleck *et al.*,<sup>37</sup> and William<sup>31</sup> RPD values greater than or equal to 1.5 are sufficient for initial readings for the purpose of selecting young trees with the potential for selection.

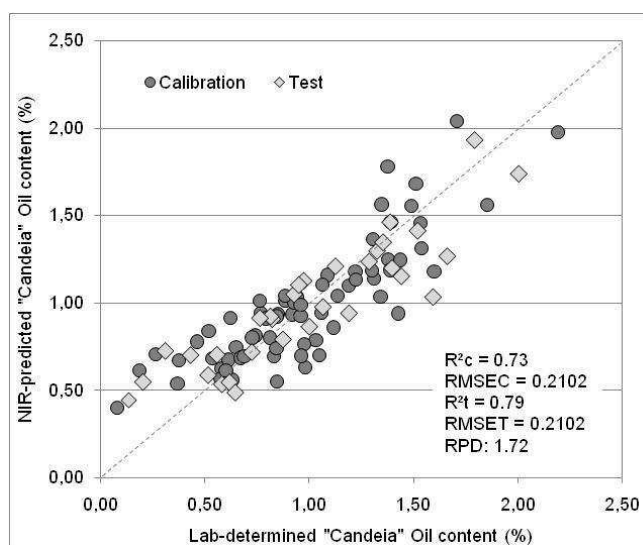


Figure 2. NIR predicted versus lab-measured values plot for essential oil content for both training (open circles) and test sets (open diamonds)

Figures 1 and 2 have demonstrated that NIR has potential as a fast and simple method to replace standard procedures for selecting trees with a high amount of essential oils. Early studies have demonstrated that it is possible to investigate

the quality of essential oil using NIR spectroscopy. For instance, Steuer *et al.*<sup>38</sup> analyzed the essential oil of various species of citrus using NIR, and Baranska *et al.*<sup>23</sup> applied NIR for monitoring quality control of essential oils from different species of *Eucalyptus*. This study has demonstrated that it is possible to estimate the essential oil content from NIR spectra recorded on samples of wood powder.

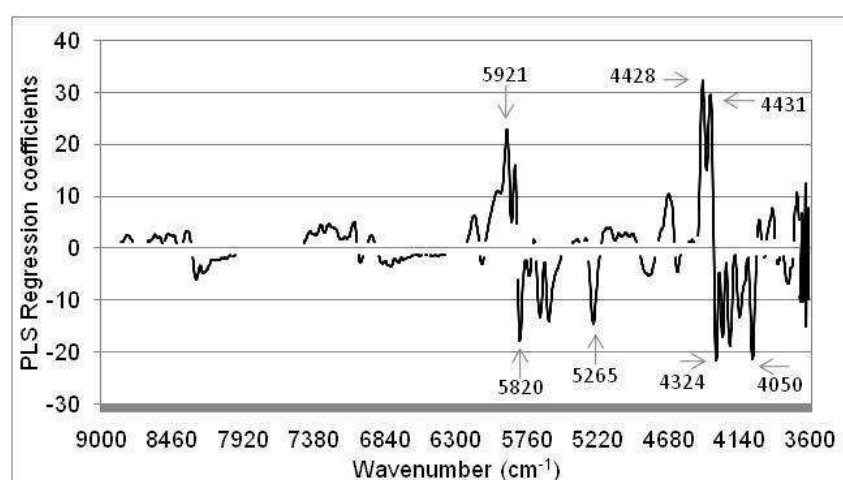


Figure 3. PLS regression coefficients for predicting essential oil content in *E. erythropappus* wood

Figure 3 shows the general plot of weighted regression coefficients (for the first derivative NIR spectra) against the wavenumbers used to perform the model presented in Figure 2 for predicting the essential oil content in *E. erythropappus* wood. The chart shows the NIR ranges with regression coefficients significantly different to zero according to Martens uncertainty test.<sup>27</sup> The analysis of the loading plots for each calibration is useful to investigate the underlying relationships that have made the estimation of essential oil content in *E. erythropappus* wood powders possible via NIR spectroscopy. The assignments of absorption bands indicated in Figure 3 are helpful to identify which wood

components and/or functional groupings were important for the PLS-R models (Figure 2).

The NIR bands important in the calibration models for essential oil content in *E. erythropappus* wood are presented in Figure 3. The indicated wavenumbers show that variations in carboxylic acids, lipids and aliphatic compounds were the key for the calibrations because these bands yielded high regression coefficients.

The peak at  $5921\text{ cm}^{-1}$  is associated with C-H aryl compounds<sup>39</sup>, and the band at  $5800\text{ cm}^{-1}$  is associated with variations in hemicellulose present in the powder samples.<sup>40</sup> These two NIR bands appear to be important for determining essential oil content using NIR spectroscopy. The absorbance at  $5263\text{ cm}^{-1}$  suggests that the functional group C=O carbonyl, assigned to carboxylic acids, was also important for the model calibration.<sup>39</sup> The high regression coefficient at  $4324\text{ cm}^{-1}$  indicates that lipids played an important role in NIR-based models for essential oil and that aliphatic compounds were also important for PLS-calibrations as a minimum occurred at  $4050\text{ cm}^{-1}$ . Variations at  $4050\text{ cm}^{-1}$  are attributed to the C-H methyl, associated with aliphatic  $\text{RC}(\text{CH}_3)_3$  or  $\text{RCH}(\text{CH}_3)_2$ .<sup>39</sup> According to Schwanninger *at al.*<sup>40</sup> variation at  $4063\text{ cm}^{-1}$  can be associated with variations in starch. Bands at  $4428$  and  $4431\text{ cm}^{-1}$  seem to be important for essential oil calibration as they had high coefficient regressions ( $\sim 30$ ), but the assignments of these bands are unknown.

According to some studies, the major component of essential oil of *E. erythropappus* is  $\alpha$ -bisabolol, and this component can vary from 63% to 92% of the total oil depending on the method of extraction.<sup>41,42</sup> Altoe<sup>34</sup> studied the total essential oil content and  $\alpha$ -bisabolol content in plantations of nine-year-old *E. erythropappus* at different spacings and observed that the levels of  $\alpha$ -bisabolol are strongly correlated to the total essential oil content. Thus, when selecting



individuals with high essential oil content, we are indirectly selecting those with higher levels of  $\alpha$ -bisabolol, which is of interest to industry.

NIR-based models can be applied in samples removed from trees using a drilling machine system allowing predictions of essential oil content in large populations of Candeia, as required by genetic studies and for developing sustainable strategies for industrial utilization of essential oil and  $\alpha$ -bisabolol. This approach was successfully used by Brawner et al.<sup>43</sup>, who have reported findings from a study using these techniques in *Corymbia citriodora* progeny trials for improving their pulp productivity.

The predictive model presented here could be applied to guide wood managers for selecting the trees with the high oil content before harvesting. Furthermore, a large Candeia population can be evaluated (high throughput phenotyping) and genetic studies could be performed.

#### **4. CONCLUDING REMARKS**

Our results indicate that it is possible to assess the essential oil content in unknown samples of *Eremanthus erythropappus* wood using NIR spectroscopy. The NIR-based predictions in a validation set had a high association ( $R^2=0.79$ ) with the laboratory determined values for essential oil content in Candeia wood powder.

#### **5. ACKNOWLEDGMENTS**

The authors extend special thanks to Citroleo for providing trees and to the Department of Forest Science and to the Department of Chemistry of the Federal University of Lavras (UFLA, Brazil) for supporting the experimental work and laboratory facilities. This study was funded by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil).

## 6. REFERENCES

1. J.R.S. Scolforo, A.D. Oliveira and A.C. Davide. “Manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência em Minas Gerais”. Ed. UFLA, Lavras (2012).
2. I.L. Andrade, J.M. Bezerra, M.A. Lima, R.A. Faria, M.A. Lima, M. Andrade-Neto, F.S. Cavalcanti and A.L. Mesquita. “Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*”. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5879-5881 (2004).
3. R. Vila, A.I. Santana, R. Pérez-Rosés, A. Valderrama, M.V. Castelli, S. Mendonça, S. Zacchino, M.P. Gupta and S. Cañigüeral. “Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of  $\alpha$ -bisabolol”. *Bioresour. Technol.* **101**, 2510-2514 (2010).
4. N. Tabanca, B. Demirci, S.L. Crockett, K.H. Baser and D.E. Wedge. “Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils”. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8430-8435 (2007).
5. A.T. Oliveira Filho and M. Fluminhan Filho. “Ecologia da vegetação do parque florestal Quedas do Rio Bonito”. *Cerne.* **5**, 51-64 (1999).
6. F.A. Vieira, C.G. Fajardo and D. Carvalho. “Floral biology of candeia (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae)”. *Pesquisa Florestal Brasileira.* **32**, 1-5 (2012).
7. A.P.P. Galdino, J.O. Brito, R.F. Garcia and J.R.S. Scolforo. “Estudo sobre o rendimento e qualidade do óleo de candeia (*Eremanthus* ssp) e a influência das diferentes origens comerciais de sua madeira”. *Rev. Bras. Plant. Med.* **8**, 44-46 (2006).
8. J.S. Shenk, J.J. Workman and M.O. Westerhaus. “Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products”. In: D.A. Burns and E.W. Ciurczak

- (eds) Handbook of Near-Infrared Analysis, Marcel Dekker Inc., New York (2001).
9. S. Tsuchikawa. "A review of recent near infrared research for wood and paper". *Appl. Spectrosc. Rev.* **42**, 43-71 (2007).
  10. S. Tsuchikawa and M. Schwanninger. "A review of recent near-infrared research for wood and paper". *Appl. Spectrosc. Rev.* **48**, 43-71 (2013).
  11. D.A. Burns and E.W. Ciurczak. "*Handbook of near-infrared analysis*". 3th ed., Boca Raton: CRC (2008).
  12. C. Pasquini. "Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications". *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 198-219 (2003).
  13. P.D. Jones, L.R. Schimleck, R.D. Daniels, A. Clark and R.C. Purnell. "Comparison of *Pinus taeda* L. whole-tree wood property calibrations using diffuse reflectance near infrared spectra obtained using a variety of sampling options". *Wood Sci. Technol.* **42**, 385–400 (2008).
  14. H. Schulz, G. Özkan, M. Baranska, H. Krüger and M. Özcan. "Characterization of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy". *Vib. Spectrosc.* **39**, 249–256 (2005).
  15. H. Schulz, M. Baranska, H-H. Belz, P. Rösch, M.A. Strehled and J. Popp. "Chemotaxonomic characterisation of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements". *Vib. Spectrosc.* **35**, 81–86 (2004).
  16. C.W. Huck, W. Guggenbichler and G.K. Bonn. "Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry". *Anal. Chim. Acta.* **538**, 195-203 (2005).
  17. N.S. Mokgalaka, S.P. Lepule, T. Regnier and S. Combrinck. "Near-infrared spectroscopy and chemometrics for rapid profiling of plant secondary metabolites". *Pure Appl. Chem.* **85**, 2197-2208 (2013).

18. M. Sandasi, G.P.P. Kamatou, C. Gavaghan, M. Baranska and A.M. Viljoen. "A quality control method for geranium oil based on vibrational spectroscopy and chemometric data analysis". *Vib. Spectrosc.* **57**, 242-247 (2011).
19. M.N. Escamilla, F.R. Sanz, H. Li, S.A. Schönbichler, B. Yang, G.K. Bonn and C.W. Huck. "Rapid determination of baicalin and total baicalein content in *Scutellariae radix* by ATR-IR and NIR spectroscopy". *Talanta* **114**, 304-310 (2013).
20. H. Schulz, R. Quilitzsch and H. Kruger. Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy". *J. Mol. Struct.* **661**, 299-306 (2003).
21. B. Wedding, R. White, S. Grauf, D. Coomans, S. Nottingham and P. Gadek. "The determination of essential oils in Sandalwood via NIR Spectroscopy". In: 12th Australian Near Infrared Spectroscopy Group (ANISG) Conference, 7-10 May 2006, Rockhampton (2006).
22. S. Kuriakose and I.H. Joe. "Feasibility of using near infrared spectroscopy to detect and quantify an adulterant in high quality sandalwood oil". *Spectrochim. Acta.* **115**, 568-573 (2013).
23. M. Baranska, H. Schulz, S. Reitzenstein, U. Uhlemann, M.A. Strehle, H. Krüger, R. Quilitzsch, W. Foley and J. Popp. "Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of *Eucalyptus* essential oils". *Biopolymers* **78**, 237-248 (2005).
24. M.S. Gomes, M.G. Cardoso, P.E. Souza, S.M.F. Machado, L.F. Silva, M.L. Teixeira, J. Andrade, C.A.S.F. Miranda and M.A. Andrade. "Multivariate analysis of the essential oil components of the genus *Citrus* and their antifungal activity". *Científica.* **41**, 111-121 (2013).

25. F.A. Pimentel, M.G. Cardoso, A.P.S.P. Salgado, P.M. Aguiar, V.F. Silva, A.R. Morais and D.L. Nelson. "A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants". *Quím. Nova.* **29**, 373-375 (2006).
26. A. Savitzky and M.J.E. Golay. "Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures". *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639 (1964).
27. F. Westad and H. Martens. "Variable selection in near infrared spectroscopy based on significance testing in partial least square regression". *J. Near Infrared Spectrosc.* **8**, 117-124 (2000).
28. P.R.G. Hein, A.C.M. Campos, J.T. Lima, P.F. Trugilho and G. Chaix. "Near infrared spectroscopy for estimating wood basic density in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis*". *Cerne.* **15**, 133-141 (2009).
29. P.R.G. Hein, L. Brancheriau, P.F. Trugilho, J.T. Lima and G. Chaix. "Resonance and near infrared spectroscopy for evaluating dynamic wood properties". *J. Near Infrared Spectrosc.* **18**, 443-454 (2010).
30. P.C. Williams and D.C. Sobering, "Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds", *J. Near Infrared Spectrosc.* **1**, 25-33 (1993)
31. P.C. Williams. "Tutorial: The RPD statistic: a tutorial note". *NIR News* **25**, 22-26 (2014) doi: 10.1255/nirn.1419
32. J.F. Camolesi. "Volumetria e teor  $\alpha$ -bisabolol para a candeia *Eremanthus erythropappus*". Universidade Federal de Lavras, Lavras (2007).
33. J.R.S. Scolforo, J.F.M. Pérez, J.M. Mello, A.D. Oliveira, J.F. Camolesi, L.F.R. Borges and F.W. Acerbi Júnior. "Estimativa de volume, peso seco, peso de óleo e quantidade de moirões para a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)". *Cerne.* **10**, 87-102 (2004).
34. J.R.S. Scolforo, A.D. Oliveira and F.W. Acerbi Júnior. "Inventário florestal de Minas Gerais: equações de volume, peso de matéria seca e carbono para

- diferentes fisionomias da flora nativa”. Universidade Federal de Lavras, Lavras (2008).
35. T.F. Altoé. “Sustentabilidade de plantações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) na produção e qualidade de óleo essencial”. Universidade Federal de Lavras, Lavras (2012).
  36. L. Gobbo Neto and N.P. Lopes. “Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários”. *Quim. Nova.* **30**, 374-381 (2007).
  37. L.R. Schimleck, J.C. Doran and A. Rimbawanto. “Near infrared spectroscopy for cost-effective screening of foliar oil characteristics in a *Melaleuca cajuputi* breeding population”. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2433-2437 (2003).
  38. B. Steuer, H. Schulz and E. Laèger. “Classification and analysis of citrus oils by NIR spectroscopy”. *Food Chem.* **72**, 113-117 (2001).
  39. J.J. Workman and L. Weyer. “Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy”. CRC Press, New York (2007).
  40. M. Schwanninger, J.C. Rodrigues and K. Fackler. “A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components”. *J. Near Infrared Spectrosc.* **19**, 287-308 (2011).
  41. A.M.A. Nascimento, M.G.L. Brandão, G.B. Oliveira, I.C.P. Fortes and E. Chartone-Souza. “Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or  $\beta$ -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*”. *Antonie van Leeuwenhoek.* **92**, 95-100 (2007).
  42. A.T. Souza, T.L. Benazzi, M.B. Grings, V. Cabral, E.A. Silva, L. Cardozo-Filho and O.A.C. Antunes. “Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide”. *J. Supercrit. Fluids.* **47**, 182-187 (2008).

43. J.T. Brawner, R. Meder, M. Dieters, D.J. Lee. "Selection of *Corymbia citriodora* for pulp productivity" *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, **74**, 121-131 (2012)