

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
BIOQUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Metabolismo e Expressão Gênica de *Ocimum basilicum*
L. sob Diferentes Condições de Cultivo com Nitrogênio
e Avaliação da Produção, Qualidade e Atividade
Biológica do Óleo Essencial.**

Silvana Constantino Rocha Barreto

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - BIOQUÍMICA

**METABOLISMO E EXPRESSÃO GÊNICA DE OCIMUM BASILICUM
L. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO COM NITROGÊNIO
E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO, QUALIDADE E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL.**

SILVANA CONSTANTINO ROCHA BARRETO

Sob a orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

e Co-orientação dos Professores
Flávio Couto Cordeiro
Joecildo Francisco Rocha

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Química, Área de Concentração em
Bioquímica

Seropédica, RJ
Junho de 2014

583.96

B273m

T

Barreto, Silvana Constantino Rocha, 1975-
Metabolismo e expressão gênica de
Ocimum basilicum L. sob diferentes
condições de cultivo com nitrogênio e
avaliação da produção, qualidade e
atividade biológica do óleo essencial /
Silvana Constantino Rocha Barreto - 2014.
263 f.: il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.
Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Química-Bioquímica.
Bibliografia: f. 103-119.

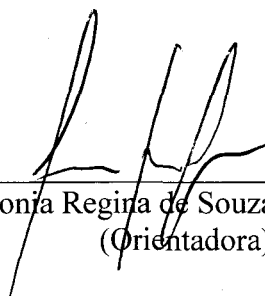
1. Manjerição - Teses. 2. Essências e
óleos essenciais - Teses. 3. Plantas -
Metabolismo - Teses. 4. Plantas - Efeito
do nitrogênio - Teses. I. Souza, Sonia
Regina de, 1962-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Química-Bioquímica. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA-ÁREA DE BIOQUÍMICA

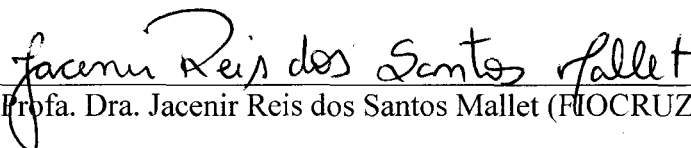
SILVANA CONSTANTINO ROCHA BARRETO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Bioquímica.

TESE APROVADA EM 11/06/2014



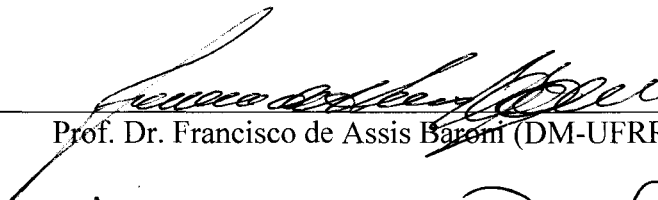
Prof. Dra. Sonia Regina de Souza (DEQUIM-UFRRJ)
(Orientadora)



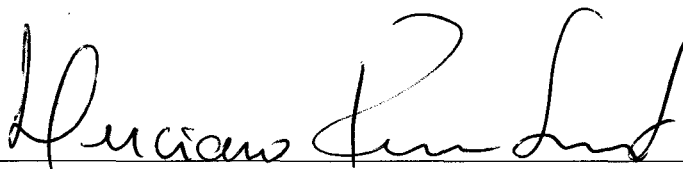
Prof. Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet (FIOCRUZ)



Prof. Dra. Ana Carolina Callegario Pereira (DEA-UNIFOA)



Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni (DM-UFRRJ)



Prof. Dr. Luciano Suzart (DEQUIM-UFRRJ)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Cleber Bomfim Barreto júnior,
Aos meus pais Edson da Silva Rocha e Maria Elizete Constantino Rocha.

À: Marrie, Natasha, Sheldon, Natalie e Nicole.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que conquistei até hoje e pelas pessoas maravilhosas que tive o privilégio de conhecer, conviver e me apegar ao longo dos anos.

Aos meus pais e irmãs que amo demais e sempre estiveram ao meu lado me apoiando incondicionalmente em todos os momentos.

Ao amor da minha vida, meu marido, Cleber Bomfim Barreto Jr, companheiro de todas as horas, confidente e ajudante nas horas vagas para me acompanhar nos fins de semana sempre presente no laboratório e na casa de vegetação elaborando e instalando o sistema de irrigação, e também por bater os espectros de RMN do óleo para minha tese.

A minha querida orientadora, professora Sonia, que mora no meu coração. Obrigada por aceitar orientar uma estudante que caiu de para-quedas na sua vida, num dia era candidata no outro já era sua orientada, perturbando a sua vida e interferindo em tudo como um micro RNA. Agradeço pela paciência, pela dedicação, pela amizade e por sempre ser muito presente na minha vida, por todos os conselhos e orientações que sempre me ajudaram muito.

A minha irmã de coração Mariam Lis que participou ativamente de todas as etapas e de cada passo que dei no andamento do trabalho, sempre presente e disposta a por a mão na massa para trabalhar na casa de vegetação e no laboratório organizando tudo e todos com seu jeito todo especial de ser. Obrigada pela amizade, pelos seus conselhos sempre muito valiosos e seu apoio e acompanhamento mesmo nas horas mais difíceis, sempre me colocando pra cima.

Ao meu Co-orientador: Flávio Cordeiro e a Daiana sua esposa, pelo companheirismo, pela amizade, por toda a ajuda braçal e mental, pela ajuda na aquisição, coleta e peneiragem do solo, nos cálculos de adubação, nas primeiras análises estatísticas, na implantação do experimento, na coleta enfim, por suas orientações.

Ao meu Co-orientador: Joecildo Francisco Rocha que teve uma participação muito especial e importante no trabalho na orientação da análise da anatomia foliar.

Aos meus amigos queridos Pós-graduandos: Diego de Mello por sua amizade e companheirismo, sempre com boa vontade de me ajudar em tudo, principalmente nas coletas, nas análises e suas explicações sobre os programas de gráficos. Ao Marcus Loss que teve uma participação fundamental no trabalho, me ajudando com toda a parte de expressão gênica desde os primers até as análises, obrigada pela paciência e boa vontade de me ajudar. À Renata Aparecida minha amigona do peito, e confidente que me acompanhou nos dois primeiros anos de curso nas disciplinas, nunca te esquecerei. As minhas queridas amigas Luiziene Soares e Marcela Jacques presentes em todos os momentos seja no laboratório ou nas nossas confraternizações, e ao janiélio meu companheiro e colega de disciplina e Daniele minha amiga e companheira de seminário da química.

Aos meus pupilos e estimados estagiários e bolsistas do laboratório 25 que me ajudaram muito nos experimentos em casa de vegetação e nas análises laboratoriais: Carla Patricia, Glória Lucia, Rodrigo, Hudson, Caio, Bruno, Raíssa Rainha, Katherine Pacheco e Bruno.

Aos Técnicos administrativos do PQ que tanto fizeram por mim: France, Fábio e Carlão.

Aos Professores do PQ sempre presentes: André Marques, Cristiano, Cristiane Salles, Rosane Nora, Marco Edilson, Emerson e Marco André.

Ao Professor do Instituto de veterinária: Francisco Baroni que me recebeu tão bem no seu laboratório, sempre muito atencioso e teve muita paciência comigo, pois tivemos que fazer vários ensaios de fungos.

A Profa Jacenir Mallet da Fiocruz que me acolheu de braços abertos como uma mãezona e me deixou a vontade e forneceu toda a infraestrutura necessária para trabalhar.

Aos técnicos da Fiocruz sempre receptivos e dispostos a me ajudar: Romulo e Roger, o saudoso Sr Luciano do ponto crítico e ao sr. Genésio.

As duas pessoas que começaram tudo isso e me ajudaram a ingressar na Pós-graduação: Roberta Ribeiro e Élio Barbieri, obrigada pelo apoio.

À CAPES e ao PPGQ pela concessão da bolsa e apoio, e a FAPERJ pelo fomento à realização dessa pesquisa.

RESUMO

BARRETO, Silvana Constantino Rocha. **Metabolismo e Expressão Gênica de *Ocimum basilicum* L. sob Diferentes Condições de Cultivo com Nitrogênio e Avaliação da Produção, Qualidade e Atividade Biológica do Óleo Essencial** 2014. 265p Tese (Doutorado em Química, Área Bioquímica de plantas). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O objetivo desta tese foi avaliar a influência do fornecimento diferencial de nitrogênio sobre o metabolismo, o rendimento e a qualidade do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço). Foram conduzido dois experimentos em casa de vegetação, sendo o primeiro com a variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetida a doses contrastantes de N-Nitrato (50 e 300 Kg de N.ha⁻¹). No segundo as variedades *Sweet Italian Large Leaf* e Maria Bonita foram cultivadas com as doses de 50 ou 100 Kg N. ha⁻¹, em três fontes (nitrato, nitrato de amônio e amônio). As análises feitas após as coletas das plantas foram: atividade da nitrato redutase, N-Nitrato, N-amônio, N-amino, N-total e açúcares solúveis. O óleo essencial foi extraído por arraste de vapor de água e o perfil do óleo dessas variedades foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG-MS) e com detector de ionização por chama (CG-FID) e RMN ¹H. Após a caracterização do óleo essencial foram realizados testes para avaliar a atividade alelopática e a atividade antifúngica sobre os fungos *Rhizoctonia Solani*, *Fusarium oxysporum*, *Geothricum* spp, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. O efeito do óleo na morfologia dos fungos foi realizado através de microscopia eletrônica de varredura. Foi avaliada a expressão gênica por qPCR em tempo real das enzimas 3-hidroxi 3-metil glutaril CoA redutase, 1-Deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase, linalol sintase, fenilalanina amônia-liase e eugenol sintase envolvidas na biossíntese de óleo essencial. E Análises anatômicas avaliaram os tricomas secretores. O fornecimento de 50 Kg N-nitrato.ha⁻¹ promoveu maior rendimento de óleo essencial (1,14%) na variedade *Sweet Italian Large Leaf* e maior concentração de linalol (28,04%). O teor de açúcares pode ser uma estratégia para garantir a disponibilidade de assimilados para as vias mevalonato, metil eritrol fosfato e chiquimato para produzir metabólitos secundários. Nos ensaios alelopáticos a concentração de 15 mg.mL⁻¹ de óleo essencial inibiu a germinação das sementes de alface. O óleo essencial de manjeriço demonstrou ação fúngistática e de acordo com as observações ultraestruturais é possível que seu mecanismo de ação seja por interação com os componentes da membrana celular dos fungos. O fornecimento de 100 Kg.ha⁻¹ de nitrato de amônio promoveu maior rendimento de óleo essencial (1,46%) e teor de linalol (69,25%) na cv Maria Bonita, e a variedade *Sweet Italian Large Leaf* demonstrou ser adaptada às condições de escassez de nutrientes apresentando rendimento de 0,37% e 38,9% de linalol sem N. O fornecimento diferencial de N induziu a expressão dos genes que codificam para as enzimas chaves de produção de óleo essencial, sendo o nitrogênio um modulador da expressão gênica, e assim, a produção de metabólitos secundários é regulada transcricionalmente em manjeriço. Os resultados anatômicos mostraram que a produção de óleo essencial não depende dos tricomas secretores contrariando os relatos da literatura em manjeriço frente à escassez de tricomas observados e a predominância de gotículas de óleo espalhadas pelo mesófilo. Esses resultados são inéditos na espécie e sugerem que os tricomas não atuam exclusivamente na produção de óleo essencial.

Palavras-chave: Manjeriço. Linalol. Tricoma secretor.

ABSTRACT

BARRETO, Silvana Constantino Rocha. **Metabolism and Gene Expression of *Ocimum basilicum* L. under Different Cultivation Conditions on Nitrogen and Evaluation of Production, Quality and Biological Activity of the Essential Oil.** 2014. 265p Thesis (Ph.D. in Chemistry, Area of Biochemistry plants). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The aim that this thesis was to evaluate the influence of differential nitrogen supply on metabolism, yield and quality of essential oil of *Ocimum basilicum* (basil). Two experiments were conducted in a greenhouse, in the first variety Sweet Italian Large Leaf subjected to contrasting doses of nitrate-N (50 and 300 kg N ha⁻¹). In the second, the varieties Sweet Italian Large Leaf and Maria Bonita were cultured with doses of 50 or 100 kg N in three sources (nitrate, ammonium and ammonium nitrate). Analyses after harvesting of plants were: nitrate reductase activity, nitrate-N, ammonium-N, amino-N, total-N and soluble sugars. The essential oils from basil were extracted with steam distillation and essential oil components were analyzed using gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) and ¹HNMR. After the characterization of the essential oil tests were conducted to evaluate the allelopathic activity and antifungal against the fungi *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Geothricum* spp, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. The effect of oil on the morphology of fungi was performed by scanning electron microscopy. Gene expression was evaluated by real-time qPCR of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl CoA reductase enzyme, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, linalool synthase, phenylalanine ammonia lyase and eugenol synthase involved in the biosynthesis of essential oil. And anatomical analyzes evaluated the secretory trichomes. The supply of 50 Kg nitrate-N.ha⁻¹ increased the yield (1.14%) and concentration of linalool (28.04%) in Sweet Italian Large Leaf. The sugars can be a strategy to ensure the availability of assimilates to mevalonate, methyl erythritol phosphate and shikimate pathways to produce secondary metabolites. At concentrations of 15 mg.mL⁻¹ basil essential oil inhibited the germination of lettuce seeds. The basil essential oil showed fungistatic and according to the ultrastructural observations it is possible that its mechanism of action is by interaction with components of the cell membrane of fungi. The supply of 100 kg ha⁻¹ of ammonium nitrate resulted in higher (1.46%) and linalool content (69.25%) in the essential oil of Maria Bonita variety, and Sweet Italian Large Leaf variety seems to be adapted conditions of nutrient scarcity with oil yield of 0.37% and 38.9% linalool. The differential N supply induced the expression of genes encoding key enzymes in the production of essential oil, and nitrogen is modulator of gene expression and thus the production of secondary metabolites is regulated at transcriptional level in basil. Anatomical results showed that the essential oil production does not depend on secretory trichomes contradicting reports in the literature in front of basil shortage of trichomes observed and the predominance of oil as droplets scattered throughout the mesophyll. These results are unpublished in the species and suggest that trichomes do not act exclusively in the production of essential oil.

Key words: Basil. Linalool. Secretory trichomes.

LISTA DE ABREVIATURAS

3PGA	3-fosfoglicerato (3-phosphoglycerate)
ATP	Adenosina trifosfato
CG/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa
CoA	Coenzima A
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMAP	Dimetilalil pirofosfato (Dimethylallyl pyrophosphate)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
DXS	1-Deoxi- D-xilulose fosfato sintase (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase)
E4P	Eritrose 4-fosfato (Erythrose 4-phosphate)
EGS	Eugenol sintase (Eugenol synthase)
FPP	Farnesil pirofosfato (farnesyl pyrophosphate)
GA3P	Gliceraldeído 3-fosfato (Glyceraldehyde 3-phosphate)
GDH	Glutamato desidrogenase
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato (geranylgeranyl pyrophosphate)
GOGAT	Glutamato sintase
GPP	Geranil pirofosfato (geranyl pyrophosphate)
GS	Glutamina sintetase
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
HMGR	Hidroxi metil glutaril CoA redutase
IPP	Isopentenil pirofosfato (Isopentenyl pyrophosphate)
LIS	Linalol sintase (Linalool synthase)
MEP	Via metil eritrol fosfato (methyl-erythritol-phosphate pathway)
MVA	Via do mevalonato (Mevalonate pathway)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N	Nitrogênio
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NiR	Nitrito Redutase
NPK	Adubo contendo Nitrogênio, Fósforo e Potássio.
NR	Nitrato redutase
PAL	Fenil alanina amônia liase
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PEP	Fosfoenolpiruvato (phosphoenolpyruvate)
PEPc	Fosfoenolpiruvato carboxilase
Phe	Fenilalanina
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
TNG	Tricoma não glandular
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
TSC	Tricoma secretor capitado
TSP	Tricoma secretor peltado
UV	Radiação ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>), variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> .	3
Figura 2. Plantas de <i>Ocimum basilicum</i> cultivar Maria Bonita.	4
Figura 3. Vias do metabolismo de nitrogênio e de carbono em plantas.	8
Figura 4. Absorção de nitrato (NO_3^-) e de amônio (NH_4^+) através da membrana plasmática de plantas.	9
Figura 5. Redução do NO_3^- a NO_2^- no citossol pela enzima Nitrato redutase (NR) e do NO_2^- a NH_4^+ pela enzima Nitrito redutase (NiR) no plastídeo.	10
Figura 6. Esquema que ilustra a relação entre metabolismo primário e secundário, destacando (setas) a origem dos metabólitos secundários a partir da glicose e do CO_2 fotossintético.	12
Figura 7. Esquema das vias citossólica e plastidial para a biossíntese de Isopentenil Pirofosfato (IPP) e Dimetilalil Pirofosfato (DMAPP) e das moléculas formadas a partir destes.	13
Figura 8. Esquema das vias da biossíntese de Isopentenil pirofosfato (IPP) e Dimetilalil pirofosfato (DMAPP) em plantas.	14
Figura 9. Modelo proposto para a 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) de plantas na membrana do retículo endoplasmático (RE).	16
Figura 10. Proposta para estrutura tridimensional da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) em <i>T. brevicorniculatum</i> .	16
Figura 11. Etapas na reação de redução da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR).	17
Figura 12. Proposta para o mecanismo de reação da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase em bactéria.	17
Figura 13. Metabolismo do ácido mevalônico ao isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP).	18
Figura 14- Principais monoterpenos (do linalol ao neral), sesquiterpenos (do α -humuleno ao α -bergamoteno) sintetizados nos tricomas glandulares de manjeriço.	19
Figura 15. Reação Geranyl pirofosfato sintase e estrutura do linalol.	20
Figura 16. Separação dos enântiômeros do linalol isolados de <i>O. basilicum</i> com predominância do isômero R Linalol.	21
Figura 17. Via do chiquimato em plantas.	22
Figura 18. Via de biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas.	23
Figura 19. Estrutura quaternária e terciária da enzima fenilalanina amônia liase (PAL).	24
Figura 20- Via Biossintética para biossíntese de fenilpropanóides a partir da fenil alanina amônia liase (PAL).	25
Figura 21. Estrutura da enzima eugenol sintase (EGS) e reação.	25
Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de varredura em <i>Fusarium oxysporum</i> .	27
Figura 23. Imagem de microscopia eletrônica de varredura de macroconídios em <i>Fusarium oxysporum</i> colonizando a superfície do caule de tomate cereja.	28

Figura 24. Fotografias do micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> em Placas de Petri e imagens da morfologia das hifas vegetativas.	28
Figura 25. Sintomas de infecção em plantas por <i>Rhizoctonia solani</i>	29
Figura 26. Imagens de microscopia de <i>Geothricum carabidarum encontrados no intestino de besouros e lepdopteros</i>	30
Figura 27. Morfologia de <i>Candida albicans</i> (esquerda) e etapas de invasão em processo de infecção do hospedeiro (direita).	31
Figura 28. Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície externa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Figura 29. Ilustração de Tricomas não glandulares e glandulares.....	33
Figura 30. Imagens em microscopia eletrônica dos tricomas de <i>Ocimum basilicum</i>	35
Figura 31. Plântulas de manjericão variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> aos dois dias após a germinação, cultivadas em casa de vegetação da UFRRJ	37
Figura 32. Plântulas de manjericão variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> aos quinze dias após a germinação, cultivadas em casa de vegetação Depto. Química da UFRRJ.	37
Figura 33-Mudas de manjericão variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> produzidas em casa de vegetação (Depto. Química. UFRRJ) com sombrite 50% e irrigação por microaspersores	38
Figura 34. Plantas da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> na época do florescimento submetidas a duas doses de nitrato em casa de vegetação (Depto. Química. UFRRJ).	38
Figura 35. Extração alcoólica no material vegetal fresco. Etapa de partição utilizando clorofórmio para promover a separação da fase polar (aquosa) e apolar (clorofórmio)	39
Figura 36. Extração e evaporação do óleo essencial.	40
Figura 37. Plantas da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i>	43
Figura 38. Plantas de manjericão cultivar Maria Bonita.	44
Figura 39. Fotografia do experimento com cultivo de células de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	47
Figura 40. Preparo do material para visualização em microscopia eletrônica de varredura. ...	48
Figura 41. A) Atividade da enzima nitrato redutase, teores de B) N- NO ₃ ⁻ , C) N-NH ₄ ⁺ , D) N-amino livre, E) N-total e F) açúcares solúveis nas folhas e no caule das plantas de manjericão em função do suprimento com 50 e 300 Kg N. ha ⁻¹	53
Figura 42. Rendimento de óleo essencial (%)	55
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H do óleo essencial manjericão variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> em clorofórmio deuterado (CDCl ₃) do tratamento com 50 kg N.ha ⁻¹	56
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H do óleo essencial Manjericão variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> em clorofórmio deuterado (CDCl ₃) do tratamento com 300 kg N.ha ⁻¹	56
Figura 45. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha ⁻¹ com a co-injeção dos padrões de alcanos	58
Figura 46. Análise cromatográfica por ionização por chama (CG-FID) dos componentes do óleo essencial variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 300 Kg N.ha ⁻¹ com a co-injeção dos padrões de alcanos	58

Figura 47. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de linalol (Sigma-Aldrich)	59
Figura 48. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich)	59
Figura 49. . Fotografias em Placas de Petri do sétimo dia do ensaio alelopático de óleo essencial de manjerição, <i>variedade Sweet Italian Large Leaf</i> em sementes de alface.....	61
Figura 50. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do óleo essencial de manjerição <i>variedade Sweet Italian Large Leaf</i> em <i>Fusarium oxysporum</i>	63
Figura 51. Teores de A) N- NO ₃ ⁻ , B) N-NH ₄ ⁺ , C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência na variedade <i>Sweet Italin Large Leaf</i>	65
Figura 52. Teores de A) N- NO ₃ ⁻ , B) N-NH ₄ ⁺ , C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência na cultivar Maria Bonita.	66
Figura 53. Conteúdos de A) N- NO ₃ ⁻ , B) N-NH ₄ ⁺ , C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência na variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i>	68
Figura 54. Conteúdos de A) N- NO ₃ ⁻ , B) N-NH ₄ ⁺ , C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência, respectivamente, na cultivar Maria Bonita.	69
Figura 55. Teor e conteúdo de N-Total em <i>Sweet Italian Large Leaf</i>	70
Figura 56. Teor e conteúdo de N-Total na cultivar Maria Bonita.	71
Figura 57. Teores e conteúdos de N acumulados na raiz, caule, folha e inflorescência sob os diferentes níveis e fontes de N.....	72
Figura 58. Ensaio de difusão em disco para espécies de <i>Candida</i>	78
Figura 59. Ensaio de difusão em disco para <i>Geothricum</i> spp.	79
Figura 60. Microscopia óptica dos fungos utilizados nos ensaios com óleo essencial de manjerição, cultivar “Maria Bonita” (aumento de 1000 X).	79
Figura 61. imagens de microscopia eletrônica de varredura em <i>C. albicans</i>	81
Figura 62. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de <i>C. guillermondii</i>	82
Figura 63. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de <i>C. parapsilosis</i>	83
Figura 64. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de <i>C. Krusei</i>	84
Figura 65. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de <i>Geothricum</i> spp.....	85
Figura 66. Ensaio <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do óleo essencial da cultivar Maria Bonita em <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	86
Figura 67. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura em <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	87
Figura 68. Efeito do óleo essencial de manjerição cultivar Maria Bonita e do linalol.....	88
Figura 69. Efeito do ensaio <i>in vitro</i> do óleo essencial de manjerição cv Maria Bonita.	89
Figura 70. Imagens de microscopia eletrônica de varredura em <i>Fusarium oxysporum</i> observadas no segundo dia de experimento.	90
Figura 71. Imagens de microscopia eletrônica de varredura em <i>Fusarium oxysporum</i> , tirada no sexto dia de experimento.	91
Figura 72. Efeito do óleo essencial de manjerição cultivar Maria Bonita e do linalol, sobre o crescimento micelial do fungo <i>Rhizoctonia solani</i>	92

Figura 73. Efeito do óleo essencial de manjeriço, cultivar Maria Bonita testado nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 mg.mL ⁻¹ , do linalol (6 mg.mL ⁻¹) e antifúngico (6 mg.mL ⁻¹) sobre o crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i>	92
Figura 74. Imagens ultraestruturais em microscópio eletrônico de varredura no fungo <i>Rhizoctonia solani</i> , observadas no segundo dia de experimento.	93
Figura 75. Observações ultraestruturais em microscópio eletrônico de varredura no fungo <i>Rhizoctonia solani</i> . Imagens obtidas no quarto dia de experimento.	94
Figura 76. Expressão relativa dos genes das vias de biossíntese de óleo essencial para a variedade <i>Sweet Italian large Leaf</i>	95
Figura 77. . Expressão relativa dos genes das vias de biossíntese de óleo essencial para a cultivar Maria Bonita.....	97
Figura 78. Secções transversais do mesofilo observadas em microscopia de luz.	99
Figura 79. Secções transversais do mesofilo observadas submetidas ao teste histoquímico com sudan IV evidenciando com a cor laranja as substâncias lipídicas.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais óleos essenciais comercializados no mundo.....	6
Tabela 2- Análise do pH e dos componentes químicos encontrados na terra fina seca ao ar (TFSA) das amostras do horizonte A de um Argissolo Vermelho-Amarelo utilizado no experimento.	36
Tabela 3. Cultivo em casa de vegetação da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e da cultivar Maria Bonita sob dois níveis de N (50 ou 100Kg N.ha ⁻¹) e três fontes diferenciadas (NO ₃ ⁻ , NH ₄ NO ₃ e NH ₄ ⁺).	45
Tabela 4. Sequências dos iniciadores (“forward e reverse”) usados nas reações de PCR em tempo real para os genes que codificam as enzimas HMGR, PAL, LIS, EGS e DXS relacionadas ao metabolismo do óleo essencial de manjeriço e genes de referência actina, fator de alongamento e ubiquitina.	50
Tabela 5. Massa fresca e massa seca de folha e caule (g planta ⁻¹) de manjeriço variedade <i>Sweet Italian large Leaf</i> em função do suprimento com 50 e 300 Kg.ha ⁻¹ de nitrato	54
Tabela 6. Abundância relativa (%) dos principais compostos encontrados no óleo essencial de manjeriço variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e Índices de Kovats calculados em função do suprimento com 50 e 300 Kg.ha ⁻¹ de nitrato	57
Tabela 7. Número de sementes de alface germinadas, porcentagem de germinação e crescimento radicular sob o efeito dos tratamentos com 1,2 e 15 mg.mL ⁻¹ de óleo essencial de manjeriço, linalol e eugenol (15 mg.mL ⁻¹) verificada no sétimo dia.....	61
Tabela 8. Halo de crescimento micelial (mm) dos fungos <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Rhizoctonia Solani</i> em diferentes concentrações de óleo essencial de manjeriço (0,05; 0,10; 0,15 e 0,20 mg.mL ⁻¹) variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e seus componentes majoritários, eugenol e linalol.....	63
Tabela 9. Massa fresca total, massa fresca e massa seca de folha, de caule e de raiz (g planta ⁻¹) na época do florescimento da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e da cultivar Maria Bonita, submetidas diferentes níveis e fontes de N (kg.ha ⁻¹).....	72
Tabela 10. Massa fresca e massa seca de folhas pesadas para extração de óleo essencial, e rendimento de óleo essencial (ROE) (%) de acordo com os tratamentos para a variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e cv. Maria Bonita.....	74
Tabela 11. Abundância relativa (%) dos principais compostos encontrados no óleo essencial de manjeriço variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> , em função dos tratamentos com fontes e doses diferenciais de N.ha ⁻¹	75
Tabela 12. Abundância relativa (%) dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial de manjeriço cultivar Maria Bonita, em função dos tratamentos com fontes e doses diferenciais de N.ha ⁻¹	76
Tabela 13. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial de manjeriço, cultivar Maria Bonita nas concentrações de 50, 100, 200 e 300mg.mL ⁻¹ , do linalol e do antifúngico cicloexamida (300mg.mL ⁻¹) em <i>Candida</i> e <i>Geothricum</i> spp. avaliadas através da zona de inibição do crescimento (cm)	77

ANEXOS

Anexo 1. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich)	120
Anexo 2. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de eucaliptol (1,8 cineol) (Sigma-Aldrich).....	120
Anexo 3. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de sabineno (Sigma-Aldrich).....	121
Anexo 4. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de α -terpineol (Sigma-Aldrich) ...	121
Anexo 5. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de linalol (Sigma-Aldrich).....	122
Anexo 6. Análise cromatográfica por CG-MS da série homóloga de alcanos C ₈ -C ₂₀ (Sigma-Aldrich).....	122
Anexo 7. Análise cromatográfica por CG-MS da série homóloga de alcanos C ₂₁ -C ₄₀ (Sigma-Aldrich).....	123
Anexo 8. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento sem nitrogênio	123
Anexo 9. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 50Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	124
Anexo 10. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 100Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	124
Anexo 11. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	125
Anexo 12. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	125
Anexo 13. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ ha ⁻¹	126
Anexo 14. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ ha ⁻¹	126
Anexo 15. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento sem N	127
Anexo 16. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 50Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	127
Anexo 17. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 100Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	128

Anexo 18. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	128
Anexo 19. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	129
Anexo 20. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ ⁻ ha ⁻¹	129
Anexo 21. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ ⁻ ha ⁻¹	130
Anexo 22. Espectro de massa do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich)	131
Anexo 23. Espectro de massa do padrão de eucaliptol (Sigma-Aldrich)	132
Anexo 24. Espectro de massa do padrão de sabineno (Sigma-Aldrich).....	132
Anexo 25. Espectro de massa do padrão de α-terpineol (Sigma-Aldrich)	133
Anexo 26. Espectro de massa do padrão de linalol (Sigma-Aldrich).....	133
Anexo 27. Espectro de massa do padrão de linalol (Sigma-Aldrich).....	134
Anexo 28. Espectro de massa do padrão C ₈ -C ₂₀ (Sigma-Aldrich)	137
Anexo 29. Espectro de massa do padrão C ₂₁ -C ₄₀ (Sigma-Aldrich).....	141
Anexo 30. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento sem nitrogênio.....	147
Anexo 31. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 50Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	154
Anexo 32. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 100Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	156
Anexo 33. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	163
Anexo 34. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	169
Anexo 35. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ ha ⁻¹	174
Anexo 36. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ ha ⁻¹	181
Anexo 37. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetida ao tratamento sem nitrogênio.	186
Anexo 38. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 50Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	193
Anexo 39. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 100Kg.NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	201

Anexo 40. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	208
Anexo 41. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ NO ₃ ⁻ ha ⁻¹	211
Anexo 42. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 50Kg.NH ₄ ha ⁻¹	214
Anexo 43. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com 100Kg.NH ₄ ha ⁻¹	217
Anexo 44. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich).....	218
Anexo 45. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de eucaliptol (Sigma-Aldrich)...	219
Anexo 46. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de α-terpineol (Sigma-Aldrich).	220
Anexo 47. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de linalol (Sigma-Aldrich)	221
Anexo 48. Análise cromatográfica por CG-FID da série homóloga de alcanos C ₈ -C ₂₀ (Sigma-Aldrich).....	222
Anexo 49. Análise cromatográfica por CG-FID da série homóloga de alcanos C ₂₁ -C ₄₀ (Sigma-Aldrich).....	223
Anexo 50. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao tratamento sem suprimento de N com a co-injeção dos padrões de alcanos	224
Anexo 51. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos	225
Anexo 52. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 100 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos	226
Anexo 53. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	227
Anexo 54. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 100 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	228
Anexo 55. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha ⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	229
Anexo 56. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> submetidas ao suprimento com 100 Kg N.ha ⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	230
Anexo 57. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetida ao tratamento sem suprimento de N com a co-injeção dos padrões de alcanos	231

Anexo 58. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 50 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos	232
Anexo 59. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 100 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos	233
Anexo 60. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 50 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	234
Anexo 61. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 100 Kg N.ha ⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	235
Anexo 62. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 50 Kg N.ha ⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	236
Anexo 63. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 100 Kg N.ha ⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos	237
Anexo 64. Imagens de microscópio eletrônico de varredura no fungo <i>Rhizoctonia solani</i> com aplicação de 6 mg.mL ⁻¹ de linalol. A e B: Observações no segundo dia de experimento. C e D: Observações no quarto dia de experimento	238
Anexo 65. Imagens em microscopia eletrônica de varredura do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> com aplicação de 6 mg.mL ⁻¹ de linalol. A e B: observações obtidas no segundo dia de experimento. C e D: observações obtidas no quarto e sexto dia de experimento, respectivamente.	239
Anexo 66. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do fungo <i>Sacharomyces cerevisiae</i> . A e C: aplicação de 0,5 mg.mL ⁻¹ de óleo essencial, Be D: aplicação de 2,0 mg.mL ⁻¹ de óleo essencial, E: aplicação de 6,0 mg.mL ⁻¹ de óleo essencial e F: aplicação de 6,0 mg.mL ⁻¹ de linalol	240

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Revisão de Literatura.....	3
2.1	Manjeriçãõ (<i>Ocimum basilicum</i>): Características morfológicas e propriedades medicinais	3
2.2	Óleos essenciais de plantas	5
2.2.1	Composição e propriedades farmacológicas	5
2.2.2	Produção mundial de óleo essencial	6
2.3	A importância dos nutrientes no metabolismo de plantas	7
2.3.1	O efeito da nutrição mineral no metabolismo primário e secundário.....	7
2.4	Metabolismo primário e secundário	11
2.5	Biossíntese de metabólitos secundários:.....	12
2.5.1	Via do mevalonato (MVA) e via metil eritrol fosfato (MEP) para biossíntese de isoprenos.....	12
2.5.2	A 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR): enzima chave na via do mevalonato para produção de terpenos	15
2.5.3	Via do chiquimato: Biossíntese da fenilalanina	22
2.5.4	Via dos fenilpropanóides: papel da fenilalanina amônia liase (PAL) e da Eugenol sintase (EGS) na biossíntese do eugenol	23
2.6	Fungos patogênicos e atividade antifúngica de óleo essencial	26
2.6.1	Fungos fitopatogênicos: <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	26
2.6.2	<i>Geothricum</i> spp	30
2.6.3	Leveduras prejudiciais à saúde humana: <i>Candida albicans</i> , <i>C.guilliermondii</i> , <i>C.parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C.krusei</i>	30
2.6.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.7	Sítios de produção de óleo essencial: tricomas glandulares ou secretores	33
3	Material e Métodos.....	36
3.1	Efeito de doses de Nitrato (50 e 300 Kg N.ha ⁻¹) na Produção de Biomassa, No Rendimento e perfil de Óleo Essencial e no Metabolismo de Nitrogênio em Manjeriçãõ, variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i>	36
3.1.1	Condução do experimento em casa de vegetação utilizando vasos com terra ...	36
3.1.2	Material vegetal e condução do experimento	36
3.1.3	Coleta das plantas para análises.....	39
3.1.4	Atividade da Nitrato Redutase.....	39

3.1.5	Determinações analíticas no extrato alcoólico-Extração com etanol 80% e partição com clorofórmio do material fresco	39
3.1.6	Digestão e análises em material seco	40
3.1.7	Extração do óleo essencial por arraste a vapor	40
3.1.8	Análise cromatográfica do óleo essencial para a identificação de compostos ...	41
3.1.9	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ¹ H).....	41
3.2	Avaliação da atividade alelopática do óleo essencial de manjeriço variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> em sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	42
3.3	Avaliação do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> sobre fungos fitopatogênicos.....	42
3.4	Efeito de diferentes fontes e doses de nitrogênio (50 ou 100 Kg ha ⁻¹ NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ ou NH ₄ NO ₃ ⁻) na Biomassa, no rendimento e no perfil do óleo essencial, no metabolismo de N, na expressão gênica e na anatomia foliar da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e Maria Bonita	43
3.4.1	Material vegetal e condução do experimento	43
3.4.2	Coleta das plantas para análises.....	45
3.4.3	Determinações analíticas no extrato alcoólico	45
3.4.4	Digestão e análises em material seco	45
3.4.5	Extração do óleo essencial e análise do perfil químico	45
3.5	Determinação da atividade antifúngica do óleo essencial de manjeriço cultivar Maria Bonita e análise ultraestrutural	46
3.5.1	Avaliação da atividade antifúngica em <i>Candida</i> spp e <i>Geothricum</i> spp.....	46
3.5.2	Avaliação da atividade antifúngica em <i>Sacharomyces cerevisae</i>	46
3.5.3	Avaliação da atividade antifúngica em <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	47
3.6	Análise ultraestrutural dos fungos <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sacharomyces cerevisae</i> , <i>Candida</i> spp e <i>Geothricum</i> spp.....	48
3.6.1	Expressão dos genes que codificam enzimas das vias dos terpenos e fenilpropanóides na variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e na cultivar Maria Bonita por PCR em tempo real.....	49
3.6.2	Extração do RNA total	49
3.6.3	Síntese de cDNA fita simples (ss cDNA).....	49
3.6.4	Construção dos iniciadores	49
3.6.5	Reação de PCR em tempo real	51
3.6.6	Anatomia das folhas de Manjeriço da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e cv Maria Bonita cultivadas em diferentes fontes e doses de Nitrogênio	51
4	Resultados e Discussão.....	52

4.1	Efeito de doses de Nitrato (50 e 300 Kg N.ha ⁻¹) no Metabolismo de Nitrogênio, na Produção de Biomassa, no Rendimento e perfil de Óleo Essencial de Manjeriço, variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i>	52
4.1.1	Atividade da nitrato redutase, frações nitrogenadas e açúcares solúveis	52
4.1.2	Biomassa, rendimento e perfil do óleo essencial de manjeriço, variedade <i>Sweet Italian large Leaf</i> em função do fornecimento de 50 e 300 Kg.ha ⁻¹ de nitrato	54
4.1.3	Biomassa.....	54
4.1.4	Rendimento.....	55
4.1.5	Perfil do óleo essencial de manjeriço	55
4.2	Avaliação da Atividade Alelopática do Óleo Essencial de manjeriço variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> em Sementes de Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	61
4.3	Efeito do óleo essencial da variedade <i>Sweet Italian Larde Leaf</i> sobre fungos fitopatogênicos (<i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Rhizoctonia Solani</i>).....	63
4.4	Efeito de diferentes fontes e doses de nitrogênio (50 ou 100 Kg ha ⁻¹ NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ ou NH ₄ NO ₃ ⁻) no metabolismo de N, na Biomassa, no rendimento e no perfil do óleo essencial, na expressão gênica e na anatomia foliar da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e Maria Bonita	65
4.4.1	Metabolismo das frações nitrogenadas e de açúcares solúveis e no N-total das plantas da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e cultivar Maria Bonita.....	65
4.4.2	Biomassa total de plantas, massa fresca e seca de raiz, caule e folha de manjeriço cultivadas com 50 ou 100 Kg ha ⁻¹ NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ ou NH ₄ NO ₃ ⁻	72
4.4.3	Efeito de diferentes fontes e níveis de N (50 ou 100 Kg.ha ⁻¹ NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ ou NH ₄ NO ₃ ⁻) no rendimento e no perfil do óleo essencial variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e Maria Bonita	73
4.5	Atividade antifúngica do óleo essencial de manjeriço, cultivar Maria Bonita sobre fungos patogênicos e análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura	77
4.5.1	<i>Candida</i> e <i>Geotrthicum</i> spp	77
4.5.2	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	86
4.5.3	Efeito do óleo essencial da cultivar Maria Bonita sobre fitopatógenos: <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	88
4.5.4	<i>Fusarium oxysporum</i>	88
4.5.5	<i>Rhizoctonia solani</i>	92
4.5.6	Efeito de diferentes fontes e níveis de N na expressão dos genes que codificam as vias dos terpenos e fenilpropanóides na variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e cultivar Maria Bonita.....	95
4.5.7	Anatomia das folhas de Manjeriço da variedade <i>Sweet Italian Large Leaf</i> e da cv Maria Bonita cultivadas em diferentes fontes e doses de Nitrogênio.....	99
5	Conclusões.....	102
6	Referências bibliográficas	103
7	ANEXOS.....	120

Anexo A – Cromatogramas de padrões e das amostras de óleo essencial analisadas no CG-MS.....	120
Anexo B – Análise cromatográfica por CG-FID de padrões e das amostras de óleo essencial analisadas	218
Anexo C – Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura	238

1 INTRODUÇÃO

O manjeriço (*Ocimum basilicum L*) é uma planta medicinal da família *Lamiaceae* que tem propriedades antimicrobianas (ADEOLA *et al.*, 2012; BHARATHI *et al.*, 2012), antioxidantes (HUSSAIN *et al.*, 2008), biopesticidas (MUKHERJEE; DATTA, 2007) e antifúngicas em algumas cepas de importância médica como *Candida sp* (KAYA *et al.*, 2008) e em fitopatógenos de importância agrícola do gênero *Fusarium* (KOCIC-TANACKOV *et al.*, 2011). Também podem atuar como aleloquímicos influenciando o desenvolvimento de outras plantas sendo um potencial bioherbicida para ser explorado pela indústria agrícola e minimizar o uso de herbicidas sintéticos no campo (ABOUZIENA *et al.*, 2009; DHIMA *et al.*, 2009; PETROSKI; STANLEY, 2009).

Visando aumentar o rendimento do cultivo de plantas medicinais como o manjeriço, a nutrição mineral de plantas se torna uma ferramenta importante para fornecer os macro e os micronutrientes (MAATHUIS, 2009) para a produção de plantas com alta produtividade. O nitrogênio (N) é um macronutriente essencial para a biossíntese de metabólitos primários (aminoácidos, proteínas, entre outros) e secundários (AMTMANN; ARMENGAUD, 2009). As formas de absorção de N pelas plantas ocorrem principalmente sob as formas de nitrato (NO_3^-) e de amônio (NH_4^+) no solo.

A via de assimilação do NO_3^- se inicia com sua absorção pelas raízes, sendo então, utilizado como substrato para a ação da enzima nitrato redutase que catalisa a sua redução a nitrito (NO_2^-), que em seguida é reduzido amônio (NH_4^+) pela nitrito redutase. O NH_4^+ é assimilado via sistema enzimático glutamina sintetase-glutamato sintase (GS/GOGAT) para formar aminoácidos glutamina/glutamato, ambos os substratos importantes para reações de transaminação formando outros aminoácidos e proteínas (SOUZA; FERNANDES, 2006; TISCHNER, 2000).

A manipulação do fornecimento de N leva a incrementos na produção de metabólitos secundários presentes no óleo essencial de plantas em resposta ao estresse nutricional (DIXON; PAIVA, 1995; STEFANELLI *et al.*, 2010). Aumentos no rendimento de óleo essencial foram obtidos conforme o aumento de N de 100 para 300 Kg.N.ha^{-1} (SIFOLA; BARBIERI, 2006). Além disso, a porcentagem de componentes presentes no óleo essencial como o linalol, α pineno, Π cimeno e timol e de compostos fenólicos em óleo essencial de orégano foram elevados com níveis moderados de N (80 Kg.N.ha^{-1}), mostrando a importância das condições nutricionais no metabolismo das plantas em relação ao rendimento e ao perfil do óleo (KARAMANOS; SOTIROPOULOU, 2013).

O óleo essencial de manjeriço é constituído principalmente pelo linalol que produz um aroma floral e tem grande valor industrial para produção de fragrâncias (KAMATOU; G., P.P.; VILJOEN, A., 2008) e pelo eugenol que produz o aroma do cravo (KLIMÁNKOVA *et al.*, 2008; MEYERS, 2003; VERMA *et al.*, 2013), também foi relatado 1,8-cineol (eucaliptol), α e β -pineno, geraniol, metil chavicol (CHARLES; SIMON, 1990; TELCI *et al.*, 2006) e α -bergamoteno (CAROVIĆ-STANKO *et al.*, 2010), proporcionando assim os diferentes quimiotipos encontrados.

Os sítios de produção de óleo essencial, denominados tricomas glandulares peltados, ou tricomas secretores, se encontram na superfície das folhas (DESCHAMPS *et al.*, 2006; GERSHENZON *et al.*, 2000; LANGE; TURNER, 2013). Ou podem estar distribuídos nas estruturas do mesófilo como as células e ductos de óleo em algumas espécies (SVOBODA *et al.*, 1999).

As vias metabólicas de biossíntese de óleo essencial em manjeriço ocorrem no citosol e nos plastídeos para produção de terpenos como o linalol (XIE *et al.*, 2008). A via citosólica usa acetil CoA como precursor (MIZIORKO, 2011), onde a formação do ácido mevalônico é catalisada pela enzima 3- hidroxil 3-metil glutaril CoA redutase (HMGR) que tem um papel chave na biossíntese de isoprenos Isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero Dimetilalil pirofosfato. (DMAPP). A via plastidial se inicia a partir da condensação do D-gliceraldeído 3-fosfato com o piruvato formando 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) que é o primeiro produto dessa via através da enzima Deoxi xilulose sintase (DXS), que é a enzima chave na via para biossíntese de terpenos (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN *et al.*, 2004).

A via dos fenilpropanóides dá origem ao eugenol e se inicia a partir da via do chiquimato, onde é sintetizada a fenilalanina que sofre desaminação pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), gerando o ácido cinâmico que origina todos os fenilpropanóides. A PAL é responsável pela regulação da produção de fenilpropanóide em plantas, portanto, é um ponto chave que liga o metabolismo primário e secundário (GANG *et al.*, 2001; IJIMA *et al.*, 2004).

A expressão e a atividade das enzimas dos diferentes quimiotipos de manjeriço levam a uma composição do óleo essencial diversificada. Portanto, o estudo dos pontos estratégicos na via citosólica de formação dos terpenos como a HMGR e linalol sintase; na via plastidial a enzima DXS e na via dos fenilpropanóides as enzimas PAL e eugenol sintase podem levar a compreensão da produção desses metabólitos secundários em manjeriço quando submetidos a diferentes fontes e níveis de nitrogênio.

A hipótese desse trabalho é que variações nos níveis e nas fontes de nitrogênio exercem influência sobre o metabolismo primário e secundário do manjeriço modificando a expressão dos genes que codificam as enzimas relacionadas à biossíntese de óleo essencial e a quantidade de tricomas secretores com consequências no rendimento e na qualidade do óleo.

Portanto, esta tese teve como objetivos avaliar os efeitos de diferentes doses e fontes de N sobre o metabolismo e expressão gênica relacionada a produção de óleo essencial das variedades de manjeriço *Sweet italian Large Leaf* e *Maria Bonita*; determinar o rendimento e o perfil do óleo essencial de manjeriço em diferentes condições de cultivo, bem como a produção de óleo nos tricomas secretores presentes nas folhas, e a atividade antifúngica e alelopática do óleo essencial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Manjericão (*Ocimum basilicum*): Características morfológicas e propriedades medicinais

A família Lamiaceae apresenta cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.500 espécies. Existem em torno de 60 variedades de *Ocimum basilicum* L., e grande dificuldade em classificar essa espécie devido à ocorrência de polinização cruzada (NATION *et al.*, 1992) o que facilita as hibridações, gerando um grande número de subespécies e variedades (BLANK *et al.*, 2004). Várias delas de importância hortícola e ornamental, sendo utilizadas também na culinária como tempero e aromatizante de licores (PEREIRA & MOREIRA, 2011). Na medicina popular as folhas são empregadas para problemas de estômago (SOUZA *et al.*, 2004), sendo uma fonte em potencial para a indústria farmacêutica (ÖZCAN; CHALCHAT, 2002; VIEIRA; SIMON, 2000). Também é utilizada como planta ornamental (KOUTSOS *et al.*, 2009) e em produtos de higiene bucal.

Algumas espécies de *Ocimum* tem maior importância econômica principalmente na região Nordeste do Brasil como *O. gratissimum* (Alfavaca cravo); *O. micranthum*, L.; *O. selloi*, Benth; *O. basilicum*, L. (cultivar basilicão); *O. basilicum* (manjericão branco ou de folha larga); e *O. basilicum*, L. cultivar Maria Bonita (PEREIRA; MOREIRA, 2011).

A variedade *Sweet Italian Large Leaf* é uma hortaliça popularmente conhecida como manjericão, alfavaca, basilicão ou manjericão branco ou manjericão de folha larga (Figura 1). É uma planta aromática medicinal pertencente à família Lamiaceae e pode ser considerada uma cultura anual ou perene. É uma espécie herbácea, rica em óleos essenciais com valores medicinais utilizados como matéria prima para a indústria de fármacos (ÖZCAN; CHALCHAT, 2002).



Figura 1. Fotografia de manjericão (*Ocimum basilicum*), variedade *Sweet Italian Large Leaf*.
Fonte: Experimento em Casa de vegetação UFRRJ, 2011.

A cultivar Maria Bonita (Figura 2) proveniente do acesso PI 197442 do Banco de Germoplasma North Central Regional PI Station, Iowa State University, EUA, é a primeira cultivar de manjeriço melhorada e registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o número 22019. Apresenta forma de copa arredondada, com pétala rósea e sépala roxa, comprimento médio das folhas de 6,5 cm e largura de folha de 2,8 cm, largura média de copa de 45,70 cm, diâmetro médio do caule de 1,32 cm, altura média de 45,50 cm e hábito de crescimento ereto. O ciclo médio para o florescimento dessa cultivar é de 80 dias. A cultivar apresentou um alto rendimento em óleo (4,96%) e alto teor de linalol. Segundo Blank et al. (2007) em torno de uma média de 78,12% do óleo essencial dessa cultivar é linalol.



Figura 2. Plantas de *Ocimum basilicum* cultivar Maria Bonita.
Fonte: Pereira; Moreira (2011).

O óleo essencial da cultivar Maria Bonita e o linalol purificado apresentaram elevada atividade, eliminando os parasitas de *Giardia lamblia* (ALMEIDA et al., 2007). Rosado et al. (2009) observaram que o óleo essencial da cultivar Maria Bonita apresentou efeito alelopático inibindo o crescimento e reduzindo a porcentagem de germinação de sementes de alface, tomate e de melissa.

As espécies de *O. basilicum* podem ser selecionadas pelo aroma que produzem, de acordo com os quimiotipos estabelecidos para a produção de óleo essencial. As variedades normalmente são classificadas em quimiotipos de acordo com a caracterização dos seus produtos majoritários presente no óleo essencial (FATOPE et al., 2008). São mais comuns os quimiotipos linalol; eugenol; linalol/eugenol, metil chavicol, metil chavicol/linalol e metil cinamato (FATOPE et al., 2008; LEWINSOHN et al., 2000; TELCI et al., 2006; VERMA et al., 2013; VIEIRA; SIMON, 2000). A variedade *Sweet Italian Large Leaf* foi caracterizada por Mazutti (2006) como quimiotipo linalol/estragol obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões e a cultivar Maria Bonita destaca-se como quimiotipo linalol (BLANK et al., 2007).

O quimiotipo estabelece qual o composto (ou mais de um) que estarão em maior abundância no óleo essencial de uma determinada espécie de planta, contudo o rendimento ou a produtividade de óleo essencial da planta é outra característica que deve ser considerada, pois o rendimento pode variar de forma a se obter altos ou baixos rendimentos de acordo com algumas condições experimentais que serão citadas abaixo.

Dessa forma, se obtém diferentes níveis de produtividade de óleo essencial conforme a época de coleta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), a variedade utilizada (MAROTTI *et al.*, 1996), as partes da planta (CHALCHAT; OZCAN, 2008), a idade e posição da folha (FISCHER *et al.*, 2011), a localização geográfica (ZHELJAZKOV; CANTRELL; *et al.*, 2008) e a nutrição mineral (SHARAFZADEH; ALIZADEH, 2011) para estabelecer os níveis de produção dos metabólitos presentes no óleo essencial.

2.2 Óleos essenciais de plantas

2.2.1 Composição e propriedades farmacológicas

Os óleos essenciais são compostos encontrados em várias plantas e conferem odor característico e sabor natural das plantas. São insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Diferentes métodos são empregados para a extração do óleo essencial de plantas, como o arraste por vapor de água (CASSEL *et al.*, 2009), hidrodestilação (VIEIRA; SIMON, 2000) ou extração com CO₂ a alta pressão de vapor (MAZUTTI *et al.*, 2006).

Recebem essa denominação devido as suas propriedades físico-químicas por serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Tem como principal característica a volatilidade, o que as difere dos óleos fixos (SIMÕES & SPITZER, 1999). Representam uma pequena fração da composição da planta, são compostos por substâncias lipofílicas, de características voláteis como monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres, e ésteres). A quantidade de cada substância presente no óleo essencial varia de acordo com a espécie (FORNARI *et al.*, 2012).

Na composição química do óleo essencial de *O. basilicum* destacam-se o linalol, eugenol e metil cinamato (KLIMÁNKOVA *et al.*, 2008) pois são os principais monoterpenos e fenilpropanóides respectivamente, encontrados nesta espécie, mas também são encontrados 1,8 cineol, α e β pineno, geraniol, metil chavicol (CHARLES & SIMON, 1990), ácido cinâmico, metil éster, cicloexano, α -cadinol dimetildietil ester, β -cubebeno, cadineno (ZHANG *et al.*, 2009).

Os terpenos são todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno originados através da via do mevalato e pela via não mevalonato (BISWAS *et al.*, 2008). Os compostos mais freqüentes encontrados nos óleos voláteis são os monoterpenos (constituem cerca de 90% dos óleos) e os sesquiterpenos (TRIPATHI *et al.*, 2009), ambos caracterizados por baixo peso molecular (DEWICK, 2002).

Devido a grande diversidade de óleos essenciais produzidos por plantas medicinais, as pesquisas realizadas nas áreas de farmacognosia, química e farmacologia para uso terapêutico dessas desses óleos renovam as expectativas de encontrar novas moléculas acessíveis, seguras e eficazes a partir da medicina popular (PATWARDHAN, 2005).

Os óleos voláteis produzidos por plantas medicinais apresentam propriedades antifúngicas frente à *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodia theobroma*, *Rhizopus solani* e *Candida* spp (BILAL *et al.*, 2012; CARRASCO *et al.*, 2012; HUSSAIN *et al.*, 2008; KOCIĆ-TANACKOV *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2009), antibacteriana testada contra as espécies de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida* (BURT, 2004; HUSSAIN *et al.*, 2008; LACHOWICZ *et al.*, 1998; SINGH; MAURYA, 2005).

Na indústria de alimentos a utilização de óleos essenciais pode apresentar uma opção em substituição aos agentes antioxidantes sintéticos e antifúngicos. Trabalhos realizados com *O. basilicum* demonstraram efeitos antioxidantes e fungistáticos em salames do tipo italiano, sem detectar diferenças sensoriais em relação ao sabor do alimento (SAGGIORATO, 2008)

Os óleos essenciais são considerados como uma alternativa viável para o controle de muitos insetos nocivos, e podem ser utilizados como pesticidas biológicos, contra pragas de insetos das ordens lepidoptera, coleópteros, dípteros, hemípteros e se constituem, portanto, em uma importante ferramenta para o setor agrícola, além de serem exploradas suas atividades como repelente, fumigante e larvicida. E ainda apresentam uma grande vantagem para o meio ambiente devido a sua rápida degradação no solo (LIMA *et al.*, 2009; TRIPATHI *et al.*, 2009). E também apresentam potencial como bioherbicida (HUTER, 2011), todas essas propriedades podem ser exploradas pela indústria química, farmacêutica e alimentícia (BAKKALI *et al.*, 2008).

2.2.2 Produção mundial de óleo essencial

Os óleos essenciais são uma fonte valiosa de matéria-prima para a indústria e, portanto apresentam grande valor econômico. Em relação à produção de óleo, Bizzo *et al.* (2009) fizeram um levantamento com os principais óleos essenciais comercializados no mundo (Tabela 1).

Tabela 1. Principais óleos essenciais comercializados no mundo.

Óleo essencial	Espécie
Laranja (Brasil)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Menta japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus</i> spp.
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Hortelã-pimenta	<i>Mentha x piperita</i> L.
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burm.
Eucalipto (tipo citronela)	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Lima destilada (Brasil)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle
Spearmint (nativa)	<i>Mentha spicata</i> L.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Endl.) Franco
Lavandim	<i>Lavandula intermedia</i> Emeric ex Loisel
Sassafrás (China)	<i>Cinnamomum micranthum</i> (Hayata) Hayata
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfady
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.

Fonte: Bizzo *et al.* (2009)

O Brasil está em uma posição de destaque na produção de óleos essenciais de cítricos (subprodutos da indústria de sucos) ao lado da Índia, China e Indonésia que são considerados

os quatro grandes produtores mundiais. No passado, o país teve destaque como exportador de óleo essencial de pau-rosa (*Aniba roseadora D.*), grande fornecedora de linalol (BIZZO *et al.*, 2009) para ser utilizado pela indústria de perfumaria (ALCANTARA *et al.*, 2010). Isso levou a exploração massiva dessa espécie ocasionando quase sua extinção. Uma alternativa para minimizar esse problema, seria estabelecer o cultivo de plantas medicinais produtoras de linalol visando sua padronização para evitar a extinção de espécies como o pau rosa.

2.3 A importância dos nutrientes no metabolismo de plantas

As plantas necessitam de todos os nutrientes para completar seu ciclo, aqueles que são exigidos em maiores quantidades são denominados macronutrientes que são nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) e os exigidos em menores quantidades são os micronutrientes cobre, zinco, ferro, manganês, molibdênio, boro e sódio (MAATHUIS, 2009).

O N é o macronutriente mais importante para a planta, tem como função principal fornecer grupos de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, é essencial na bioquímica de vários compostos não proteicos como as coenzimas e metabólitos secundários. O P participa das reações de ATP, é componente de ácidos nucleicos, coenzimas, possui um papel estrutural compondo os fosfolipídeos de membrana. O K é cofator de mais de 40 enzimas. O SO_4^{2-} é reduzido até S^{2-} e incorporado no aminoácido cisteína para formar o tripeptídeo glutatona (Glu-Cys-Gly). O Ca^{2+} possui um papel estrutural na parede celular e atua como segundo mensageiro nas vias de sinalização e o Mg^{2+} é constituinte da molécula de clorofila e cofator enzimático de muitas reações (TAIZ; ZEIGER, 2006).

2.3.1 O efeito da nutrição mineral no metabolismo primário e secundário

A Figura 3 ilustra o efeito do fornecimento de nitrogênio no metabolismo de carbono.

O esquema mostra as principais enzimas, incluindo nitrato redutase (NR), nitrito redutase (NiR), glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT) no metabolismo de nitrogênio, isocitrato desidrogenase NADP-dependente (NADP-ICDH), citrato sintase (CS), piruvato. cinase (PK), PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase), SPS (sacarose fosfato sintase) no metabolismo de carbono, e seus metabólitos principais, incluindo a glutamina (Gln), glutamato (Glu), a cetoglutarato, isocitrato (IC), piruvato (pir), PEP, 3-fosfo glicerato (3PGA), glicose 1-fosfato (Gli 1P), e ribulose-1,5-bifosfato (RuBP). As reações enzimáticas são mostradas como traços finos e processos de transporte são mostrados como traços mais largos.

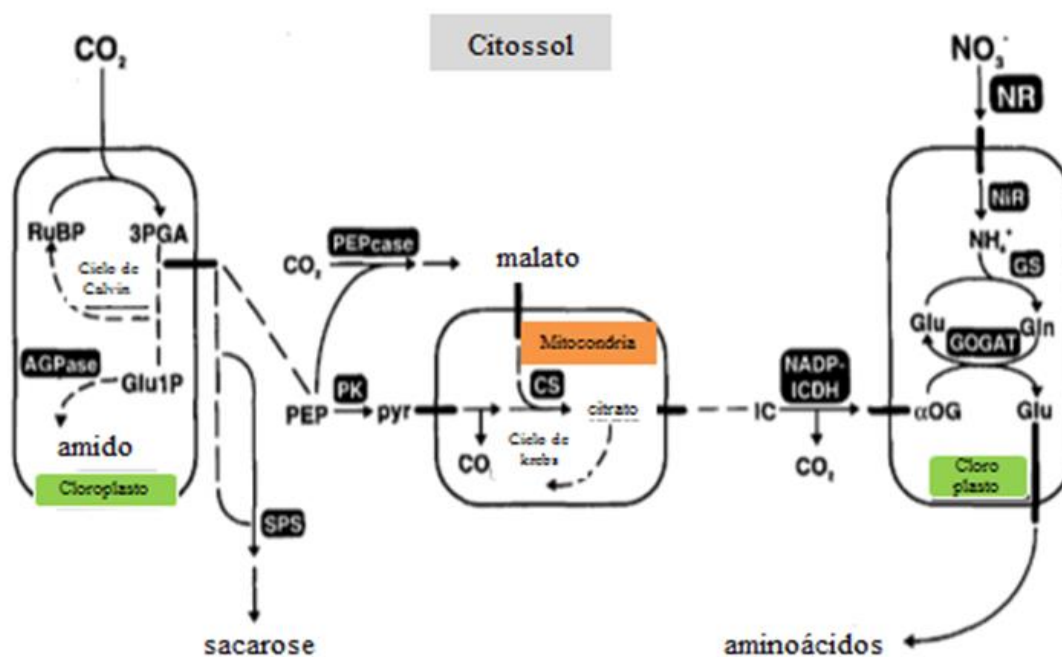


Figura 3. Vias do metabolismo de nitrogênio e de carbono em plantas.
 Fonte: Adaptado de Scheible *et al.* (1997)

O fornecimento de nutrientes às plantas tem efeito no metabolismo primário promovendo incrementos na biomassa e acúmulo de nutrientes nos tecidos vegetais (raiz, caule e folha). O fornecimento de nitrato aumenta a atividade da enzima nitrato redutase (CHEN *et al.*, 2004), da NiR e GS/GOGAT e aumenta os níveis de aminoácidos (BUYSSSE *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2003), e conseqüentemente promove alterações no metabolismo de carbono, estimulando a síntese de ácidos orgânicos para fornecer esqueletos de carbono para incorporação de N na biossíntese de aminoácidos (SCHEIBLE *et al.*, 2000). Esses efeitos se refletem no metabolismo secundário na produção de óleo essencial (AZIZI *et al.*, 2009).

As plantas retiram esses minerais da solução do solo através da absorção das formas iônicas pelas raízes, onde alguns elementos podem ser absorvidos na forma de cátions como Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺, e outros são absorvidos na forma aniônica como PO₄³⁻, SO₄²⁻. O nitrogênio pode ser absorvido na membrana plasmática das raízes em ambas as formas inorgânicas, como NO₃⁻ (simporte) ou NH₄⁺ por uniporte (Figura 4).

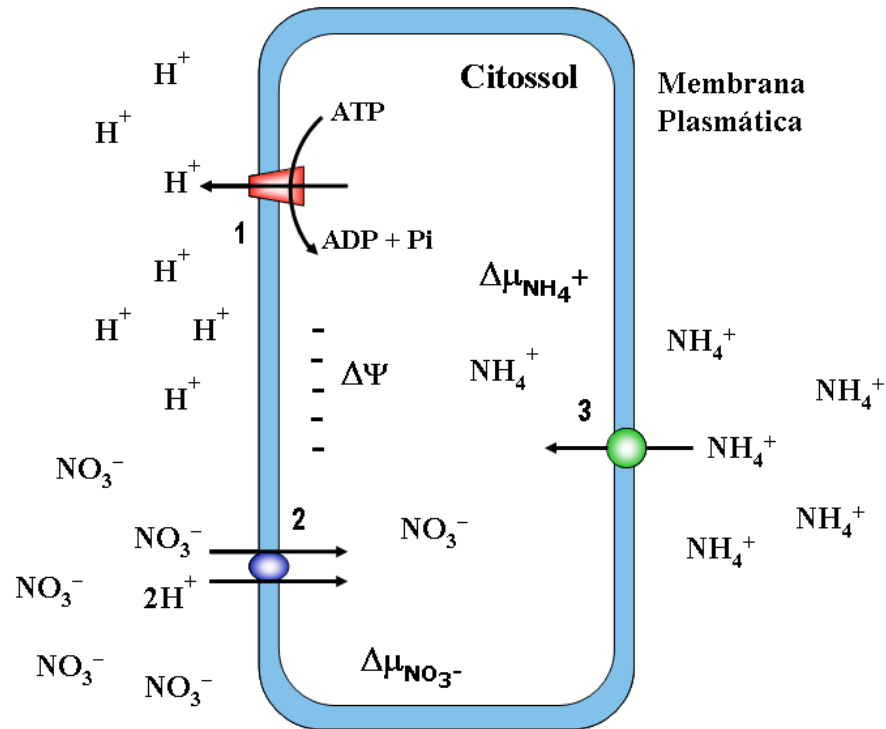


Figura 4. Absorção de nitrato (NO_3^-) e de amônio (NH_4^+) através da membrana plasmática de plantas. Fonte: Souza; Fernandes (2006)

A redução de NO_3^- é a principal via que converte as formas inorgânicas de nitrogênio em orgânicas, estima-se que 25% da energia da fotossíntese seja consumida na redução e assimilação de NO_3^- (SOLOMONSON; BARBER, 1990). Pois, as vias de redução e assimilação necessitam de ATP, de NADH (NADPH), ferredoxina e de intermediários do ciclo de Krebs (α -cetoglutarato) para as reações, o que significa que a assimilação requer energia, doadores de elétrons e esqueletos de carbono, de maneira que ocorre uma competição entre o metabolismo de N e o de Carbono (SOUZA; FERNANDES, 2006).

O nitrato (NO_3^-) ao ser absorvido entra no citoplasma e é reduzido pela enzima nitrato redutase (Figura 5) a NO_2^- e nos plastídeos a enzima nitrito redutase reduz o NO_2^- a NH_4^+ . Se o NO_3^- não for reduzido, ele pode ser acumulado no vacúolo ou ser exportado para outras partes da planta (CARDENAS-NAVARRO *et al.*, 1999). O NH_4^+ absorvido ou oriundo da redução do NO_3^- é imediatamente incorporado em esqueletos de carbono por meio das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase GS-GOGAT (SOUZA; FERNANDES, 2006).

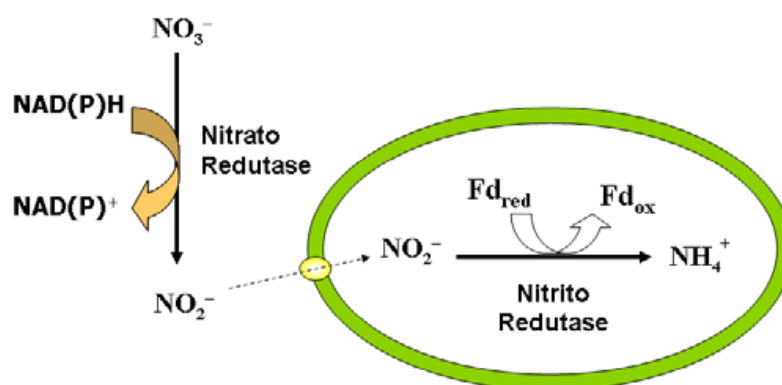


Figura 5. Redução do NO_3^- a NO_2^- no citossol pela enzima Nitrato redutase (NR) e do NO_2^- a NH_4^+ pela enzima Nitrito redutase (NiR) no plastídeo.
 Fonte: Souza; Fernandes (2006)

A Nitrato redutase (NR) é a primeira enzima na via de redução do NO_3^- em plantas e representa a etapa limitante da assimilação de NO_3^- . A sua atividade é induzida pela presença de NO_3^- no solo e pela concentração de açúcar exógeno, já sua inibição se dá na presença dos aminoácidos asparagina e glutamina (SIVASANKAR *et al.*, 1997).

Por ser uma enzima que é induzida na presença do substrato (NO_3^-), a NR tem grande influência no acúmulo de NO_3^- nos tecidos (CARDENAS-NAVARRO *et al.*, 1999; SOLOMONSON; BARBER, 1990). Chen *et al.*, (2004) também observou que a atividade da nitrato redutase (ARN) e o acúmulo de nitrato nos tecidos é dependente do nitrato exógeno, de forma a se obter efeito positivo na ANR quando se utiliza doses menores de NO_3^- , e quando se eleva a dose atinge-se um platô ou até mesmo uma diminuição na ANR.

Para confirmar os efeitos da absorção de íons NO_3^- no crescimento das plantas e no acúmulo deles nos tecidos, estudos foram realizados indicando que as plantas respondem bem a uma fertilização moderada (SHARAFZADEH; ALIZADEH, 2011), sendo a resposta ao crescimento dependente do fornecimento de nitrato. Em altos níveis as plantas exibiram sintomas de toxidez que se refletiu na diminuição do crescimento, com concentração de nitrato nos tecidos maior de acordo com o aumento da dose. Portanto, na dose mais alta houve um lento aumento no conteúdo de nitrato na planta (CHEN *et al.*, 2004), o que sugere que o excesso de NO_3^- no solo foi desnecessário e promoveu na verdade o aumento de resíduos de NO_3^- no solo que pode sofrer processo de lixiviação e aumentar os níveis de contaminação desse ambiente.

O fornecimento de nutrientes é uma ferramenta utilizada na agricultura para o aumento da produtividade em biomassa, e esses nutrientes afetam também as concentrações dos metabólitos secundários (STEFANELLI *et al.*, 2010). A disponibilidade de nutrientes oferecido as plantas, se reflete no rendimento e no perfil de óleo essencial das plantas aromáticas, a medida que aumenta a biomassa da planta (SANGWAN *et al.*, 2001). Níveis mais elevados de nitrogênio promoveram aumento na produção de matéria seca de orégano e uma diminuição no teor de óleo essencial, já a composição do óleo essencial dessas plantas foi independente das condições de cultivo (AZIZI *et al.*, 2009). Contudo, deve-se considerar que os efeitos dos nutrientes no perfil de óleo essencial podem ser variáveis de acordo com a variedade utilizada (SIFOLA; BARBIERI, 2006).

Em manjeriço testando três níveis de N (50, 100 e 150 kg. ha⁻¹), duas doses de P (50 e 100 kg. ha⁻¹) e de K (50 e 100 kg. ha⁻¹), verificou-se que com níveis moderados de NPK (150: 50:100) pode-se obter bom rendimento de de óleo essencial e de biomassa fresca e seca (SHARAFZADEH; ALIZADEH, 2011). Ao avaliar os níveis dos metabólitos da via do

mevalonato como o linalol em variedades de manjeriço, observou-se um aumento conforme o aumento da disponibilidade de N (ZHELJAZKOV; CANTRELL; *et al.*, 2008).

2.4 Metabolismo primário e secundário

O metabolismo é um conjunto de reações que ocorrem na célula que é direcionado pelas enzimas, coenzimas e cofatores que são responsáveis pela produção de substâncias nas vias metabólicas, sendo os compostos químicos formados, degradados ou transformados denominados metabólitos SIMÕES *et al.* (1999).

As reações do metabolismo primário são aquelas que as plantas realizam para síntese, degradação e interconversão dos compostos orgânicos para sua sobrevivência, crescimento e reprodução e precisam de energia oriunda do ATP e poder redutor proveniente do NADPH para que ocorra síntese de compostos fundamentais como os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos (DEWICK, 2002).

Diferente do metabolismo primário, o metabolismo secundário ocorre em alguns tecidos ou células especiais, está relacionado à adaptação por meio da interação dessas plantas com o ambiente biótico e abiótico, servindo como atrativo para polinizadores ou para dispersão de sementes para sua sobrevivência e perpetuação da espécie. Esses metabólitos possuem várias funções entre elas estão as de defesas naturais da planta, formam resinas, látex, são inseticidas naturais, atuam como antibióticos para proteger a planta de microorganismos patogênicos. São liberados contra ataques de predadores, e também são substâncias aleloquímicas emitidas contra outras plantas competidoras ao seu redor (KROYMANN, 2011; MITHOFER; BOLAND, 2012; PICHERSKY; GERSHENZON, 2002).

No metabolismo primário, o acetil-CoA é um metabólito chave, sendo um intermediário para várias vias metabólicas. É produzido nos plastídeos, na mitocôndria e no citoplasma, ocupando uma posição central no metabolismo, o seu fluxo controla a taxa de reservas de carbono em plantas que pode ser convertida em muitos produtos químicos importantes. Pode entrar no ciclo de Krebs e originar os aminoácidos como aspartato, isoleucina, lisina metionina e glutamato. O *pool* de acetil-CoA também serve como substrato para síntese de lipídeos e de isoprenos na via do mevalonato (GARCÍA, 2004) e para síntese de outros metabólitos secundários (OLIVER *et al.*, 2009).

Além do acetil-CoA, o *pool* de piruvato e de gliceraldeído 3-fosfato disponíveis a partir da fotossíntese e do metabolismo da via glicolítica são importantes precursores para a síntese de metabólitos secundários como isoprenos na via plastidial (via metil eritrol fosfato).

A partir do metabolismo da glicose, os intermediários na via glicolítica como fosfoenolpiruvato e eritrose- 4 fosfato vão dar origem ao ácido chiquímico e fenilpropanóides, o gliceraldeído 3-fosfato e o piruvato formam desoxi-xilulose 5-fosfato na via metil eritrol fosfato precursores dos terpenos em óleos essenciais, e a descarboxilação do piruvato a acetil-CoA gera o ácido mevalônico.

A Figura 6 ilustra a relação entre os metabólitos primários e secundários, ressaltando os intermediários chaves (metabólitos primários), que vão se condensar para dar origem aos metabólitos secundários.

Além de exercerem inúmeras funções importantes para as plantas os metabólitos secundários são importantes fontes de vitaminas caroteno e tocoferol e também fontes importante de princípios ativos farmacológicos para uso na saúde humana como o taxol com grande importância no tratamento do câncer (AJIKUMAR *et al.*, 2010).

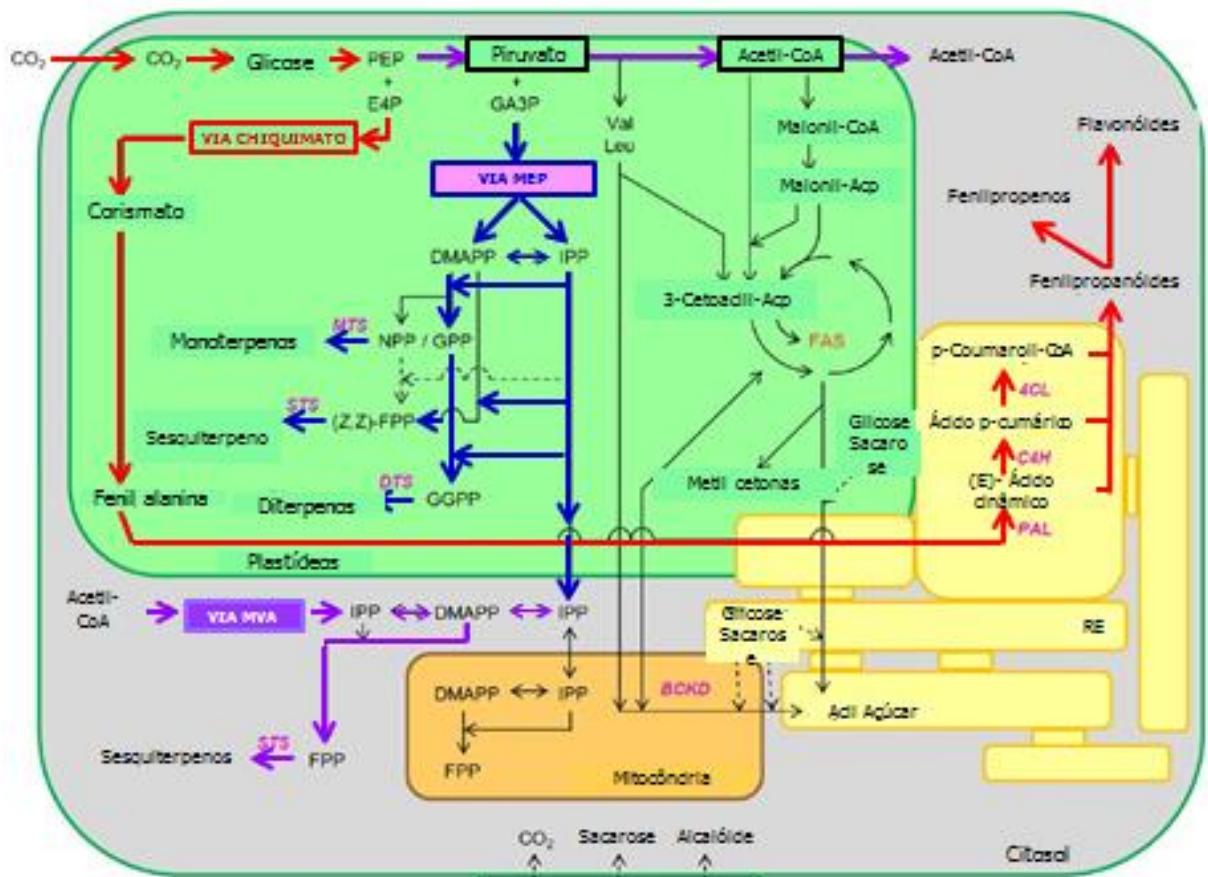


Figura 6. Esquema que ilustra a relação entre metabolismo primário e secundário, destacando (setas) a origem dos metabólitos secundários a partir da glicose e do CO₂ fotossintético.
 Fonte: Adaptado de Glas *et al.* (2012).

Partindo-se dos intermediários da glicólise (fosfoenolpiruvato) e da via das pentoses fosfato (eritrose-4-fosfato) é formado o ácido chiquímico que pode ser metabolizado a ácido corísmico e este origina os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina. A tirosina e o triptofano são precursores de alcalóides e a fenilalanina dá origem aos flavonóides, cumarinas, lignanas e fenilpropanóides (HERRMANN; WEAVER, 1999).

2.5 Biossíntese de metabólitos secundários:

2.5.1 Via do mevalonato (MVA) e via metil eritrol fosfato (MEP) para biossíntese de isoprenos

As unidades isoprênicas são as unidades formadoras dos terpenos, essas moléculas são consideradas os blocos de construção para muitas substâncias naturais, desde os monoterpenos aos esteróides (WITHERS; KEASLING, 2007). Os isoprenos tem grande importância no metabolismo primário das plantas, como os constituintes de membranas celulares, por exemplo, os esteróides de membrana, pigmentos fotossintéticos (carotenóides), transportadores de elétrons (citocromo a, quinonas e clorofilas) a hormônios vegetais como ácido abscísico, citocininas e giberelinas (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN *et al.*, 2004), esquematizados na Figura 7.

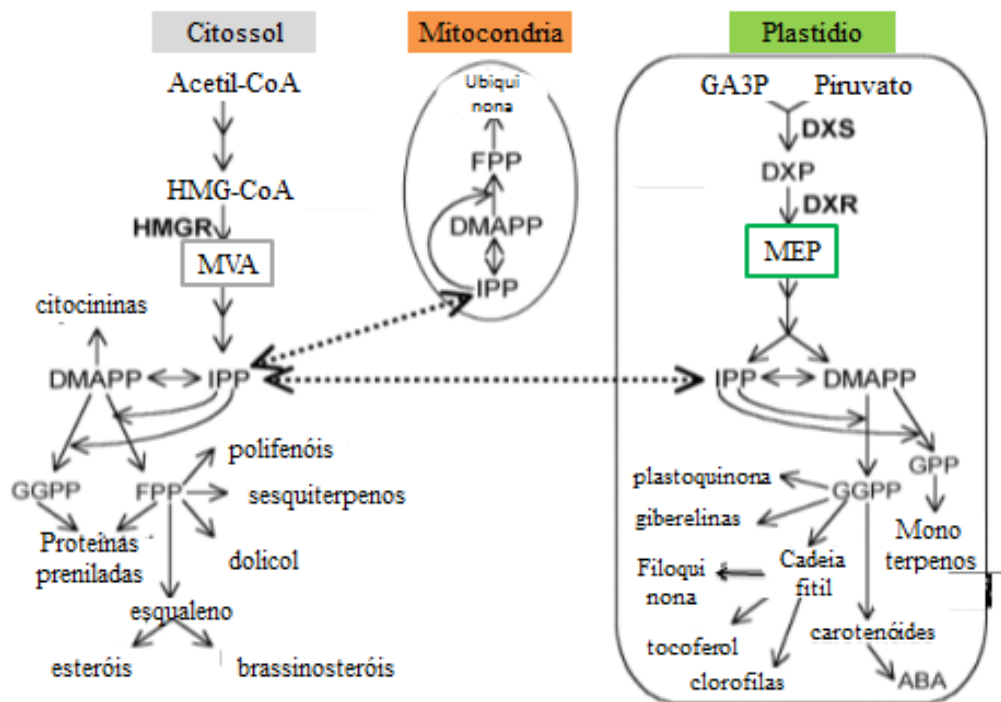


Figura 7. Esquema das vias citossólica e plastidial para a biossíntese de Isopentenil Pirofosfato (IPP) e Dimetilalil Pirofosfato (DMAPP) e das moléculas formadas a partir destes.
 Fonte: Adaptado de Rodríguez-Concepción *et al.* (2004)

A via clássica do mevalonato foi elucidada a partir de estudos iniciados em animais e leveduras, no qual se descobriu a participação do acetil-CoA e da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) com papel chave nessa via, que gera o ácido mevalônico precursor do Isopentenil pirofosfato (IPP) e de seu isômero Dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (DALE *et al.*, 1995).

Até os anos 1990 apenas a via do mevalonato (MVA) era conhecida por produzir exclusivamente as unidades isoprênicas. Contudo, os estudos de Rohmer (1999) e McCaskill; Croteu (1999a) promoveram avanços na área do metabolismo vegetal, com a descoberta de uma via alternativa e independente da via do mevalonato. Essa via recebeu várias denominações como via plastidial, via não mevalonato, via independente do mevalonato e via metil eritrol fosfato (MEP) ou Deoxi-xilulose fosfato (DXP).

Esse fato revolucionou os conhecimentos sobre a biossíntese dos terpenos em plantas, pois se identificou os intermediários totalmente diferentes daqueles da via mevalonato e as enzimas envolvidas no processo de formação dos mesmos precursores, o IPP e o DMAPP. Essas duas vias metabólicas embora distintas, partindo de precursores diferentes são responsáveis pela formação de IPP e DMAPP e ocorrem simultaneamente em compartimentos diferentes para originar diferentes classes de terpenos.

A via Metil Eritrol Fosfato ou MEP (Figura 8) foi descrita primeiro em bactérias e algas e posteriormente em plantas por Rohmer (1999) McCaskill & Croteu (1999). A via ocorre no plastídio e produz IPP e DMAPP para a biossíntese de terpenos relacionados à fotossíntese como as cadeias laterais das clorofilas, plastoquinonas e fitoquinonas e hormônios como giberelina e ácido absísico. Para demonstrar a função e a importância dos

terpenos produzidos pela MEP, foi realizado estudo em *Arabidopsis* com mutante *cla-1* do gene *CLA1* que codifica para a enzima Deoxi-xilulose fosfato sintase (DXS), e verificaram fenótipo albino, diminuição de clorofila e caroteno nos plastídeos (ESTÉVEZ *et al.*, 2000).

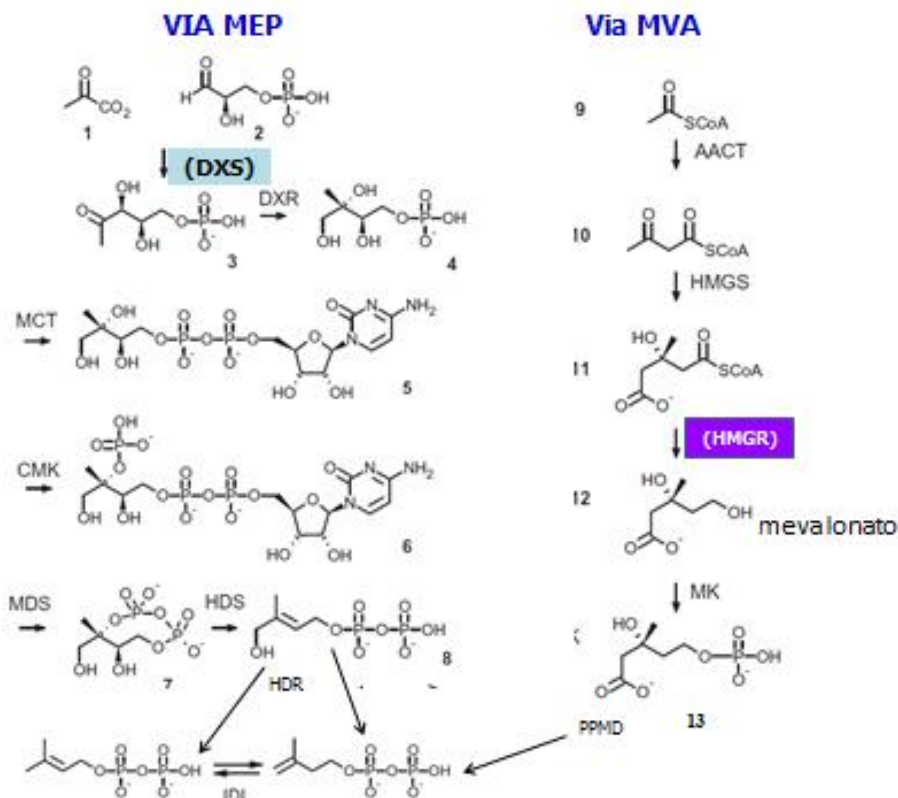


Figura 8. Esquema das vias da biossíntese de Isopentenil pirofosfato (IPP) e Dimetilalil pirofosfato (DMAPP) em plantas.

A via Mevalonato no citosol e a via Metil Eritrol Fosfato no plastídio.

Enzimas via MVA: AACT: Acetoacil CoA Tiolase; HMGS: 3-Hidroxi- 3- metil Glutaril CoA sintase; HMGR: 3-Hidroxi- 3- metil Glutaril CoA sintase; MK: Mevalonato kinase; PPMD Mevalonato 5-difosfato descarboxilase; IDI - Isopentil pirofosfato isomerase.

Fonte: Adaptado de Hemmerlin et al. (2012) e Crowell, et al. (2002)

A reação da via MEP (Figura 8) é iniciada através da condensação das moléculas de D-gliceraldeído 3-fosfato com o carbono 2 do piruvato, pelo qual se obtém a formação de 1 deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) como o primeiro produto da via biossintética, sendo a primeira enzima na etapa de síntese a Deoxi- xilulose sintase (DXS), é considerada uma das principais enzima na via (ESTÉVEZ *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ-NAVA *et al.*, 2004). A etapa subsequente de redução e isomerização é feita pela enzima 1-deoxi-5-foafato reduto isomerase (DXR) que forma o 2-C-metil D-eritrol-4-fosfato (MEP) que deu origem ao nome da via (WITHERS; KEASLING, 2007).

Após a formação do 2-C-metil D-eritrol-4-fosfato, este é convertido a 4-difosfocitidil-2-C-metil D-eritrol (CDP-ME) que é fosforilado no grupo hidroxila na posição 2, gerando o 4-difosfocitidil-2-C-metil D-eritrol 2-fosfato (CDP-MEP), estas etapas são catalisadas pela CDP-ME sintase (2-C-metil D-eritrol 4-fosfato citidiltransferase ou MCT) e (CDP-ME kinase ou CMK). Então, CDP-ME é convertido a 2-C-metil D-eritrol 2,4-ciclodifosfato (ME-PPP) pela ME-cPP sintase (MDS). Este é reduzido a 1-hidroxi- 2-metil 2-(E)- butenil 4-difosfato (HMBPP) pela enzima 1-hidroxi- 2-metil 2-(E)- butenil 4-difosfato sintase (HDS). A última

etapa é catalisada pela enzima 1-hidroxi- 2,4-metil butenil 4-difosfato redutase (HDR), que produz uma proporção de 5-6:1 de IPP e DMAPP que logo em seguida é ajustada para uma proporção de 7:3 pela Isopentenil pirofosfato isomerase (IDI) (HEMMERLIN *et al.*, 2012).

Todos os genes da via MEP são regulados transcricional e pós-transcricionalmente para controle dos níveis de transcritos de RNAm de diferentes proteínas. Estudos sugerem que a regulação pós-transcricional seja um importante fator que controla a via MEP (GUEVARA-GARCIA *et al.*, 2005).

Mesmo as duas vias ocorrendo em compartimentamentos diferentes, os derivados da via MVA podem ser usados para a síntese de isoprenos na via MEP e os produtos oriundos da via MEP podem ser exportados para o citosol em algumas plantas (GUTIÉRREZ-NAVA *et al.*, 2004; HEMMERLIN *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006).

Em plantas a via do mevalonato ocorre principalmente no citoplasma e nas mitocôndrias, e tem como produtos de sua síntese os sesquiterpenes e esteróis predominantemente (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006), sendo o Acetil-CoA o precursor para a síntese de isoprenos. A Figura 8 ilustra todas as etapas de reação e as principais enzimas envolvidas em ambas as vias.

Em leveduras e animais já foi demonstrado que a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) é uma enzima chave e altamente regulada, e tem importância na formação do colesterol (DEY; HARBORNE, 1997).

Em plantas ela também é considerada chave para o metabolismo de isoprenos e estão envolvidas na biossíntese de colesterol (CHAPPELL *et al.*, 1995). Os produtos finais derivados de isoprenos na via MVA em plantas são os esteróides como sitosterol, campesterol, stigmasterol que vão compor a estrutura da membrana (HARKER *et al.*, 2003), o dolicol participa da glicosilação de proteínas e hormônios como citocinina. A cadeia lateral da ubiquinona é formada no citosol a partir de IPP e posteriormente importada para a mitocôndria.

Vários genes codificam para HMGR dependendo da espécie de planta, e a expressão diferencial desses genes pode regular a atividade da HMGR, dessa forma, a presença de múltiplos genes pode sugerir que diferentes isoformas estejam envolvidas na biossíntese de isoprenos nos diferentes compartimentos (STERMER *et al.*, 1994).

2.5.2 A 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR): enzima chave na via do mevalonato para produção de terpenos

A análise das sequências de aminoácidos revelou que a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) em plantas tem grande semelhança com a de outros eucariotos, principalmente em relação a porção C-terminal que contém o domínio catalítico, e apresenta-se altamente conservada. A diferença no domínio da proteína entre animais e plantas, é que o primeiro apresenta oito domínios transmembrana e as plantas apenas dois (FRIESEN; RODWELL, 2004).

A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase está localizada no retículo endoplasmático (RE) de eucariotos (Figura 9). A HMGR em plantas apresenta um resíduo N-terminal divergente com dois domínios transmembrana que são hidrofóbicos e, que estão ancorados à membrana do retículo endoplasmático. E o resíduo conservado C-terminal, que contém o sítio catalítico, está voltado para o citosol, e possui uma pequena região de ligação que conecta as duas porções da proteína, também altamente divergente (DALE *et al.*, 1995; FRIESEN; RODWELL, 2004).

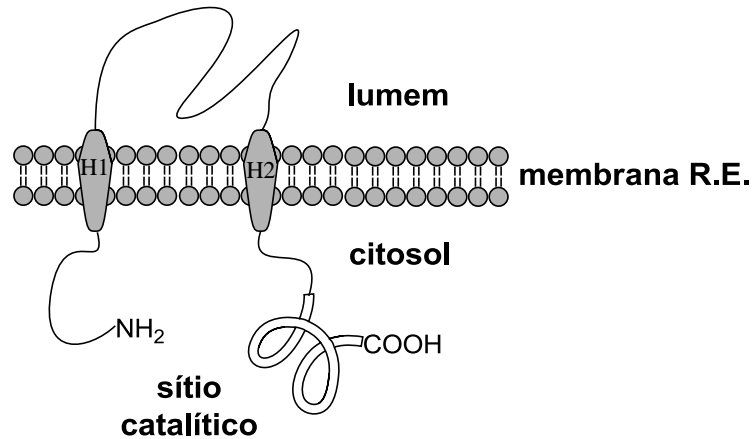


Figura 9. Modelo proposto para a 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) de plantas na membrana do retículo endoplasmático (RE).

H1e H2 representam os domínios transmembrana. Fonte: Adaptado de Leivar *et al.* (2005)

Deenen *et al.* (2012) isolaram as sequências de genes da via MVA do látex de *Taraxacum brevicorniculatum*, incluindo as sequências de cDNA que codificam para HMGR (TbHMGR1-2) e propuseram um modelo tridimensional sendo composta por três domínios (Figura 10). Um domínio α -hélice N-terminal pequeno, um domínio central grande que contém duas moléculas de HMG-CoA ligadas e um NADP(H) ligado e um domínio menor que os outros que é o domínio S que abriga um NADP(H). O sítio de fosforilação no resíduo de serina está marcado com a seta (Figura 10).

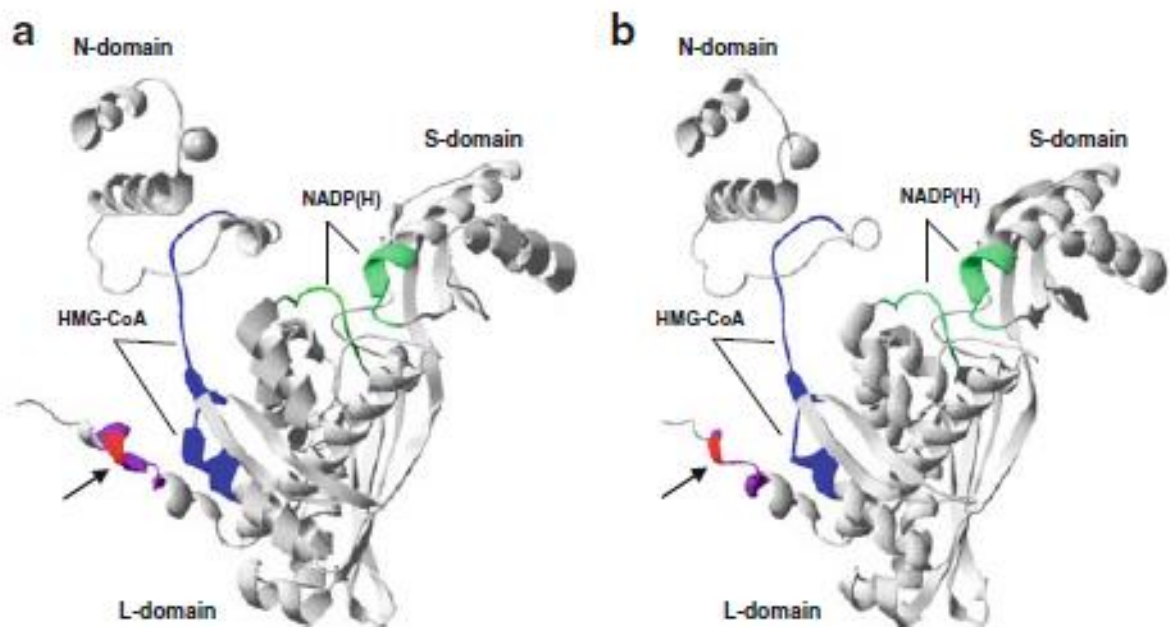


Figura 10. Proposta para estrutura tridimensional da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) em *T. brevicorniculatum*

A: TbHMGR1; B: TbHMGR2, o sítio de fosforilação no resíduo de serina está marcado com a seta

Fonte: adaptado de Deenen *et al.* (2012)

2.5.2.1 A reação da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR)

Após a condensação de três moléculas de acetil CoA origina-se o 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), essa condensação é realizada pela enzima HMG-CoA sintase, após essa etapa ocorre a redução desse substrato a mevalonato, catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR) citosólica e mitocondrial em plantas (DEWICK, 2002).

A reação é de natureza irreversível e são necessárias duas moléculas de NADPH como doador de elétrons para cada mevalonato reduzido (Figura 11), originando uma diversidade de compostos derivados de isoprenos que variam em sua estrutura bem como em suas funções (MIZIORKO, 2011).

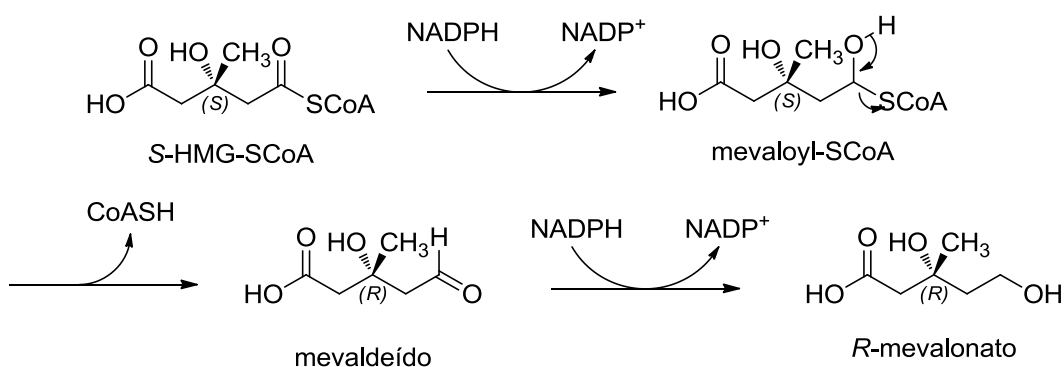
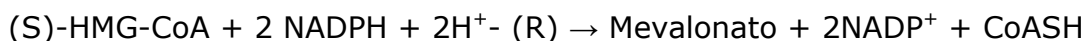


Figura 11. Etapas na reação de redução da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR)
Fonte: Miziorko (2011)

Friesen; Rodwell (2004) sugerem o papel dos aminoácidos aspartato, glutamato, histidina e lisina na catálise da HMGR (Figura 12).

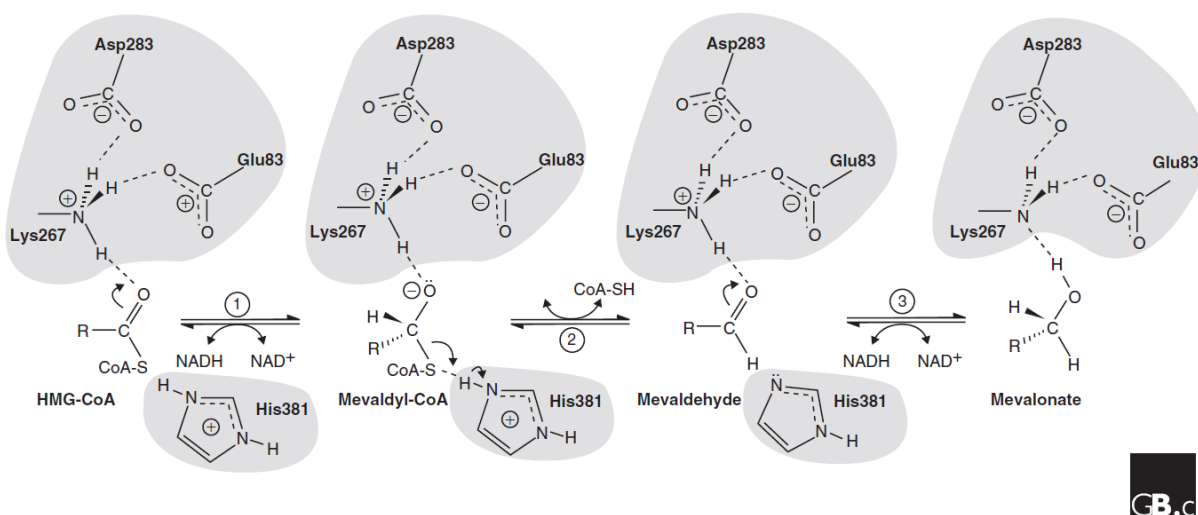


Figura 12. Proposta para o mecanismo de reação da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase em bactéria.

Os resíduos catalíticos essenciais são Lys267, Asp283, Glu83 e His381.

Fonte: Friesen; Rodwell (2004)



A partir da formação do ácido mevalônico (Figura 13) ocorrem duas etapas de fosforilação pela mevalonato Kinase e mevalonato 5-fosfato Kinase e posterior descarboxilação pela mevalonato 5-difosfato descarboxilase, gerando o IPP.

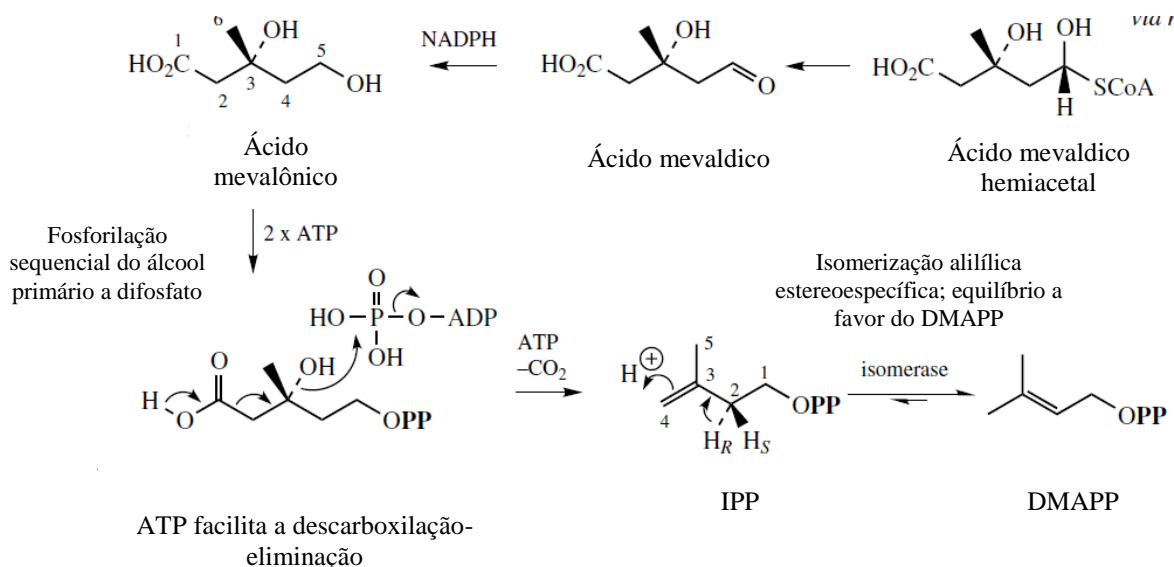


Figura 13. Metabolismo do ácido mevalônico ao isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP).

As enzimas estão descritas em ordem de reação: mevalonato kinase; mevalonato 5-fosfato kinase e mevalonato 5-difosfato descarboxilase.

Fonte: Dewick (2002)

Com a formação de IPP e DMAPP pela isomerase, ocorre a condensação cabeça-cauda dessas unidades, em uma reação catalisada por prenil transferases para produzir geranyl pirofosfato (GPP, C-10) que é o precursor dos monoterpenos através da ação da enzima GPP sintase. GPP se liga a mais uma unidade de IPP para gerar Farnesil difosfato (FPP, C-15) que ligado a mais um IPP, forma geranyl geranyl pirofosfato (GGPP, C-20) que é base para biossíntese de muitos diterpenos. A junção de duas moléculas de GGPP gera o fitoeno (C-40), um intermediário dos carotenos. FPP é o precursor de sesquiterpenos, no qual a reação cabeça-cauda de dois FPP forma o squaleno (C-30), um intermediário dos esteróides e triterpenos (VALDIVIA *et al.* 1997, DEWICK, 2002), gerando assim uma variedade de produtos naturais de derivados terpênicos em muitas plantas (BRAMLEY, 1997; CROTEAU, 1987).

2.5.2.2 Monoterpenos: Linalol e a enzima Linalol sintase (LIS)

Estão ilustradas na Figura 14 as estruturas de alguns monoterpenos e sesquiterpenos de manjeriço.

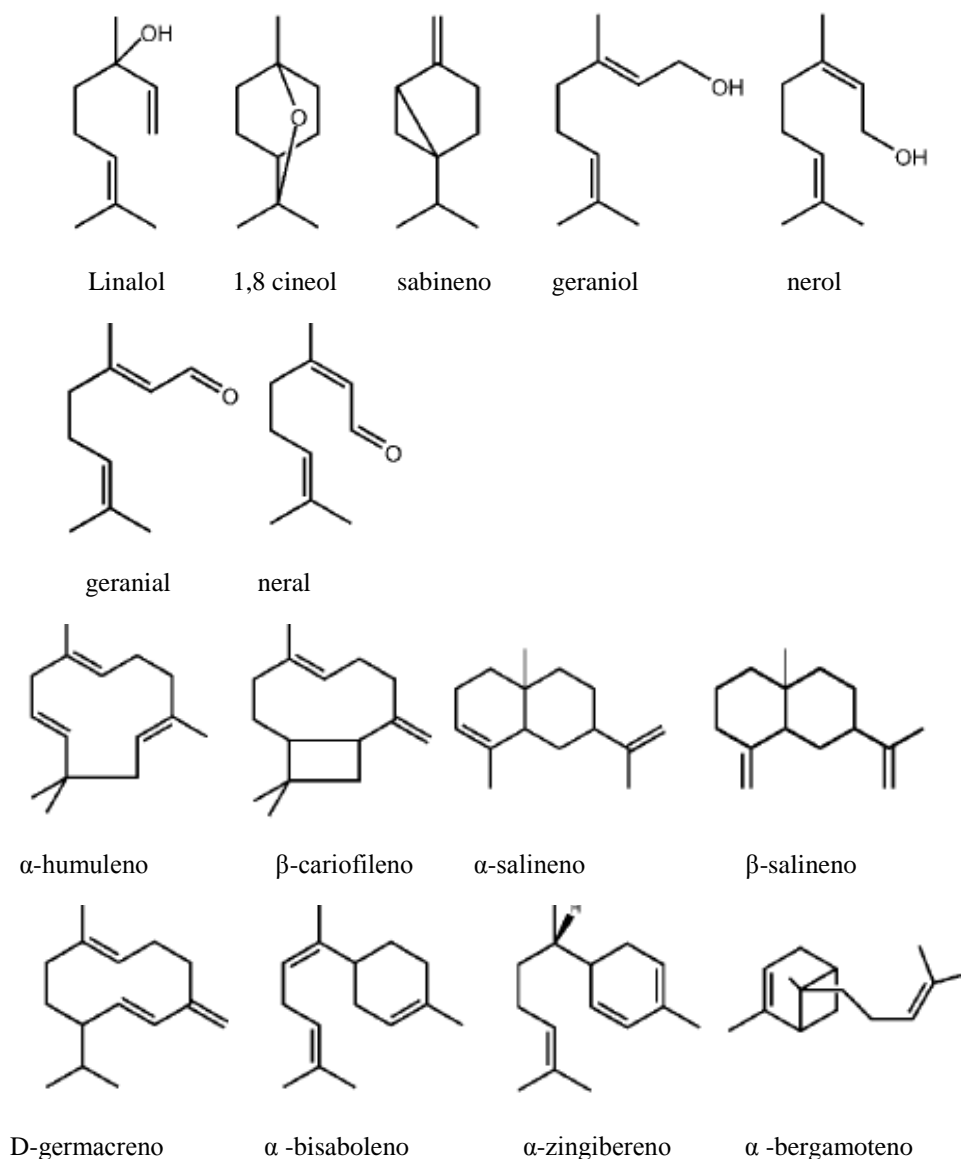


Figura 14. Principais monoterpênos (do linalol ao neral), sesquiterpênos (do α -humuleno ao α -bergamoteno) sintetizados nos tricomas glandulares de manjerição.

Fonte: Iijima *et al.* (2004)

Dentre os monoterpênos o linalol, 1,8 cineol, sabineno, geraniol, nerol, geranial, neral, e sesquiterpênos α humuleno, β cariofileno, α selineno, β selineno, D germacreno, α bisaboleno, α zingibereno e α bergamoteno entre outros metabólitos que estão em menor quantidade, são constituintes do óleo essencial em manjerição (IIJIMA; DAVIDOVICH-RIKANATI; *et al.*, 2004).

A geranyl pirofosfato sintase (GPPS) foi isolada nos plastídios não fotossintetizantes e nas células do parênquima do cloroplasto, esta observação comprova que biosíntese de monoterpênos não ocorre exclusivamente em tecidos especializados como os tricomas secretores (BOUVIER *et al.*, 2000). Esta enzima catalisa a condensação de IPP e DMPP para formar o geranyl pirofosfato (GPP) (Figura 15).

Após a formação do GPP, a linalol sintase (LIS) que é uma enzima monomérica da classe das monoterpenos sintases catalisa a conversão do GPP a (3)-S-linalol em *Clarkia breweri* (PICHERSKY *et al.*, 1995). Em menta e outras plantas da família *Lamiacea*, a LIS forma o (3)-R-linalol e seu possível mecanismo de ação envolve a ligação do substrato no sítio ativo e sua ionização por metais, seguido da saída do grupo OPP gerando um carbocátion que sofre um ataque nucleofílico pela água (CROWELL *et al.*, 2002).

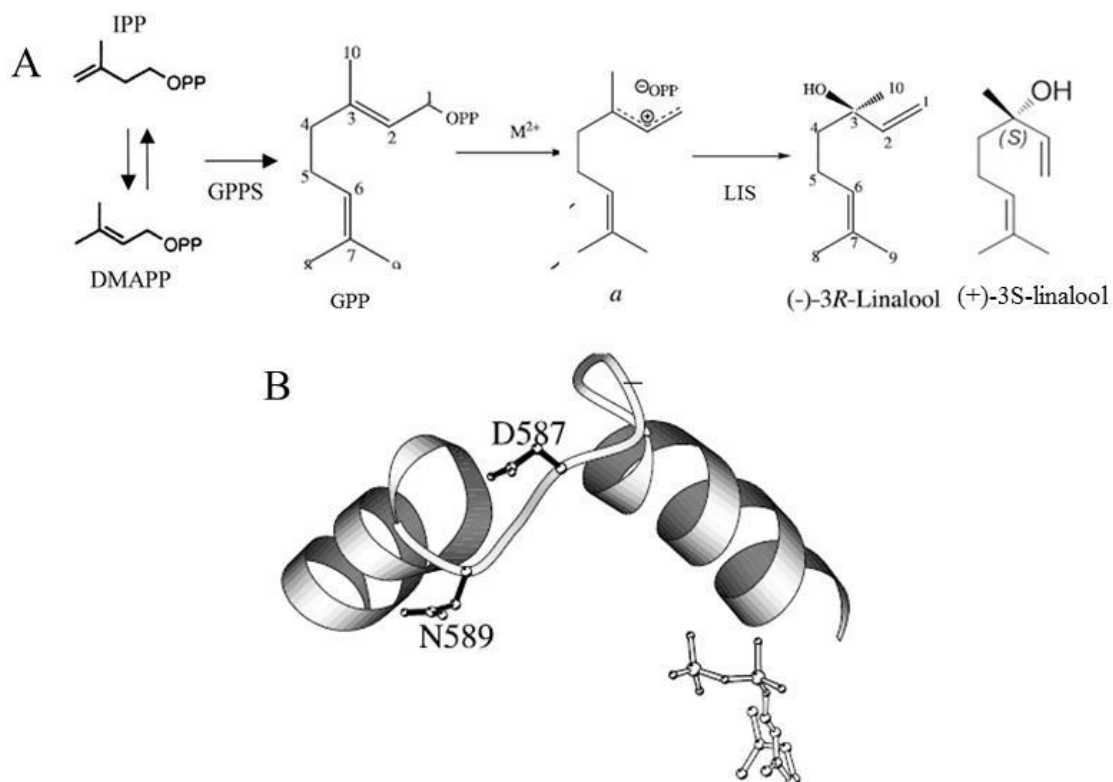


Figura 15. Reação Geranyl pirofosfato sintase e estrutura do linalol.

A: Mecanismo de reação de conversão de Geranyl pirofosfato (GPP) a linalol e estrutura.

Estrutura do (-)-3R linalol (+)-3S- linalool. B: Estrutura em hélice da linalol sintase (LIS) com o substrato GPP ancorado no sítio ativo. Fonte: Adaptado de Crowell, et al. (2002).

O linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol ou 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimetil), cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{18}O$, é um monoterpeno alcoólico de cadeia aberta que existe nas duas formas enantioméricas, 3S (+) e 3R (-) linalol, na qual diferem em suas propriedades farmacológicas (PEANA *et al.*, 2006) e olfativas (SUGAWARA *et al.*, 2000).

Ravid *et al.* (1997) analisou o óleo essencial de várias cultivares de *O.basilicum* que foram produzidas em Centros de Pesquisa, assim como também analisou vários óleos essenciais comerciais, ambos de diversas origens, utilizando o CG-FID. Em suas análises verificou-se que na maioria dos casos foi obtido o enantiômero R (-) linalol opticamente puro, o linalol foi o principal componente ($43,8 \pm 67,6\%$) nas variedades produzidas em laboratório, enquanto metil chavicol foi o principal componente ($68,1 \pm 77,3\%$) em sete óleos de manjerição comercial; cinco principais quimiotipos foram encontrados nas amostras das espécies de *Ocimum*, o quimiotipo linalol e eugenol; quimiotipo linalol e metil chavicol; quimiotipo linalol e trans-metil cinamato; e quimiotipo eugenol e metil eugenol.

A ordem de eluição obtida no seu experimento dos enantiômeros R (-) e S (+)- linalol pode ser vista na Figura 16. De acordo com Sugawara *et al.* (2000) o R(-) tem rotação específica de $[\alpha]_D = -15,1$ e S (+)- linalol tem rotação específica de $[\alpha]_D = +17,4$ e RS (\pm)- linalol tem rotação específica de $[\alpha]_D = 0$.

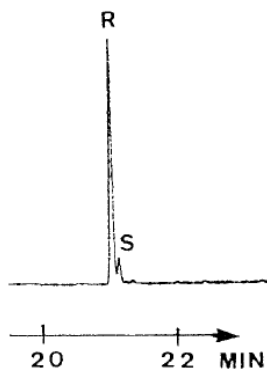


Figura 16. Separação dos enantiômeros do linalol isolados de *O. basilicum* com predominância do isômero R Linalol.

Fonte: Ravid *et al.* (1997).

Em relação à fragrância os enantiômeros diferem consideravelmente, o S (+) linalol ou isômero dextrorrotatório é chamado de coriandrol, possui uma fragrância herbácea com tom de folhas envelhecidas e nota de frutas cítricas e seu valor econômico é mais elevado. O R (-)- linalol ou isômero levorotatório é chamado de licareol, possui uma fragrância de lavanda e flores frescas com nota de lírio do vale (RAVID *et al.*, 1997; SUGAWARA *et al.*, 2000).

Além de sua utilização em perfumes, também compõe a fórmula de xampus, sabonetes, loção corporal, creme facial, antitranspirante e outros produtos de higiene, com limite máximo de 20% do uso do óleo em fragrâncias. O linalol também é utilizado para uso não cosmético como detergente de limpeza (KAMATOU; VILJOEN, 2008; LAPCZYNSKI *et al.*, 2008). O linalol é uma fonte alternativa para tratamento de enfermidades, bem como no combate a pragas de insetos e microorganismos e tem sua aplicação nas indústrias cosmética e alimentícia e na fitoterapia (HUSSAIN *et al.*, 2008; SAGGIORATO, 2008; TRIPATHI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

2.5.3 Via do chiquimato: Biossíntese da fenilalanina

A biossíntese fenilalanina (Phe) ocorre na via do chiquimato (Figura 17) para formar posteriormente o eugenol e outros fenilpropanóides. Essa via liga o metabolismo de carboidratos a biossíntese de aminoácidos aromáticos e é encontrada em microrganismos e plantas, mas não em animais (HERRMANN & WEAVER, 1999).

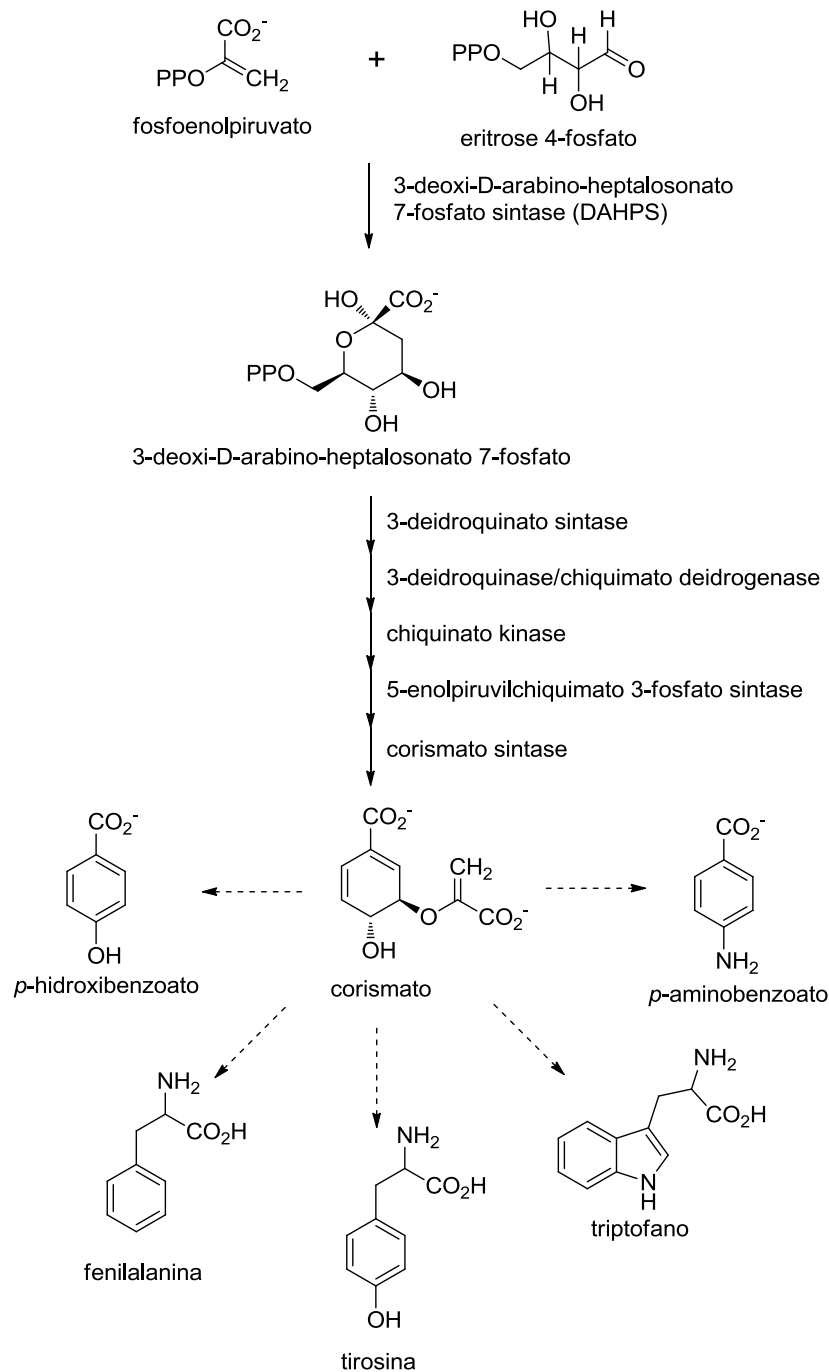


Figura 17. Via do chiquimato em plantas.

A partir do qual é formado o corismato precursor dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina que vão gerar vários metabólitos secundários. Fonte: Weaver & Herrmann (1997)

A condensação do fosfoenolpiruvato (PEP) derivado da via glicolítica com a eritrose 4-fosfato (E-4P) intermediário da via das pentoses fosfato gera o 3-deoxi-D-arabinoheptulosanato 7-fosfato. Este primeiro intermediário da via é convertido em seis etapas enzimáticas a corismato que é substrato de várias via levando a formação de alguns metabólitos primários, dentre eles o aminoácido aromático fenilalanina (WEAVER & HERRMANN, 1997).

A corismato mutase (CM) converte corismato a pefenato, e após a enzima pefenato aminotransferase (PAT) catalisa a conversão de pefenato a arogenato, e a arogenato desidratase (ADT) gera a fenilalanina (Figura 18).

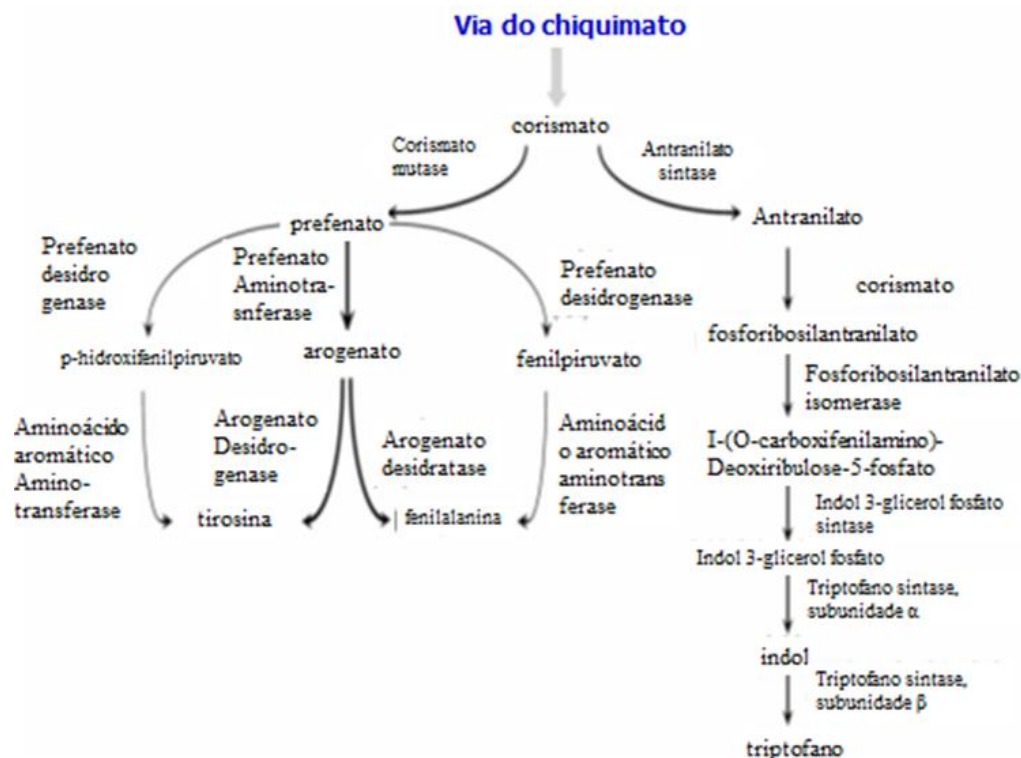


Figura 18. Via de biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas.

A principal via de biossíntese da Phe a partir do arogenato é indicada pelas setas mais largas.

Fonte: Adaptado de Tzin; Galili (2010)

2.5.4 Via dos fenilpropanóides: papel da fenilalanina amônia liase (PAL) e da Eugenol sintase (EGS) na biossíntese do eugenol

A enzima Fenilalanina amônia liase (PAL EC 4.3.1.5) promove a desaminação da fenilalanina gerando uma molécula de amônia e ácido cinâmico, precursor dos fenilpropanóides (ArC3) que possuem uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático. A redução na cadeia lateral do ácido cinâmico leva a formação de compostos presentes em óleos essenciais como o eugenol no cravo-da índia e em outras plantas. (DEWICK, 2002).

A fenilalanina amônia liase (PAL) é uma enzima citosólica com ampla distribuição em plantas. A sua estrutura tridimensional foi descrita por cristalografia de raio-X (Figura 19), a catálise no sítio ativo é governada por momentos de dipolo (Figura 19) de sete alfa-

hélices associadas com seis pólos positivo e um pólo negativo, a tríade catalítica é promovida por resíduos conservados de Ala- Ser-Gli (CALABRESE *et al.*, 2004).

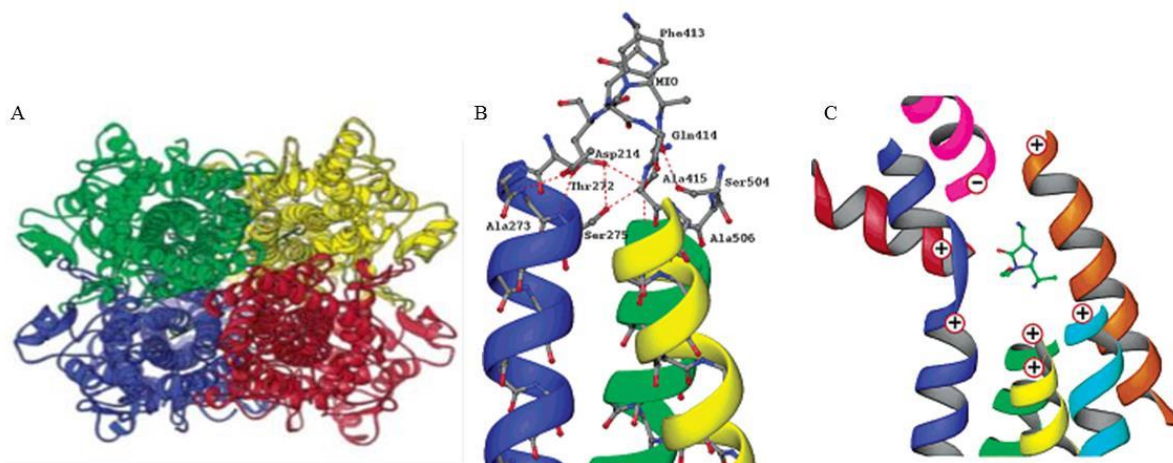


Figura 19. Estrutura quaternária e terciária da enzima fenilalanina amônia liase (PAL).

A: Estrutura quaternária da PAL, vista superior do tetrâmero, os quatro monômeros estão coloridos em vermelho, azul, verde e amarelo. B: Estrutura terciária da PAL. As três hélices no núcleo central, levando ao sítio ativo, são de cor azul, verde e amarelo. C: Sete alfa-hélices associadas aos sítios ativos da PAL. Seis pólos positivo e um pólo negativo das sete hélices, direcionando para os resíduos do sítio ativo.

Fonte: Modificado de Calabrese *et al.* (2004)

Esta enzima é o ponto de ligação entre o metabolismo primário e secundário (IJIMA; DAVIDOVICH-RIKANATI; *et al.*, 2004). Sua função é a catalisar a biotransformação da L-fenilalanina (L-Phe) em ácido trans-cinâmico (Figura 20) e amônio, e a partir de t-cinâmico gera o ácido p-cumárico e ferúlico com posterior formação de eugenol, metil eugenol, chavicol e metil chavicol (GANG *et al.*, 2001). E outros derivados como flavonóides, cumarinas, ligninas e taninos, todos esses compostos derivados de fenilpropanóides podem ser induzidos por estresses abióticos como deficiência de nitrogênio, fósforo, ferro, luz UV e baixa temperatura(DIXON; PAIVA, 1995).

Plantas sob deficiência de N podem desviar seus esqueletos de carbono para a biosíntese de fenilpropanóides e intensificar a atividade da PAL para aumentar os níveis de cumarinas (KOVÁČIK *et al.*, 2006) e acumular ácido clorogênico (derivado do ácido cafeico), aumentando a capacidade antioxidante dos extratos de plantas medicinais (GIORGI *et al.*, 2009).

A atividade da PAL e sua expressão gênica em *O. basilicum* é regulada pelo estágio de desenvolvimento das plantas diminuindo com a maturidade, apresentando elevada atividade e expressão gênica antes do florescimento, diminuindo depois (ZIAEI; SHARIFI, 2012).

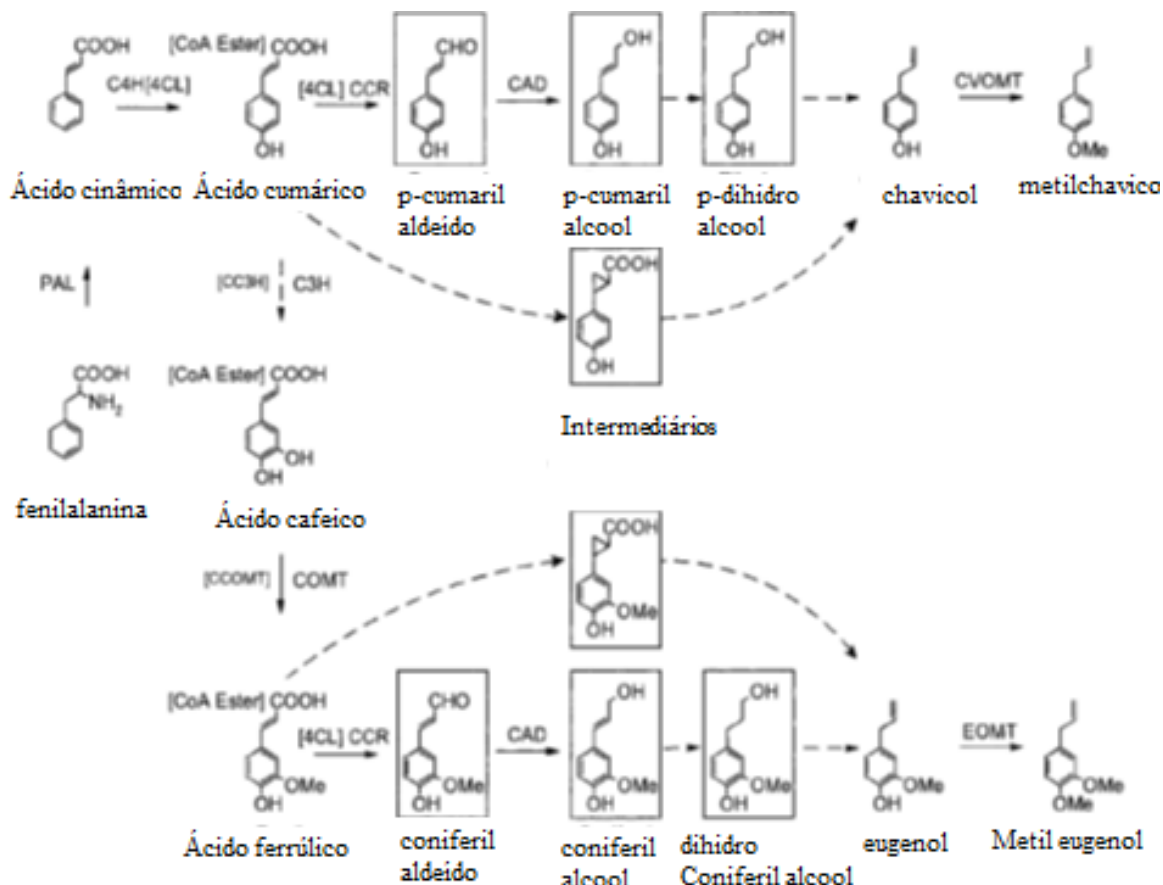


Figura 20. Via de biossíntese de fenilpropanóides a partir da fenil alanina amônia liase (PAL).
Fonte: Adaptado de Gang *et al.* (2001)

A biossíntese do eugenol é catalisada pela enzima eugenol sintase (EGS) que converte o seu substrato coniferil acetato a eugenol (Figura 21), tendo NADP(H) como cofator.

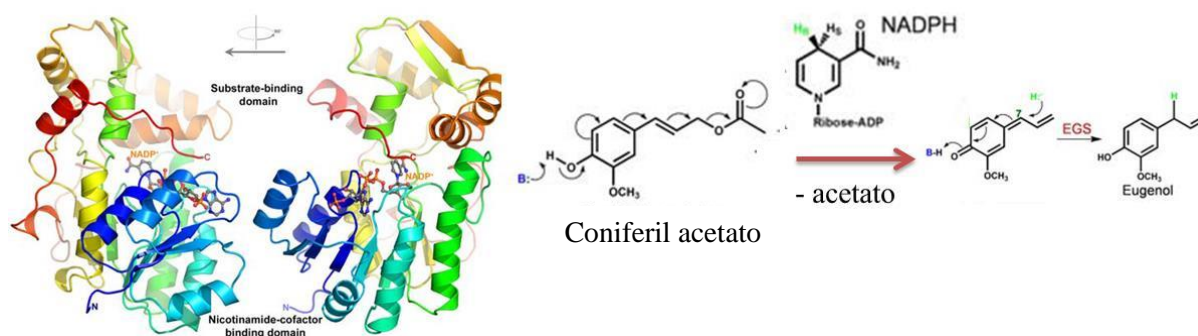


Figura 21. Estrutura da enzima eugenol sintase (EGS) e reação.
À esquerda: ilustrando o cofator NADP+ no sítio ativo, os resíduos C e N-terminal da cadeia polipeptídica. À direita: o mecanismo de reação proposto para a enzima, partindo do seu substrato coniferil acetato. Fonte: Adaptado de Louie *et al.* (2007)

Uma base catalítica no sítio ativo promove a desprotonação do grupo hidroxila do substrato, isso leva a perda do grupo acetato gerando um intermediário metileno quinona. O ataque ao carbono 7 do intermediário pelo hidreto derivado do NADPH produz o eugenol (LOUIE *et al.*, 2007).

O eugenol presente no óleo essencial manjeriço está em torno de 66% (ZHELJAZKOV; CALLAHAN; *et al.*, 2008), ele também é encontrado em quantidades significativas (60,6%) no óleo de cravo (CHRISTIAN & GOGGI, 2008).

As plantas sintetizam eugenol (Figura 20) como metabólito de defesa contra os animais e microrganismos e como atrativo para os polinizadores (YAZAKI, 2006). Por isso, as plantas medicinais que produzem óleo essencial com eugenol despertam o interesse tanto da indústria quanto dos órgãos de pesquisa (SINGH & MAURYA, 2005).

O eugenol é um componente de grande valor para estudos de atividade antifúngica (CHRISTIAN & GOGGI, 2008), antimicrobiana (SINGH; MAURYA, 2005), antihelmíntica e alelopática (ASHA *et al.*, 2001; KALINOVA *et al.*, 2011).

Devido ao fato da necessidade de novas substâncias como alternativa para uso antifúngico, estudos são realizados para testar a atividade do eugenol presente nos óleos essenciais de algumas plantas e de seus análogos contra alguns fungos patógenos de importância clínica como espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e dermatófitos (CARRASCO *et al.*, 2012). O mecanismo de ação antifúngico do eugenol se dá por uma ação simultânea de se ligar ao ergosterol na membrana celular fúngica e inibir a sua biossíntese em *C. albicans* (KHAN *et al.*, 2013).

Não só os patógenos humanos possuem importância econômica, mas também os fitopatógenos são responsáveis por muitas perdas na agricultura em culturas como o algodão, banana e palma, entre outras (MICHIELSE & REP, 2009), necessitando também de um controle desses microrganismos sobre as culturas. O eugenol também pode ser utilizado na proteção de plantas de importância econômica como o trigo contra plantas daninhas devido aos seus efeitos inibitórios sobre a germinação e o crescimento de outras plantas (KALINOVA *et al.*, 2011).

2.6 Fungos patogênicos e atividade antifúngica de óleo essencial

2.6.1 Fungos fitopatogênicos: *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*

Os fungos são organismos eucariotos, sua célula compartilha algumas semelhanças e diferenças com plantas e animais, não possuem cloroplasto, tem grandes vacúolos, membrana plasmática e uma parede celular semi-rígida responsável pela forma e integridade estrutural do organismo (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006).

O *Fusarium oxysporum* é um fungo parasita de várias espécies de plantas (MICHIELSE; REP, 2009). É classificado de acordo com a sua morfologia em fungo filamentoso, caracterizado pela formação de hifas septadas (KAWURI *et al.*, 2012) que em conjunto formam o micélio.

As colônias normalmente formam um micélio de coloração geralmente púrpura ou violeta intenso, com produção de três tipos de esporos assexuados (Figura 22). Os microconídios unicelulares, sem septo, cilíndricos, retos, curvados ou elipsoides. Os macronconídios fusiformes com paredes finas e longas, forma de foice, com septos transversais. E os clamidoconídios se formam a partir da condensação dos conteúdos das hifas e dos conídios (GRANADA *et al.*, 2001).

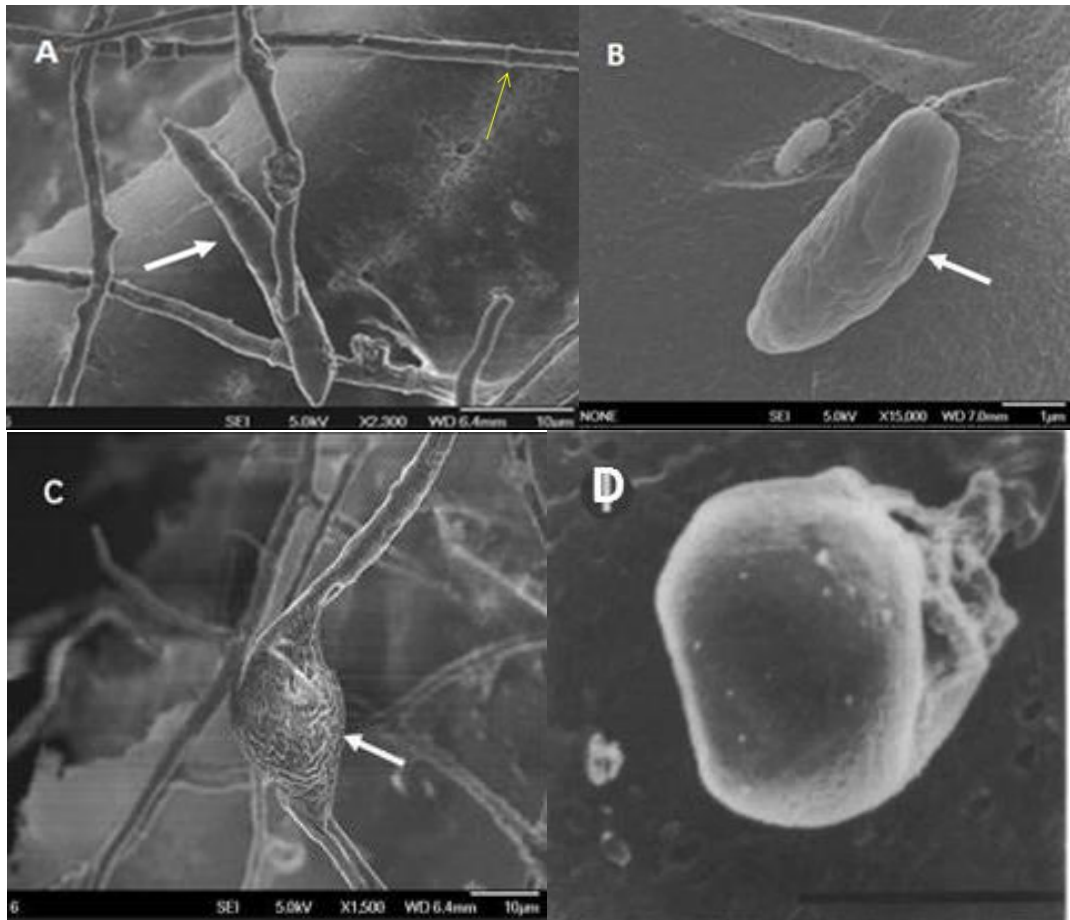


Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de varredura em *Fusarium oxysporum*.

A: hifa septada indicada por seta amarela e macroconídio indicado por seta branca. B: microconídio; C e D: clamidoconídeo. Fonte: Kawuri *et al.*(2012) e Toyota; Kimura (1993).

Várias espécies de *F oxysporum* existem na forma de clamidoconídeos (latente) no solo, esperando um estímulo que vem dos exudados das raízes para germinar e infectar a planta hospedeira. Esse fungo ao penetrar na raiz se transloca pelo xilema até o sistema vascular e nas células do parênquima produz os conídios e os clamidoconídeos, (KRAFT, 1994), ocorre também a fusão das hifas vegetativas (anastomose) e assim completa o seu ciclo de vida (GLASS *et al.*, 2004). Os sintomas de infecção por *F oxysporum* na planta são visíveis ocasionando a murcha de plantas como, por exemplo, o tomate (KATAN *et al.*, 1997).

A Figura 23 mostra a infecção do caule de tomate por macroconídeos de *F. oxysporum*.

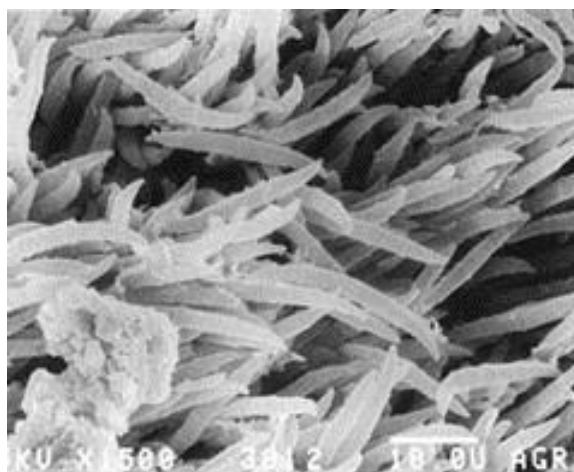


Figura 23. Imagem de microscopia eletrônica de varredura de macroconídios em *Fusarium oxysporum* colonizando a superfície do caule de tomate cereja.
Fonte: Katan *et al.* (1997).

Outro fitopatógeno filamentososo é *Rhizoctonia solani*, seu micélio vegetativo jovem é incolor (Figura 24 A), à medida que amadurecem adquirem coloração marrom (Figura 24 B) e formam um sclerotium marrom nas extremidades da placa de Petri (Figura 24 C). O micélio é composto de hifas (Figura 24 D e E) particionado em células individuais através de um septo onde ocorre normalmente a fusão dessas hifas (ZHENG; WANG, 2011).

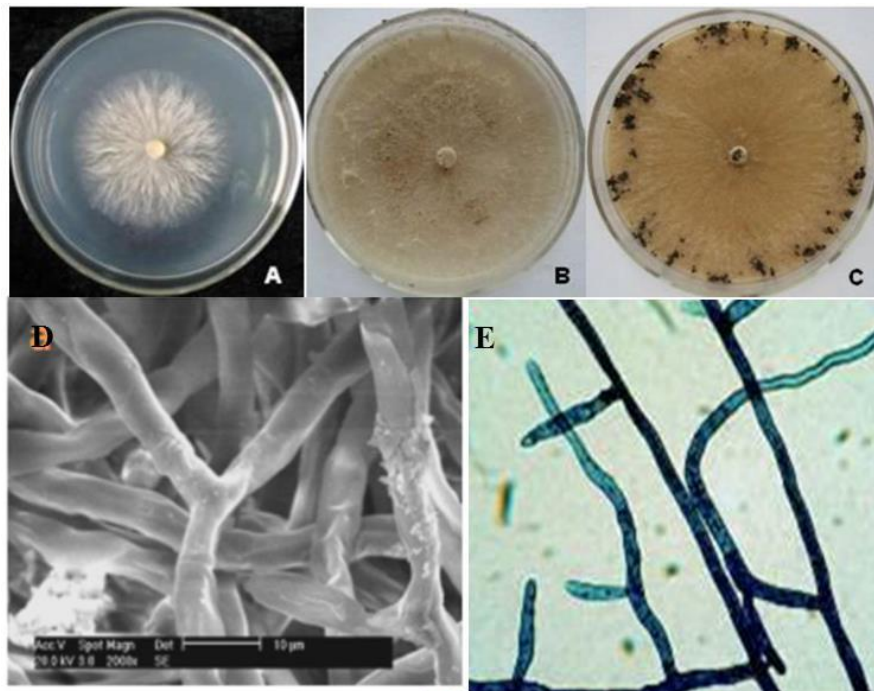


Figura 24. Fotografias do micélio de *Rhizoctonia solani* em Placas de Petri e imagens da morfologia das hifas vegetativas.

A: Micélio vegetativo jovem, B: Micélio vegetativo maduro e C: Esclerótios de *R. solani* espalhados pela placa de Petri. Fonte: Zheng; Wang (2011). D: Imagem de microscopia eletrônica de varredura das hifas vegetativas, Fonte: Xiong *et al.* (2013), E: Imagem de microscopia optica das hifas vegetativas, fonte: Garcia *et al.*(2006).

O processo de infecção de plantas por *R. solani* ocorre primeiro através da adesão das hifas ou pré-infecção, penetração nas células epidérmicas, colonização da planta hospedeira com posterior exibição dos sintomas (GARCÍA *et al.*, 2006) causando a podridão de sementes, tombamento, podridão radicular de frutos e queima foliar em feijão, soja (Figura 25A), alface e manchas pretas em tubérculo (Figura 25 B). As hifas são a base da infecção e penetram pela cutícula ou pelos estômatos da planta.

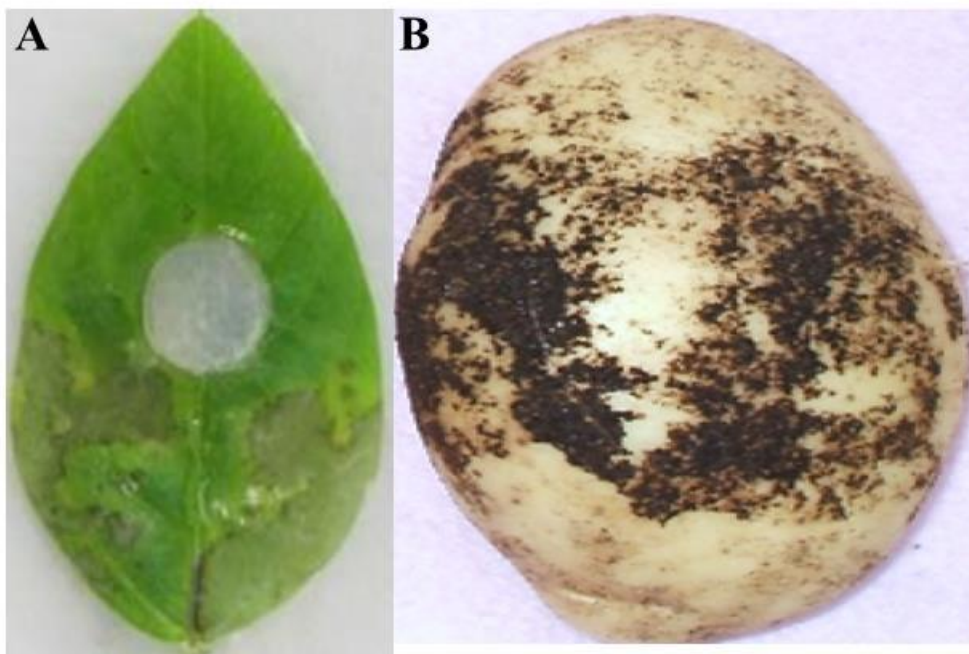


Figura 25. Sintomas de infecção em plantas por *Rhizoctonia solani*.

A: Sintomas de infecção causando manchas na folha de soja, com margens mais escuras irregulares e branqueadas no centro da folha, fonte: Zheng; Wang (2011) e B: Sintomas de infecção em tubérculo de batata com manchas pretas (esclerótios), fonte: (ABD-ELSALAM *et al.*, 2009).

As doenças causadas por fungos tiveram um aumento crescente nas duas décadas passadas (FISHER *et al.*, 2012). Estas duas espécies de fungos representam um grande problema em termos econômicos, devido ao seu poder de patogenicidade na disseminação de infecção em muitas espécies de plantas cultivadas de importância agrícola e medicinal, causando sérios prejuízos (GRANADA *et al.*, 2001; YOUSSEF *et al.*, 2012).

Isso causou como consequência a intensificação do uso de fungicidas sintéticos nas áreas agrícolas que em pouco tempo apresenta resultados eficazes e imediatos (AKINSANMI; DRENTH, 2012), mas em longo prazo se tornam prejudiciais, pois podem ser lixiviados para as áreas urbanas ou para os ambientes aquáticos acumulando-se nos tecidos de organismos marinhos como os peixes, agravando os riscos para toda a cadeia alimentar, inclusive para a população que consome esses organismos (SMALLING *et al.*, 2013).

Assim, a conscientização dos impactos da utilização desses pesticidas tem levado a procura de alternativas naturais e menos nocivas a partir de plantas medicinais, com resultados que direcionam para um potencial favorável dessas plantas no controle de pragas agrícolas (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2004).

2.6.2 *Geothricum spp*

O gênero possui onze espécies que estão distribuídas no ambiente. Em solos com cultivo de laranja causa a doença da podridão cítrica na raiz que tem gerado muitos prejuízos agrícolas (REN *et al.*, 2012). Essa espécie também foi encontrada acometendo as culturas de trigo, uva, cereja, e pinheiros, além de terem sido relatados sendo hospedeiros de dípteros e coleópteros (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Morfologicamente as colônias do gênero são brancas e formam hifas verdadeiras (SUH; BLACKWELL, 2006) perpendiculares ou com muitas ramificações que se desarticulam em arthroconídios e/ou blastoconídios (Figura 26).

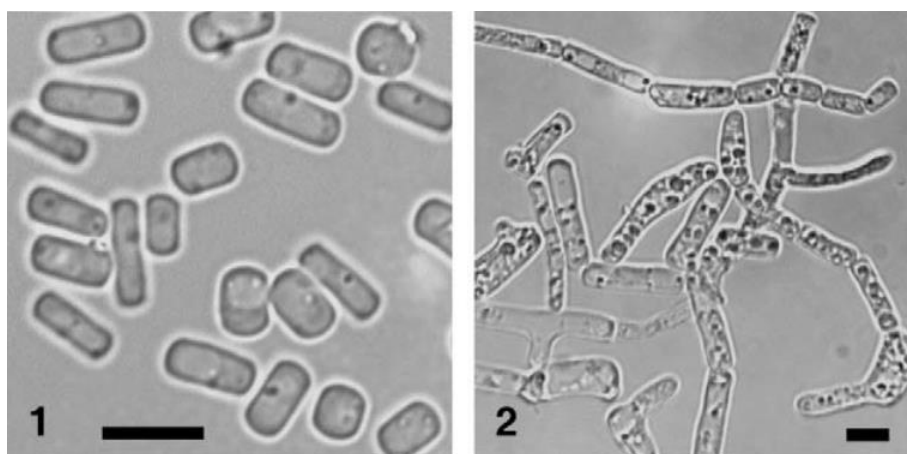


Figura 26. Imagens de microscopia de *Geothricum carabidarum* encontrados no intestino de besouros e lepdopteros.

1: arthroconídios cilíndricos e 2: hifas septadas. Fonte: Suh; Blackwell (2006).

2.6.3 *Leveduras prejudiciais à saúde humana: Candida albicans, C.guilliermondii, C.parapsilosis, C. tropicalis, C.krusei*

As espécies de *Candida* são fungos leveduriformes, unicelulares causadores das micoses superficiais ou sistêmicas chamadas candidíases. Diferentes espécies de *Candida* atualmente são responsáveis por até 50% dos casos de candidíase profundas, entretanto pouca atenção tem sido dada à virulência destes fungos (HAYNES, 2001).

A incidência de infecções causadas por *Candida spp* vem aumentando substancialmente nos últimos anos (TORTORANO *et al.*, 2004) o que contribui agravando o quadro de saúde pública e prolongando o tempo de internação dos pacientes nos hospitais. As espécies mais frequentemente detectadas em pacientes internados foram *C. albicans* (33 a 70%), seguido de *C. parapsilosis* (27%) e *C. tropicalis* (11 a 24%). (GOLDANI; MÁRIO, 2003; KALKANCI *et al.*, 2007; LEONE *et al.*, 2003). *C. Krusei* é responsável por até 5% das candidemias, no entanto, estudo de caso controle de pacientes com infecção sanguínea atribuiu 48% das mortes a *C. Krusei* (SCHUSTER *et al.*, 2013). Investigações em pacientes com suspeita de otomicoses (infecção fúngica que causa danos no sistema auditivo externo) foi confirmada a prevalência de *C. guilliermondii* em 19,3% dos casos (ADOUBRYN *et al.*, 2014)

Das espécies de *Candida*, *C. albicans* é um dos principais problemas de saúde pública que afeta até 75% das mulheres (POULAIN, 2013), é microrganismo que habita normalmente o trato gastrointestinal e as mucosas sem causar danos, a sua patogenicidade está relacionada ao comprometimento sistema imune do seu hospedeiro. Atualmente com o aumento dos casos

de baixa imunidade e/ou desequilíbrio da microbiota gastrointestinal a espécie se tornou uma das mais importantes do gênero causando diversas doenças superficiais da pele e das mucosas e também infecções sistêmicas que dificultam o tratamento devido à resistência da espécie as drogas disponíveis no mercado (TSAI *et al.*, 2013).

Candida albicans, é um fungo oportunista e pode se proliferar na forma de levedura, de hifa ou de pseudohifa (Figura 27). O crescimento leveduriforme se dá pela pelos brotos ou células filhas que se dissociam da mãe. As mudanças fenotípicas em *C. albicans* auxiliam na adaptação aos diferentes ambientes no hospedeiro e alteram a cor, a forma, o tamanho das células e a sua capacidade de formar hifas (WHITEWAY; BACHEWICH, 2007). A forma de hifa (Figura 27) é a preferencial para infecção do seu hospedeiro, e a forma leveduriforme se encontra na superfície do epitélio ou infiltradas nos tecidos a partir da penetração das hifas (GOW; HUBE, 2012; GOW; VEERDONK, 2013).

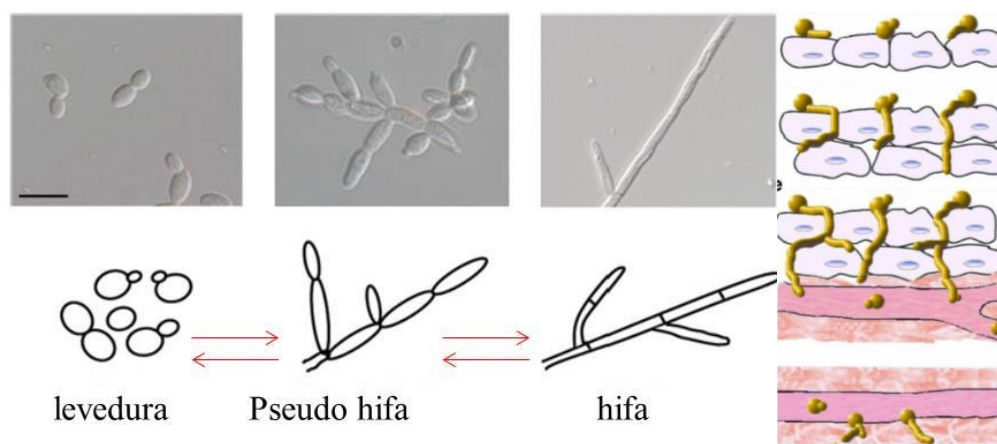


Figura 27. Morfologia de *Candida albicans* (esquerda) e etapas de invasão em um processo de infecção do hospedeiro (direita).

À esquerda: Imagens de microscopia de luz em células de *C. albicans* na forma de levedura, pseudo-hifa e hifa (na parte superior) e abaixo a representação esquemática de cada tipo de morfologia assumida por *C. albicans*. Adaptado de Thompson *et al.*(2011).

À direita: ilustração dos passos na invasão de tecidos por *C. albicans*. Passo 1: adesão ao epitélio; Passo 2: penetração epitelial e invasão de hifas; Passo 3: disseminação vascular, que envolve penetração de hifas e sementeira de células de levedura para a corrente sanguínea; e, finalmente, a colonização endotelial e penetração durante a doença disseminada. Fonte: Gow *et al.* (2013).

2.6.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae assim como *Candida sp.* são microrganismos unicelulares leveduriformes (THOMPSON *et al.*, 2011) encontrados na natureza em plantas, nas frutas e no solo. Tradicionalmente são utilizados para fermentação de pão e de bebidas, são fontes de suplementos como aditivos alimentares, agentes aromatizantes e fonte de produção de etanol para combustível. (BEKATOROU *et al.*, 2006; JOHNSON, 2013).

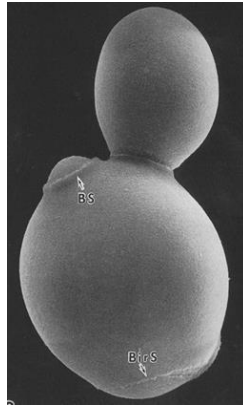
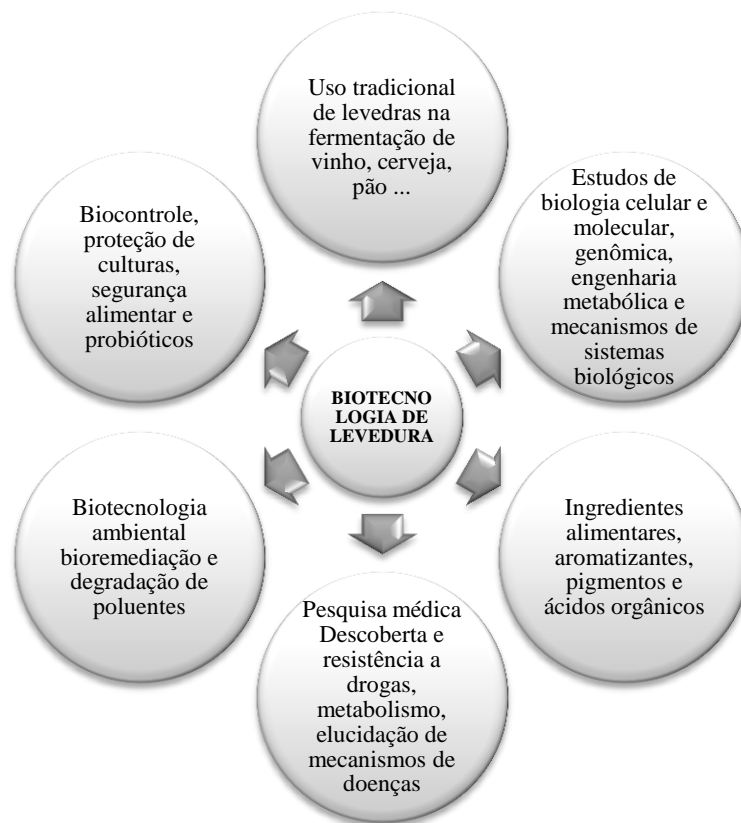


Figura 28. Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície externa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: Johnson, 2013

Tornou-se um grupo de organismo biotecnológico muito importante (Esquema 1), utilizado como um modelo de eucariota, sendo o mais estudado e caracterizado, pois apresenta como vantagem um rápido e fácil cultivo com baixo custo, além de serem considerados microorganismos seguros. Entretanto, evidências indicam o envolvimento de *S. cerevisiae* em algumas doenças superficiais e sistêmicas de pacientes internados com a imunidade comprometida (ENACHE-ANGOULVANT; HENNEQUIN, 2005; MURPHY; KAVANAGH, 1999).



Esquema 1. As principais áreas de aplicação da biotecnologia de leveduras.

Fonte: Adaptado de Johnson (2013)

2.7 Sítios de produção de óleo essencial: tricomas glandulares ou secretores

A biossíntese e o armazenamento de metabólitos secundários ocorre em tecidos especializados denominados tricomas secretores, ou em cavidades ou ductos secretórios que consistem em grande espaços intercelulares revestidos por um epitélio de células secretoras e em células secretoras que acumulam os produtos secretados dentro seus vacúolos (MAFFEI, 2010).

Os tricomas secretores são o local de biossíntese de linalol, 1,8 cineol e eugenol. São estruturas altamente especializadas localizadas na superfície aérea, especificamente na epiderme das plantas e possuem uma variedade de funções na vida das plantas, incluindo a defesa contra herbívoros e microorganismos. Apresentam uma variedade de forma, tamanho e composição celular. De acordo com Svoboda & Svoboda, (2000) os tricomas são modificações da epiderme das folhas, mas também podem estar presentes no caule e nas flores de muitas plantas da família Lamiaceae.

Os óleos essenciais secretados nos tricomas podem possuir diferentes composições dependendo da família e da espécie da planta. Ao passo que o tipo de glândula que uma determinada planta possui e o tipo de óleo secretado são características importantes para diferenciar as famílias de plantas aromáticas. Na família *Lamiaceae*, os tricomas que secretam os óleos se projetam para a superfície aérea da folha indicando uma característica da família (LAWRENCET, 2001).

São classificados em dois tipos principais, os tricomas não glandulares e glandulares (Figura 29). Os tricomas glandulares de muitas plantas tem grande importância, pois sintetizam compostos de valor comercial como fármacos, fragrâncias, aditivos de alimentos e inseticidas naturais, portanto, são produtos valiosos de grande interesse para exploração pela indústria farmacêutica, perfumaria e fábricas de pesticidas (PETER; SHANOWER, 1998).

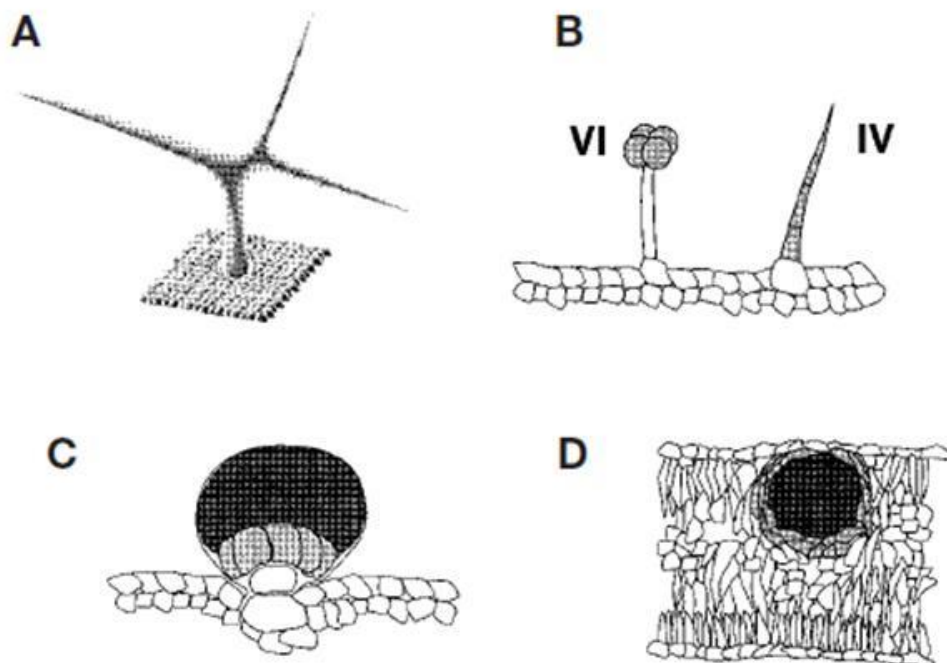


Figura 29. Ilustração de Tricomas não glandulares e glandulares.
A: tricoma não glandular de *Arabidopsis*. B: Tricomas glandulares Tipo IV e VI de *L. esulentun*. C: Tricomas glandulares de *M. piperita*. D: Cavidade secretora de *Eucalyptus*
Fonte: (MCCASKILL; CROTEAU, 1999b)

O estudo dessas estruturas produtoras de substâncias químicas de propriedades medicinais atrai um grande número de estudiosos no sentido de elucidar sua bioquímica e com isso conseguir potencializar a síntese de seus produtos finais.

Em relação à distribuição e o desenvolvimento do tricoma glandular peltado (TGP) nas plantas, Turner *et al.* (2000) desenvolveram um trabalho com *M. piperita* avaliando as partes apical, média e basal, na superfície abaxial e adaxial das folhas. De acordo com os resultados novas glândulas são formadas até cessar a expansão da folha com uma distribuição não uniforme nas diferentes faces e regiões da folha, e reflete um padrão de maturação na base da folha, sendo que, as regiões imaturas da base da folha continuam a produzir glândulas por muito tempo depois de ter cessado a produção de glândulas no ápice da folha. De acordo com as observações feitas pelos mesmos autores, é necessário um período em torno de 20 a 30 horas de atividade secretória para completo enchimento da glândula com o óleo essencial.

Os estudos conduzidos por Deschamps *et al.* (2006) relatam que, as perdas por volatilização e/ou catabolismo, pareciam ser mais determinantes no acúmulo de óleo essencial que a densidade de tricomas, pois o maior rendimento de óleo essencial foi observado em *Mentha piperita* (32,09 $\mu\text{L. g}^{-1}$ de MS da folha) e *M. aquatica* (33,23 $\mu\text{L. g}^{-1}$ de MS da folha), comparado com *M. arvensis* (16,61 $\mu\text{L. g}^{-1}$ de MS). Os autores observaram a maior densidade de tricomas nas regiões mediana e proximal da face abaxial de *M. arvensis* e distal adaxial de *Mentha piperita*. Em *M. aquatica* a maior densidade foi observada na região distal da face abaxial.

Martins (2002), estudando a anatomia foliar das espécies de *M. spicata* x *M. suaveolens*, verificou em estudos de microscopia eletrônica que os tricomas peltados de *M. spicata* e de *M. spicata* x *suaveolens* consistem de uma célula basal, uma peduncular curta e larga, com paredes externas cutinizadas, e apresenta célula apical multicelular, com doze células secretoras distribuídas radialmente em dois círculos concêntricos. O círculo central possui quatro células secretoras e o círculo externo, possuem oito células secretoras, o acúmulo da secreção fica em uma cavidade formada entre a cutícula e as células secretoras e o tricoma é inserido sob onze células epidérmicas.

As folhas de *O. basilicum* apresentam tricomas glandulares não glandulares, em ambas as superfícies abaxial e adaxial (Figura 30), com tricomas glandulares de dois tipos, os peltados e capitados. Observou-se que a densidade dos tricomas glandulares foi maior em folhas jovens, e que quando as regiões das folhas iniciavam sua expansão nenhum tricoma novo foi produzido e a sua densidade diminuiu. Isso refletiu em consequências na porcentagem de alguns componentes do óleo essencial entre folhas jovens e maduras. Os tricomas peltados são pequenos e consistem de uma célula basal, um pedúnculo, uma cabeça alongada com duas células largas ou ovais (WERKER *et al.*, 1993).

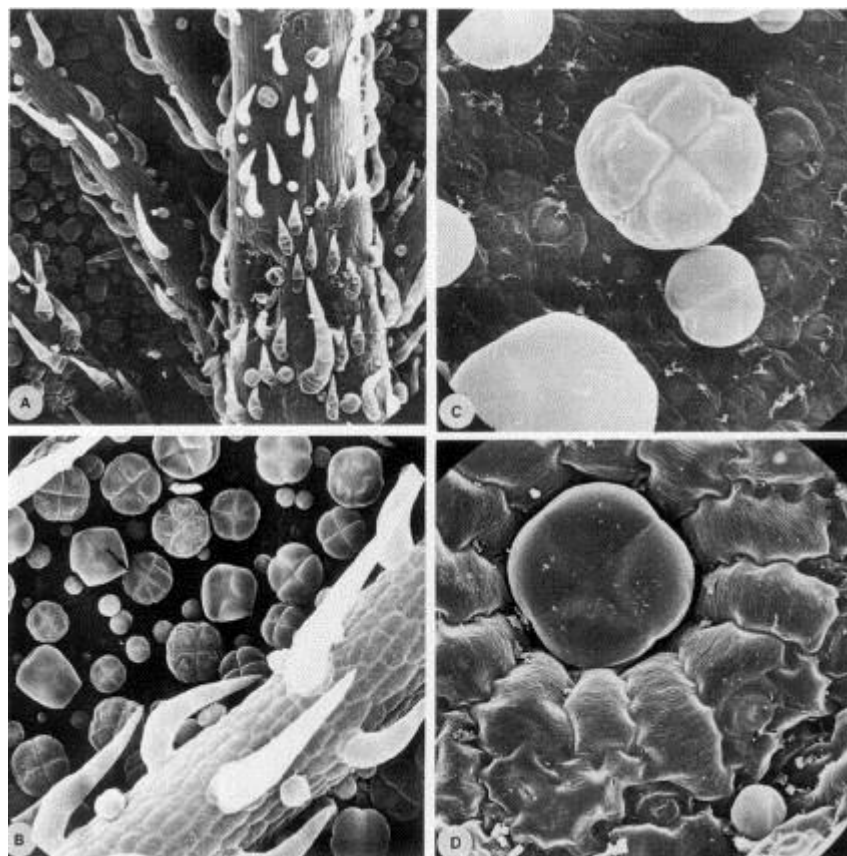


Figura 30. Imagens em microscopia eletrônica dos tricomas de *Ocimum basilicum*.

A e B são segmentos da face abaxial das folhas. A: tricomas não glandulares situados nas veias, B: tricomas glandulares situados entre as grandes veias. C e D: tricomas capitatos e peltados. Fonte: Werker *et al.* (1993)

Dentre os métodos para examinar os tricomas de plantas, o mais utilizado é a microscopia eletrônica que mostra detalhes dos estágios de desenvolvimento das células secretoras, assim como o tamanho da glândula e a quantidade de material liberado dentro da cavidade subcuticular. O tipo de estrutura é uma característica específica da família ou da espécie, e serve para identificar o tipo de material da planta e a autenticidade da mesma em caso de suspeita de adulteração (SVOBODA; SVOBODA, 2000).

A avaliação dos tricomas pode se constituir em uma ferramenta importante na identificação das enzimas chave e das vias responsáveis pela síntese dos metabolitos especiais, portanto, é nítida a importância do estudo da bioquímica dos tricomas como alvo para a engenharia metabólica de plantas (SCHILMILLER *et al.*, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Efeito de doses de Nitrato (50 e 300 Kg N.ha⁻¹) na Produção de Biomassa, No Rendimento e perfil de Óleo Essencial e no Metabolismo de Nitrogênio em Manjeriço, variedade *Sweet Italian Large Leaf*

3.1.1 Condução do experimento em casa de vegetação utilizando vasos com terra

3.1.1.1 Análise e correção do solo

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Química-UFRRJ no campus Seropédica-RJ. O substrato utilizado neste experimento foi extraído de 0-20 cm do horizonte A de um Argissolo Vermelho-Amarelo, localizado no Campus Experimental (Terraço) da Embrapa Agrobiologia.

Após a análise da amostra de solo (Tabela 2) na terra fina seca ao ar (TFSA) foi feita a correção com calcário dolomítico, aos 30 dias antes da aplicação dos tratamentos, com o objetivo de elevar a saturação de bases para 70%.

Tabela 2. Análise do pH e dos componentes químicos encontrados na terra fina seca ao ar (TFSA) das amostras do horizonte A de um Argissolo Vermelho-Amarelo utilizado no experimento.

Identificação da amostra	pH (H ₂ O)	cmol _c /dm ³				mg/dm ³		
		Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H+Al ²⁺	K	Na	P
Amostra de solo	5,43	0,1	1,5	1,6	3,63	0,1	0,03	5,0
(EMBRAPA, 2007)								

3.1.2 Material vegetal e condução do experimento

Sementes de manjeriço da variedade *Sweet Italian Large Leaf* (Figura 31) foram adquiridas do fornecedor ISLA e postas para germinar em bandejas de plástico com 200 células, contendo substrato comercial Floreira® inicialmente. No manejo das sementeiras utilizou-se uma tela sombrite de 50%, para a proteção da radiação solar e foram realizadas duas irrigações diárias.



Figura 31. Plântulas de manjericão variedade *Sweet Italian Large Leaf* aos dois dias após a germinação, cultivadas em casa de vegetação no Departamento de Química da UFRRJ

Aos 15 dias após a germinação (Figura 32), cinco plântulas foram transferidas para vasos com terra com dimensões de 50 x 15 x 15cm (c x a x l) com capacidade 11,25L.



Figura 32. Plântulas de manjericão variedade *Sweet Italian Large Leaf* aos quinze dias após a germinação, cultivadas em casa de vegetação Depto. Química da UFRRJ.

Trinta dias após o transplântio (Figura 33) foram aplicados os tratamentos, que consistiram no fornecimento de 50 e 300 Kg N ha⁻¹, respectivamente, na forma de nitrato com reagente P.A proveniente dos sais de nitrato de cálcio, magnésio e de potássio. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos (níveis de N-NO₃⁻) e quatro repetições.



Figura 33-Mudas de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* produzidas em casa de vegetação (Depto. Química. UFRRJ) com sombrite 50% e irrigação por microaspersores

A coleta foi feita na época do florescimento aos 46 dias após os tratamentos (Figura 34).



Figura 34. Plantas da variedade *Sweet Italian Large Leaf* na época do florescimento submetidas a duas doses de nitrato em casa de vegetação (Depto. Química. UFRRJ).

3.1.3 Coleta das plantas para análises

Foi realizada uma coleta da parte aérea das plantas quando estas apresentaram inflorescências (aos 46 dias após o início dos tratamentos), sendo essas coletas realizadas no período de 09:00 às 11:00 h e o corte feito rente ao solo. Em seguida, as folhas e os caules foram separados e pesados, para a avaliação da biomassa fresca e posterior análise das frações solúveis, atividade da nitrato redutase, extração do óleo essencial e testes de atividade biológica. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias verificadas por teste de médias (Scott-Knot $P < 0,05$), com auxílio do software SAEG 9.1.

3.1.4 Atividade da Nitrato Redutase

Para o ensaio *in vivo* da atividade da nitrato redutase (ANR), 0,2 g de massa fresca de folha e caule foram pesados para efetuar os procedimentos de análise utilizando o método de JAWORSKI (1971). Segmentos de tecido coletados do caule e da folha (0,2 gramas) foram incubados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução incubadora (tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,5 + n-propanol + nitrato de potássio- KNO_3), com posterior transferência para banho-maria a 30^oC, na ausência de luz. Após uma hora, foram transferidos 0,4 mL do meio de reação para tubos de ensaio contendo: 0,3 ml de sulfanilamida 1% em HCl 3,0 mol L^{-1} , 0,3 mL de n-naftil-etileno-diamino 0,02% (m/v), ao decorrer de 20 minutos adicionou-se 4 mL de água. A concentração de nitrito produzida foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade da nitrato redutase foi expressa em micromol de nitrito produzido por grama de massa.

3.1.5 Determinações analíticas no extrato alcoólico-Extração com etanol 80% e partição com clorofórmio do material fresco

Foi separada uma alíquota de 1,0 g de massa fresca, armazenada em frasco âmbar com etanol 80% para análise das frações solúveis. As amostras em etanol 80% foram trituradas por 3 minutos no polytron, após isso o material foi passado em funil contendo papel de filtro e 4 camadas de gaze, depois recolheu-se o filtrado e transferiu para funil de separação (Figura 35).



Figura 35. Extração alcoólica no material vegetal fresco. Etapa de partição utilizando clorofórmio para promover a separação da fase polar (aquosa) e apolar (clorofórmio)

Adicionou-se ao funil de separação um volume de clorofórmio igual ao da solução alcoólica. O funil foi agitado suavemente e permaneceu em repouso por 40 minutos, até a completa separação das fases polar e apolar, depois a fase apolar foi descartada e completou-se a fase polar para 25 ml com etanol 80%, o extrato foi armazenado em geladeira para posteriores análises das frações solúveis.

Após partição com clorofórmio, as frações solúveis foram determinadas de acordo com os protocolos de N-nitrato utilizando ácido salicílico segundo a metodologia proposta por CATALDO et al. (1975). Açúcares solúveis pelo método da antrona de acordo com a metodologia de YEMM; WILLIS (1954). N-amino livre pelo método da ninidrina segundo a metodologia de YEMM; COCKING (1955) e N-amônio conforme a metodologia colorimétrica proposta por FELKER (1977).

3.1.6 *Digestão e análises em material seco*

O restante do material vegetal (caule e folha) foi seco em estufa a 60°C com circulação de ar quente por 48 h, depois foram trituradas e homogeneizadas em processador. Em seguida, o material foi peneirado e duas amostras de 200 mg foram retiradas e envelopadas para a digestão sulfúrica. O extrato obtido a partir do material digerido foi utilizado para quantificação de N-total segundo metodologia proposta por TEDESCO (1982).

3.1.7 *Extração do óleo essencial por arraste a vapor*

O óleo essencial foi obtido de amostras de 100 g de folhas frescas coletadas na época do florescimento por arraste a vapor de água utilizando o aparelho de Clevenger (Figura 36), com modificações para adaptar o reservatório do material vegetal.



Figura 36. Extração e evaporação do óleo essencial.
Extração por arraste a vapor (à esquerda) e concentração do óleo essencial em rotavapor (à direita)

O tempo de arraste foi de 30 minutos após o início da condensação. Foram realizadas quatro extrações do óleo essencial das folhas de manjeriço, obtendo-se no final uma amostra composta. Logo em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, realizando-se cinco lavagens do hidrolato com cinco porções de 25,0 mL de diclorometano por 10 minutos cada.

As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro, deixando-se agir por 30 minutos e posteriormente o sal foi removido por filtração simples, e o solvente evaporado em rotavapor (Figura 36). O óleo obtido foi pesado e armazenado em frascos âmbar a -30°C para posterior análise do perfil químico por cromatografia gasosa (CG). O teor de óleo essencial (%) foi estimado com base na massa fresca vegetal.

3.1.8 Análise cromatográfica do óleo essencial para a identificação de compostos

Os óleos essenciais e os padrões analíticos foram diluídos em diclorometano e injetados em cromatógrafo em fase gasosa com detector FID (detector de ionização por chama) HP5890-séries II (CG-FID). Condições: Coluna VF-5m (30mmx 0,25mmx 0,25µm) Varian. A temperatura da coluna foi de 60°C/2°-2°C/min-110°C-3°/min-150°C-15°/min-290°C/15min, detector 250°C (FID), injetor 220°C, gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1mL/min e pressão de 12 psi. A identificação dos constituintes foi realizada através dos tempos de retenção das substâncias do óleo em comparação com os padrões (linalol, eugenol, 1,8 cineol, α -terpineol e α -trans bergamoteno) e os índices de Kovats (IK) foram calculados através da co-injeção com a série homóloga de hidrocarbonetos (C₈-C₂₀).

3.1.9 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H)

Para confirmação das estruturas das substâncias majoritárias presentes no óleo essencial foram obtidos os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN) dos óleos essenciais obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker de 500MHz, utilizando clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente. As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química da UFRRJ. O Tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades adimensionais (representando partes por milhão da frequência aplicada, sendo as áreas relativas dos sinais de absorção obtidos por integração eletrônica. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz) e descritas da seguinte forma: sinal simples (s), sinal duplo (d), sinal triplo (t), duplo sinal duplo (dd), duplo sinal duplo duplo (ddd), duplo sinal duplo duplo duplo (dddd) duplo sinal triplo (dt), sinal múltiplo (m) e sinal simples largo (sl).

3.2 Avaliação da atividade alelopática do óleo essencial de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* em sementes de alface (*Lactuca sativa*)

Sementes de alface comercial após desinfestação com hipoclorito de sódio 50% V/V foram semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) sobre duas folhas de papel de filtro esterilizadas. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e 50 sementes por placa. O óleo essencial de manjeriço foi solubilizado em diclorometano e preparado nas concentrações de 1; 2 e 15 mg.mL⁻¹, e as substâncias puras linalol e eugenol (Sigma-Aldrich) foram preparadas apenas na concentração de 15 mg.mL⁻¹. Em seguida, as soluções foram distribuídas, em volumes de 2 mL de óleo essencial, de linalol e de eugenol, em cada placa de Petri. As placas foram deixadas abertas para a evaporação do solvente, e logo em seguida as placas receberam 2 mL de água destilada e o controle positivo recebeu somente água destilada. O controle negativo recebeu 2 mL diclorometano.

As placas foram lacradas e acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O potencial alelopático foi avaliado através da determinação da porcentagem de germinação e do comprimento das raízes (cm) das plântulas. Foi adotado como critério para semente germinada radículas com 2mm de comprimento. A avaliação dos resultados foi realizada no primeiro dia em que as plantas começaram a germinar (protrusão da radícula). Avaliou-se no sétimo dia a porcentagem de germinação (contagens) e o comprimento das raízes foi mensurado com paquímetro. As placas foram fotografadas e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias verificadas por teste de médias de Scott-Knott.

3.3 Avaliação do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* sobre fungos fitopatogênicos

Culturas puras dos fungos *Fusarium oxysporium* (código DOA60) e *Rhizoctonia solani* (código CO5) foram cedidas da micoteca do setor de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para utilização dos testes. A manutenção dos fungos foi realizada periodicamente através do cultivo em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA). O bioensaio foi realizado para avaliar o desenvolvimento ou a inibição dos fungos em concentrações crescentes de óleo essencial de manjeriço. No ensaio também foram utilizadas as substâncias adquiridas da Sigma-Aldrich, (±)-linalol pureza >95% e eugenol 99 % de pureza.

O meio de cultura foi previamente preparado e autoclavado por 20 minutos a 120°C. Após o resfriamento, foram adicionados os óleos essenciais que foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados ao meio de cultura nas concentrações previamente preparadas de 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20 mg.mL⁻¹ respectivamente, e as substâncias puras preparadas na concentração de 0,20 mg.mL⁻¹. Após verter o meio de cultura nas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, fragmentos com estruturas propagativas do fungo (diâmetro = 5 mm) foram repicados para o centro das placas em capela de fluxo laminar. As placas foram lacradas com filme plástico e incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 h (luz do dia) e temperatura de 25 ± 1 °C, durante 7 dias.

Para cada tratamento utilizou-se 4 repetições e foram feitos 3 controles, um positivo (BDA puro), um controle negativo (DMSO puro) e outro com antifúngico comercial de largo espectro, o Mancozeb®. Em todas as placas foi adicionado o antibiótico de largo espectro Gentamicina®. O desenvolvimento do micélio fúngico foi avaliado diariamente até o 7º dia, através das medições ortogonais do diâmetro das colônias, baseado na referência do desenvolvimento das placas controles contendo apenas os fungos se desenvolvendo no meio

de cultura BDA sem adição dos óleos essenciais. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de médias.

3.4 Efeito de diferentes fontes e doses de nitrogênio (50 ou 100 Kg ha⁻¹ NO₃⁻, NH₄⁺ ou NH₄NO₃) na Biomassa, no rendimento e no perfil do óleo essencial, no metabolismo de N, na expressão gênica e na anatomia foliar da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e Maria Bonita

3.4.1 Material vegetal e condução do experimento

As plantas de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* (Figura 37) e a cultivar Maria Bonita (Figura 38) foram cultivadas em casa de vegetação no Depto. Química, UFRRJ em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições fornecendo duas doses e três fontes de N e uma coleta.



Figura 37. Plantas da variedade *Sweet Italian Large Leaf*. Cultivadas em casa de vegetação no DEQUIM sob diferentes fontes e níveis de nitrogênio. À direita destaque para a inflorescência de cor branca.



Figura 38. Plantas de manjeriço cultivar Maria Bonita. Cultivada em casa de vegetação no DEQUIM sob diferentes fontes e níveis de nitrogênio, a figura abaixo ilustra os detalhes da inflorescência roxa

Foram semeadas cinco sementes de cada espécie por vaso, procedendo-se o desbaste vinte dias após a emergência, deixando-se duas plantas por vaso da cultivar Maria Bonita e três plantas por vaso da variedade *Sweet Italian Large Leaf*, uniformes e equidistantes. As unidades experimentais foram constituídas por vasos com capacidade de 20,7 dm³, preenchidos com amostras de solo, provenientes da camada de 0-20 cm de profundidade, previamente peneiradas em malha de 2 mm para separações de torrões, raízes e palhas. Aos

30 dias após a germinação aproximadamente, foram aplicados os tratamentos com as fontes e doses de N a seguir na Tabela 3.

Tabela 3. Cultivo em casa de vegetação da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e da cultivar Maria Bonita sob dois níveis de N (50 ou 100Kg N.ha⁻¹) e três fontes diferenciadas (NO₃⁻, NH₄NO₃ e NH₄⁺).

Variedades de Manjeriço	Fonte de N		
	NO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺
<i>Sweet Italian Large Leaf</i>	50 ou 100Kg N.ha ⁻¹		
Maria Bonita			

3.4.2 Coleta das plantas para análises

Foi realizada uma coleta da parte aérea e das raízes das plantas quando estas apresentaram inflorescências (aos 30 dias após o início dos tratamentos), sendo essas coletas realizadas no período da manhã e o corte feito rente ao solo. Em seguida, as folhas e os caules e raízes foram separados e pesados, para a avaliação da biomassa fresca e seca e posterior análise das frações solúveis, extração do óleo essencial e testes de atividade biológica, anatomia das glândulas secretoras de óleo essencial e estudo da expressão genica.

3.4.3 Determinações analíticas no extrato alcoólico

Extração com etanol 80% e partição com clorofórmio do material fresco
Foi efetuada de acordo com o item 3.1.5

3.4.4 Digestão e análises em material seco

A análise do material seco foi efetuada de acordo com o item 3.1.6 para as amostras de folha, caule e raiz.

3.4.5 Extração do óleo essencial e análise do perfil químico

No momento da coleta amostras de folhas frescas na época do florescimento foram pesadas e levadas para estufa para secagem durante 5 dias a 40° C. Após esse período o óleo essencial foi obtido por arraste a vapor de água utilizando o aparelho de Clevenger, com modificações para adaptar o reservatório do material vegetal. O tempo de arraste foi de 30 minutos após o início da condensação procedendo-se conforme o item 3.1.7.

O óleo obtido foi pesado e armazenado em frascos âmbar a -30°C para posterior análise do perfil químico por cromatografia gasosa e injetados em CG-FID e em cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (CG-MS) QP2010 Plus (Shimadzu), Coluna VF-5m (30mmx 0,25mmx 0,25µm) nas mesmas condições experimentais do item 3.1.8 anterior. Os constituintes foram submetidos a identificação por comparação com os padrões, com as bibliotecas espectrais do aparelho (NIST), por comparação do tempo de

retenção com os padrões injetados e através da análise do espectro de massa da literatura (ADAMS, 2001).

Após a caracterização do óleo essencial da cv Maria Bonita, alíquotas foram pesadas e diluídas para testes de atividade antifúngica.

3.5 Determinação da atividade antifúngica do óleo essencial de manjeriço cultivar Maria Bonita e análise ultraestrutural

3.5.1 Avaliação da atividade antifúngica em *Candida spp* e *Geothricum spp*

A avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de manjeriço cultivar Maria Bonita foi feita no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Laboratório de Leveduras patogênicas e Ambientais.

Os seguintes fungos foram testados: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *Geothricum spp*. O óleo essencial foi diluído em DMSO para o preparo das concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg.mL⁻¹ respectivamente. O linalol e o antifúngico cicloexmida foram preparados na concentração de 300 mg.mL⁻¹.

O meio BDA foi previamente preparado e autoclavado por 20 minutos a 120°C. Após o resfriamento, o meio foi vertido em Placas de Petri 9 cm de diâmetro e, com o meio solidificado, os referidos micro-organismos foram inoculados (10⁶ UFC/mL). Discos de papel de filtro (5mm de diâmetro) previamente esterilizados por autoclavação, colocados sobre o meio de cultura sólido, foram impregnados com 15 uL do óleo essencial previamente preparado nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg.mL⁻¹, 15 uL de linalol e do antifúngico cicloheximida ambos na concentração de 300 mg.mL⁻¹ e para o controle negativo 15 uL de DMSO no disco. As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 37 °C durante 48 horas. Com o desenvolvimento de halos de inibição, procedeu-se à medida dos mesmos em cm, 48 horas após a incubação, comparando-os com o controle. Para cada tratamento utilizou-se 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de médias.

3.5.2 Avaliação da atividade antifúngica em *Sacharomyces cerevisiae*

A avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial da cultivar Maria Bonita foi feita em *S. cerevisiae* no Departamento de Química, Laboratório de Bioquímica.

Procedimento para viabilidade celular: A cepa sintética de *S. cerevisiae* utilizada foi produzida por Euroscarf, em Frankfurt, na Alemanha; e o seu genótipo é MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0. Antes do experimento a cepa foi estocada em meio YPD 2% sólido (2% de glicose, 2% de peptona, 1% de extrato de levedo e 2% de ágar) (SHERMAN e col., 1979), e mantida sob refrigeração. Por um período de 24 horas antes de cada experimento, foram preparados repiques frescos em meio YPD 2% sólido a partir do repique já existente. As células foram inoculadas em erlenmeyers contendo 20% do seu volume de meio YPD 2% líquido (sem ágar). Após o inóculo, as culturas foram incubadas a 28°C em agitador rotatório ajustado para 160 rpm e as células coletadas na fase exponencial de crescimento (cerca de 1,0 mg de peso seco/mL de meio = 10⁶ células/mL).

Uma alíquota da suspensão celular foi transferida para um eppendorf e diluições sucessivas com água destilada estéril são realizadas; contando-se as células em câmara de Neubauer ao final desse processo. Para se determinar a sobrevivência celular coletou-se 300 µL da suspensão celular e adicionou-se 300 µL de azul de metileno 0,4% em água; e a

percentagem de células vivas é calculada mediante a contagem de células brancas (não-coradas e vivas) e azuis (coradas e mortas).

Após a contagem de células viáveis, adicionou-se alíquotas de 500 μL do extrato do óleo essencial diluído em DMSO nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ às suspensões celulares. Outro erlenmeyer recebeu 500 μL de linalol na concentração de 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e outro erlenmeyer continha apenas as células de levedura (controle), totalizando 7 erlenmeyers. Todos os erlenmeyers foram mantidos por 6 horas em agitador rotatório (160rpm/28 °C). A Figura 39 mostra a incubação com 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de manjerição (cultivar Maria Bonita) e 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de linalol juntamente com um controle positivo somente com as células de levedura *S.cerevisiae*.



Figura 39. Fotografia do experimento com cultivo de células de *Sacharomyces cerevisiae*. Nos erlenmeyers contém 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de manjerição cultivar Maria Bonita, 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de linalol e controle positivo feito somente com *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPD 2%.

Após o período de 6 horas, novas alíquotas foram retiradas, contadas em câmara de Neubauer e a percentagem do número de células vivas e mortas calculadas como anteriormente. Após, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio rico YPD 2%, com o objetivo de verificar o número de células viáveis comparadas com os resultados observados obtidos na contagem com azul de metileno. As placas permaneceram por 24 horas em estufa B.O.D. a 30°C.

3.5.3 Avaliação da atividade antifúngica em *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*

Foi efetuada de acordo com o item 3.3

O óleo essencial foi diluído em DMSO e adicionados ao meio de cultura nas concentrações previamente preparadas de 0,5, 1, 2, 4 e 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente, e o linalol preparado na concentração de 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.6 Análise ultraestrutural dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida* spp e *Geothricum* spp

A observação das características morfológicas dos fungos foi feita através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), (Figura 40) na plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth. O preparo do material foi realizado no Laboratório de Transmissores de Leishmaniose da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz).



Figura 40. Preparo do material para visualização em microscopia eletrônica de varredura. A: Pós-fixação e lavagem em série alcóolica, B: Colocação do material em suporte metálico fechado, C: material submetido ao ponto crítico, D: montagem do material em suporte metálico, E: metalização do material, F: observação no MEV

Fragmentos de amostras dos fungos tratados com o óleo essencial da cultivar Maria Bonita e com o linalol, foram pré-fixados por uma hora em glutaraldeído 2.5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 a 7,4, lavados três vezes no mesmo tampão e pós fixados por uma hora em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e após a lavagem no mesmo tampão o material foi desidratado em uma série de concentrações crescentes de etanol e submetidas ao método de secagem de ponto crítico usando CO₂. Em seguida, o material foi montado em suportes metálicos para ser observado em microscópio eletrônico de varredura Jeol 6310. Para visualizar as estruturas o material foi micrografado em ampliações de 300-15000 vezes na posição dorsal. As medições foram realizadas diretamente sobre as imagens obtidas com a ajuda do software de gravação de imagem digital lenta no sistema de análise de varredura, versão 3.1.

3.6.1 Expressão dos genes que codificam enzimas das vias dos terpenos e fenilpropanóides na variedade Sweet Italian Large Leaf e na cultivar Maria Bonita por PCR em tempo real

3.6.2 Extração do RNA total

Foram separadas no momento da coleta amostras de 10 g de folha de cada espécie congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até o momento da extração do RNA para a avaliação da expressão dos genes da 3-hidroxi metil glutaril Coenzima A redutase (HMGR), 1-deoxi-xilulose-5-fosfato sintase (DXS), Linalol sintase (LIS), fenil alanina amônia liase (PAL) e Eugenol sintase (EGS). Todos os materiais microtubos e ponteiros utilizados foram novos e livres de RNases.

O RNA total das folhas de *Ocimum basilicum*, variedade *Sweet Italian Large Leaf* e da cultivar Maria Bonita foi extraído de acordo com o Kit de extração de RNA “RNeasy Plant Mini kit- QIAGEN” baseado nas instruções do manual de procedimentos, todo o processo foi realizado a temperatura ambiente. As amostras de RNA total foram tratadas com o Kit “DNase I Amplification grade”, da empresa Sigma, visando a degeneração das moléculas de DNA presentes na amostra. Para cada 1 µg de RNA total tratado foi empregado 0,5 µL de tampão de reação (10x), 0,5 µL da enzima DNase I (1U/µL) e água para o volume total de 10 µL de reação. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador a 25 °C, durante 15 minutos, e, posteriormente, 0,5 µL de solução *stop solution*. Logo após, as amostras foram colocadas no termociclador a 70 °C, durante 10 minutos, para a inativação da DNase.

3.6.3 Síntese de cDNA fita simples (ss cDNA)

A síntese de cDNA fita simples foi feita a partir das amostras de RNA total que foram previamente tratadas e quantificadas. Para este procedimento foi utilizado o kit de síntese de cDNA da Applied Biosystems “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits”. Foram utilizados as seguintes quantidades: 1 µL de RT buffer (10x), 0,4 µL de dNTPs mix (100 mM), 1 µL de “Random primers”(10x), 0,5 µL da enzima MultiScribe™ transcriptase reversa, H₂O DEPC suficiente para 1,6 µL e RNA tratado com DNase 250 ng/µL, total de 10 µL/reação. A reação foi realizada em termociclador: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos, 85 °C durante 5 minutos e 4°C ∞.

3.6.4 Construção dos iniciadores

As seqüências dos RNAs mensageiros da linalol sintase (acesso AY693647) e da eugenol sintase (acesso DQ372812) de manjeriço foram obtidas no banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após esse processo, foram construídos os iniciadores (primers) específicos para as seqüências dos RNAs mensageiros pesquisados para o manjeriço com o auxílio do programa Primer Express® 3.0 da Applied Biosystems.

Os iniciadores degenerados da PAL (Tabela 4) foram desenhados pelo alinhamento das isoformas de *Perilla*, *Salvia*, *Escutellaria*, *Populus* e *Nicotiana*. Os iniciadores da HMGR foram desenhados pelo alinhamento das isoformas de *Salvia* e *Panax* e para a DXS foram utilizadas as isoformas de *Salvia*, *Nicotiana* e *menta*, um segmento conservado de pares de bases foi encontrado em concordância entre as espécies e após isso foi desenhado os

iniciadores que foram analisados pelo programa Oligo Analyser (software de uso livre, <http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware/>).

Em seguida as seqüências dos iniciadores construídos foram enviadas para síntese pela empresa Life Technologies. Para cada gene da HMGR, DXS, Linalol sintase, PAL e Eugenol sintase, foram desenhados dois iniciadores: “*forward e reverse*”.

Foram utilizados três genes de referencia: actina, o fator de alongamento (EF) e o da ubiquitina de manjeriçao, este último fornecido pela professora Yoko Iijima da Universidade do Arizona. Os iniciadores para actina foram desenhados pelo alinhamento das isoformas Salvia, Escutelaria, Agastache e Nicotiana. Para o EF usou-se o alinhamento das isoformas de Nicotiana, soja e orégano. A especificidade dos iniciadores foi testada experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a curva de dissociação.

Tabela 4. Sequências dos iniciadores (“forward e reverse”) usados nas reações de PCR em tempo real para os genes que codificam as enzimas HMGR, PAL, LIS, EGS e DXS relacionadas ao metabolismo do óleo essencial de manjeriçao e genes de referencia actina, fator de alongamento e ubiquitina.

Gene	Sequencia dos Iniciadores-primers Forward / reverse
*Actina	F:5’-(G/A)ATGAC(G/T)CA(G/A)ATCATGTTTGAGA-3’ R:5’-AG(T/A/G)GAGAGAAC(G/A/C)GCCTG(G/A)A-3’
*EF	F:5’-CCAAGAGGCC(G/C)(T/A)C(A/T)GAC(A/G)A-3’ R:5’-ACAGT(A/T)CC(A/G)AT(A/T)CC(T/A)CCAATCT-3’
*Ubiquitina	F ₁ :5’- AAGAT(C/T)CA(G/A)GACAAGGA(G/A)GG(T/C/A)AT-3’ R ₁ :5’- C(A/G)AGCTGCTTCCC(G/A)GC(G/A)A-3’ F ₂ :5’- (A/G/C)AA(A/G)GC(T/C)AAGAT(C/T)CA(G/A)GACAAGGA-3’
*Ubiquitina manjeriçao	F:5’- AACCAGACGCAACAAACCATAA-3’ R:5’- TCTTCCGAGTTGCTGTTCTCTGT-3’
HMGR	F ₁ :5’-CTGTCCGAGG(A/T)GGAAC(T/G)CAACT-3’ R ₁ :5’-G(G/A)GA(T/C)TCTTTGTTTGC(G/A)CCCTT(C/T)AC-3’ F ₂ :5’- CTGTCCGAGG(A/T)GGAAC(T/G)CAACT-3’ R ₂ :5’- G(G/A)GA(T/C)TCTTTGTTTGC(G/A)CCCTT(C/T)AC-3’ F ₁ :5’- (A/C)GAGC(G/A)GC(G/A)ATGCT(G/T)GT-3’
PAL	R:5’-CTTCCA(A/T/G)GAT(C/T)TC(A/G)AATCTGATG-3’ F ₂ :5’- (A/C)GAGC(G/A)GC(G/A)ATGCT(G/T)GT-3’
LIS	F:5’-ACCTATGGCAAATGGACGAA-3’ R:5’-CGGGTAGACCCTCCATTGCT-3’
EGS	F:5’-GGGTCGAGGAGGACAGAATAAA-3’ R:5’-TCTTCTGATCATCCTTCTCTCTAT-3’
DXS	F:5’-GA(T/C)GG(C/T)CC(G/C)AC(A/C/G)CA(T/C)TG(T/C)G-3’ R:5’-GGAGCCAT(G/T/C)AC(T/C)ACCATGTT-3’

HMGR: 3-hidroxi metil glutaril Coenzima A redutase; DXS: 1-deoxi-xilulose-5-fosfato sintase; LIS: Linalol sintase, PAL: fenil alanina amônia liase e EGS: Eugenol sintase.

3.6.5 Reação de PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica foi feita usando o sistema da Applied Biosystems com o aparelho “Step One” (StepOne™ Real-Time PCR Systems). A reação foi feita usando o Kit “SYBR® Green Real Time PCR Master Mixes” (Life Technologies), iniciadores na concentração final de 0,9 µM e amostra de cDNA na proporção 1:3 do volume final. A reação de PCR foi feita usando a seguinte programação: 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min (anelamento, extensão e leitura da fluorescência). Os cálculos de expressão foram feitos de acordo com LIVAK e SCHMITTGEN (2001) usando o tratamento sem suprimento de nitrogênio como controle, a partir dos valores de CT (“*Cycle Threshold*”, ciclo limite) obtidos na reação de PCR em tempo real.

3.6.6 Anatomia das folhas de Manjeriço da variedade Sweet Italian Large Leaf e cv Maria Bonita cultivadas em diferentes fontes e doses de Nitrogênio

As análises anatômicas e histoquímicas foram realizadas no laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biologia da UFRRJ. As folhas expandidas do terceiro e quarto nó do manjeriço foram retiradas e armazenadas em etanol 70%. Para estudo anatômico em microscopia de luz, o material foi fixado em solução composta por formaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,2 (Gahan, 1984), desidratados em série etanólica e emblocados em HistoResin® (Leica). As secções transversais (3–10 µm) foram obtidas com navalha de vidro em micrótomos rotativos Leica 2255, foram coradas com Azul de Toluidina (Feder & O'Brien, 1968). A análise do material foi realizada em microscópio ótico Olympus BX-51 com sistema de captura composto por câmera Q color 5 e software Image-Pro Express. Para identificar as diferentes classes de compostos químicos as amostras foram tratadas com Sudan IV (Johansen 1940) para detecção de lipídeos em geral e com dicromato de potássio 10% (Gabe 1968) para compostos fenólicos. As imagens foram editadas no software Corel Photo-Paint ® 13 e as pranchas montadas utilizando o Corel DRAW® 13.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de doses de Nitrato (50 e 300 Kg N.ha⁻¹) no Metabolismo de Nitrogênio, na Produção de Biomassa, no Rendimento e perfil de Óleo Essencial de Manjeriço, variedade *Sweet Italian Large Leaf*

4.1.1 Atividade da nitrato redutase, frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Não houve diferenças significativas na atividade da enzima nitrato redutase (ANR) nas folhas e no caule das plantas de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* cultivadas com 50 e 300 Kg .ha⁻¹ N-NO₃⁻ (Figura 41).

Na época do florescimento, quando foi feita a coleta do experimento, observou-se que as plantas de manjeriço mantiveram a ANR, independente do nível do aumento do fornecimento de N. Em estudos com *brassicaceae* verificou-se maior ANR nas folhas (BRITO *et al.*, 2013), isso indica que o sítio preferencial de redução da nitrato redutase pode variar de acordo com a espécie e as condições ambientais portanto, algumas espécies podem reduzir o nitrato na folha (BUSSI *et al.*, 1997), e outras espécies podem fazê-lo no caule ou na raiz (SIVASANKAR *et al.*, 1997).

A Atividade da nitrato redutase (ANR) em plantas é dependente do seu substrato, o nitrato exógeno, com indícios de que baixos níveis de nitrato já são suficientes para induzir a ANR (CARDENAS-NAVARRO *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2004; CRAWFORD, 1995; SOLOMONSON; BARBER, 1990), de forma a se obter efeito positivo na ANR quando se utiliza menor aporte de N- NO₃⁻, e quando se eleva o aporte atinge-se um platô ou até mesmo uma diminuição na ANR (BRITO *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2009).

Os dados de Brito *et al.* (2013) e Sun *et al.* (2009), explicam os resultados encontrados neste trabalho, pois quando foi ofertado 300 Kg N.ha⁻¹, não se detectou aumento na ANR. O NO₃⁻ absorvido pela raiz pode ter vários destinos, pode ser enviado para a parte aérea e ser assimilado até NH₄⁺ para síntese de aminoácidos, ou pode ser estocado no vacúolo (FERNANDES; SOUZA, 2006; WANG *et al.*, 2012). Quando se aplicou 300 Kg N.ha⁻¹ o excesso de NO₃⁻ do citosol pode ter migrado para o vacúolo servindo como fonte de reserva no *pool* de armazenamento e, portanto não disponível para a reação da NR se acumulando nos tecidos, que está de acordo com os resultados observados na Figura 41 A.

As plantas que receberam 300 Kg N.ha⁻¹ de N-NO₃⁻, apresentaram maior teor de N-NO₃⁻ no caule e nas folhas, demonstrando que as plantas de manjeriço tem a capacidade de absorver e acumular o nitrato adicionado em excesso, evidenciando um consumo de luxo deste nutriente. Resultados semelhantes foram encontrados por Chen *et al.* (2004) e Li *et al.* (2011), que observaram que a concentração de nitrato foi aumentada nas plantas, à medida que se elevava o fornecimento do íon. Segundo Crawford; Glass (1998), o N-NO₃⁻ absorvido em excesso pela planta pode ser estocado no vacúolo, servindo como fonte de N mineral quando o fornecimento pelo solo torna-se limitante.

Verificou-se que o teor de N-NH₄⁺ foi significativamente maior e influenciado pela maior oferta de nitrato, comportamento semelhante foi verificado por Marques *et al.* (2009) em variedades de arroz. Assim, os processos de absorção do NO₃⁻ através da membrana plasmática, e sua redução, catalisada pela enzima nitrato redutase foram cruciais para este evento, pois o NO₂⁻ produzido através da ação da NR é muito tóxico para a planta e, necessita ser reduzido rapidamente pela NiR até amônio para ser assimilado em esqueletos de carbono e formar os aminoácidos para as plantas.

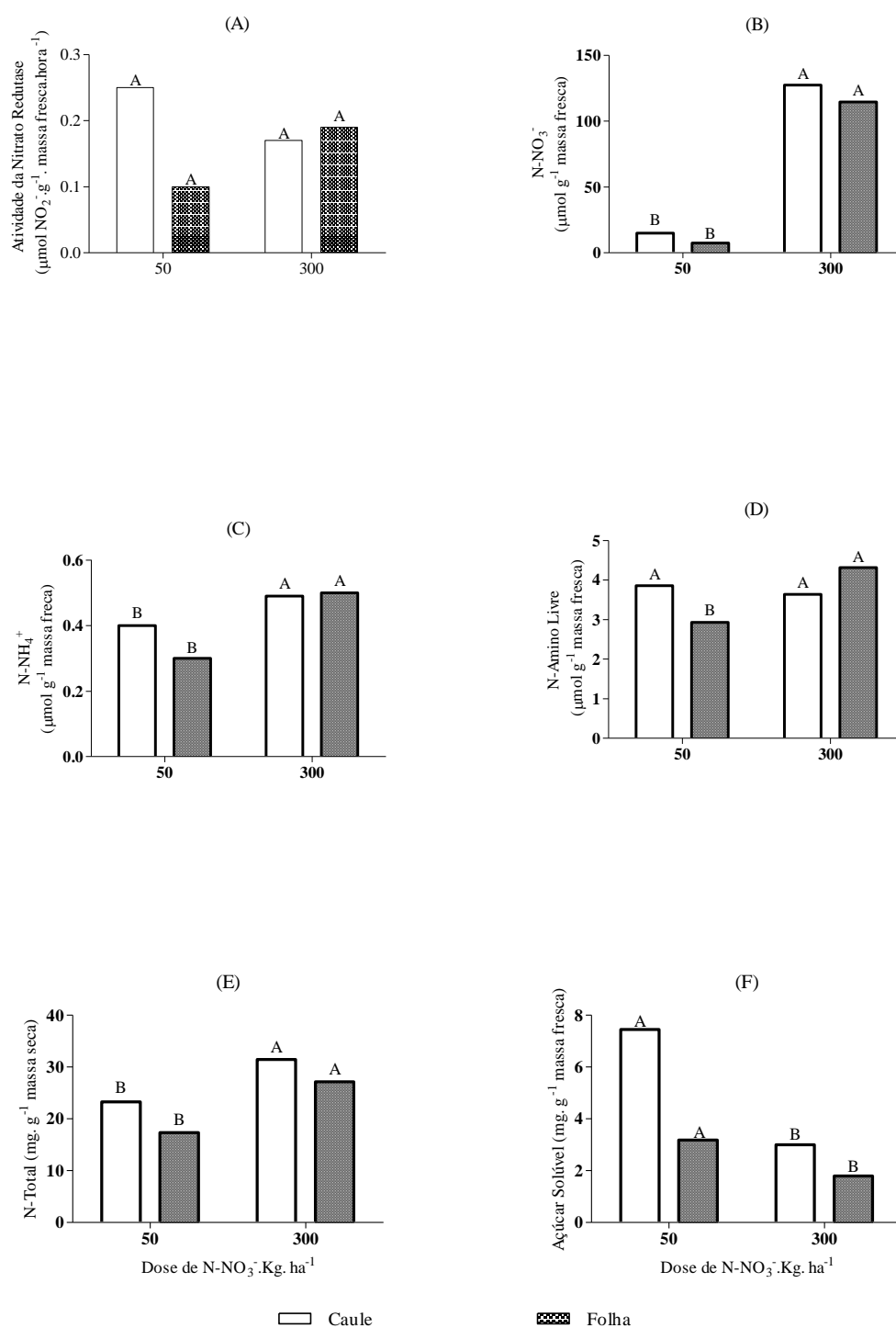


Figura 41. A) Atividade da enzima nitrato redutase, teores de B) N- NO₃⁻, C) N-NH₄⁺, D) N-amino livre, E) N-total e F) açúcares solúveis nas folhas e no caule das plantas de manjericão em função do suprimento com 50 e 300 Kg N. ha⁻¹.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula para cada tratamento não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$)

O teor de N-amino (Figura 41 D) também foi influenciado pelo fornecimento de N, e foi maior nas folhas com o tratamento de 300 Kg N.ha⁻¹. Os aminoácidos são os primeiros produtos estáveis formados a partir da assimilação de N, de acordo com Atilio; Causin (1996)

a oferta crescente de N levou a um aumento no teor de N-amino livre, e esse teor foi correlacionado ao teor de açúcares, apresentando consequente diminuição nos níveis de açúcares solúveis em plantas de arroz (SOUZA *et al.*, 1999). Essa afirmativa foi confirmada posteriormente também em estudos com *Arabidopsis* que foram submetidas a limitação de nitrogênio, no qual foi observado diminuição nos aminoácidos livres na parte aérea e aumento nos teores de açúcares (IKRAM; BEDU, 2012).

Com o aumento no suprimento de N, houve diminuição nos níveis de açúcares solúveis (Figura 41 F) no caule e na folha de manjeriço, apresentando comportamento semelhante ao observado por Santos *et al.* (2003) e Souza *et al.* (1999). Já quando foi fornecido menor aporte de nitrato, ocorreu aumento no conteúdo de açúcares solúveis no caule e nas folhas. Segundo Souza (1995) o teor de açúcares solúveis nos tecidos vegetais são indicadores de energia prontamente disponível para o metabolismo celular, além de ser fonte de reserva para as plantas. E pode ser uma importante estratégia da planta para garantir a disponibilidade de assimilados para a via do mevalonato, a via metil eritrol fosfato e chiquimato para a formação dos metabólitos secundários (MATT *et al.*, 2002).

O maior teor de N-total foi obtido com o aumento da oferta de nitrato (Figura 41 E). De forma geral quando os dois tratamentos (50 e 300 Kg N. ha⁻¹ de N-NO₃⁻), foram comparados observou-se que houve maior teor de N (N-total, N- NO₃⁻, N-NH₄⁺ e N-amino) com o fornecimento de 300 Kg N.ha⁻¹. Dessa forma, para a produção de plantas de manjeriço deve ser considerado o destino final dessa cultura. Se as plantas forem destinadas à produção de medicamento na medicina popular ou condimentos, é importante salientar que a utilização excessiva de NO₃⁻ pode oferecer risco à saúde humana, devido ao acumulado do íon nos vacúolos, o que pode gerar toxidez. Ao passo que, baixos suprimentos de NO₃⁻ são mais seguros, econômicos e eficazes para a produção de medicamentos ou condimentos a partir de plantas medicinais e tem menor impacto sobre o meio ambiente.

4.1.2 *Biomassa, rendimento e perfil do óleo essencial de manjeriço, variedade Sweet Italian large Leaf em função do fornecimento de 50 e 300 Kg.ha⁻¹ de nitrato*

4.1.3 *Biomassa*

Houve aumento na massa fresca e seca das folhas do manjeriço com o aumento do nível de N (Tabela 5). O mesmo comportamento foi observado por Hussein *et al.* (2006) e Azizi *et al.* (2009) que também observaram que plantas de orégano são altamente exigentes em nitrogênio para produção de biomassa seca.

Tabela 5. Massa fresca e massa seca de folha e caule (g planta⁻¹) de manjeriço variedade *Sweet Italian large Leaf* em função do suprimento com 50 e 300 Kg.ha⁻¹ de nitrato

Doses de Nitrato (Kg ha ⁻¹)	Massa (g planta ⁻¹)			
	Fresca de folha	Seca de folha	Fresca de Caule	Seca de Caule
50	23,00 b	3,20 b	21,24 b	3,63 b
300	26,30a	3,70 a (+15,6%)	26,22 b (+23,4%)	3,87 b (+6,6%)

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05)

Na Tabela 5 pode ser observado que embora a planta tenha apresentado maior biomassa, o aumento em cinco vezes na oferta de nitrato, se refletiu em acréscimo de apenas aproximadamente 15% na massa de folha. Portanto, torna-se favorável o uso de menor suprimento de N, para a produção de manjeriço, possibilitando assim reduzir os custos com a nutrição mineral de plantas, além de minimizar a contaminação dos solos e do lençol freático.

4.1.4 Rendimento

O rendimento de óleo essencial do manjeriço (Figura 42) foi influenciado pelo fornecimento de N. Houve redução de 1,14% para 0,64% no rendimento do óleo para as plantas que receberam 50 e 300 Kg de N.ha⁻¹, respectivamente. Foi verificada uma correlação negativa ($r = -0,74$) entre o aumento do fornecimento de nitrato e o rendimento do óleo essencial, demonstrando que a quantidade de N fornecida afetou de forma significativa o rendimento de óleo, resultados semelhantes também foram observados por Azizi et al.(2009) Vieira; Simon (2000) e Zeljazkov (2008).

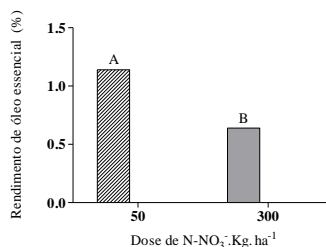


Figura 42. Rendimento de óleo essencial (%)

Calculado a partir extração do óleo das folhas frescas de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* coletadas no florescimento em função do fornecimento de 50 e 300 Kg.ha⁻¹ de nitrato

Diferenças no rendimento de óleo essencial entre este e outros estudos foram encontrados variando de 0,10 a 1,5% (VERMA *et al.*, 2013; VIEIRA; SIMON, 2000; ZHELJAZKOV; CALLAHAN; *et al.*, 2008) isto porque o rendimento de óleo é uma característica que depende da espécie cultivada (LACHOWICZ *et al.*, 1996), das condições ambientais como o clima (SANGWAN *et al.*, 2001) e de fatores nutricionais (SHARAFZADEH; ALIZADEH, 2011) como a fonte de nutriente e a quantidade fornecida. Plantas de orégano em condições de campo supridas com nitrato de amônio tiveram concentração de óleo nas folhas variando 0,63 e 1,03% para 3,75 e 4,25 % dependendo da estação do ano (KARAMANOS; SOTIROPOULOU, 2013).

4.1.5 Perfil do óleo essencial de manjeriço

4.1.5.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

Para a completa identificação estrutural das substâncias majoritárias dos óleos essenciais dos oriundos dos dois tratamentos, esses óleos essenciais foram submetidos a análise por RMN ¹H (Figura 43 e Figura 44). Pelos valores dos deslocamentos químicos das substâncias ao observar os espectros notou-se a presença de dois componentes principais no óleo, e verificou-se que o eugenol está presente em maior quantidade em relação ao linalol, para ambos os tratamentos, caracterizando essa variedade como quimiotipo eugenol/linalol. A aplicação das duas doses de N-NO³⁻ nos tratamentos alterou a proporção de eugenol e linalol. Em função do aumento da dose (300 Kg de N-NO³⁻ ha⁻¹) houve um incremento de eugenol e redução de linalol na planta.

Formula C ₂₀ H ₃₀ O ₃		FW 318.4504 (164.2011+154.2493)		12/03/2012 10:25:48	
Acquisition Time (sec) 1.5860		Comment AMOSTRA: T1R1 (500 MHz) 1H SOLVENTE:CDCl3 OPERADOR:Cleber		AMOSTRA: T1R1 (500 MHz) 1H SOLVENTE:CDCl3 OPERADOR:Cleber	
Date 30 Dec 2011 22:25:20		Date Stamp 30 Dec 2011 22:25:20	Frequency (MHz) 500.13	Nucleus 1H	
File Name E:\Meus documentos\Sil\Doutorado\RMN\T1R1\1\pdata\1\1r		Origin spect	Original Points Count 16384	Owner Administrator	
Number of Transients 8		Pulse Sequence zg	Receiver Gain 14.20	SW(cyclical) (Hz) 10330.58	
Points Count 65536			Spectrum Offset (Hz) 3074.8127	Spectrum Type STANDARD	
Solvent CHLOROFORM-d		Temperature (degree C) 21.160			
Sweep Width (Hz) 10330.42					

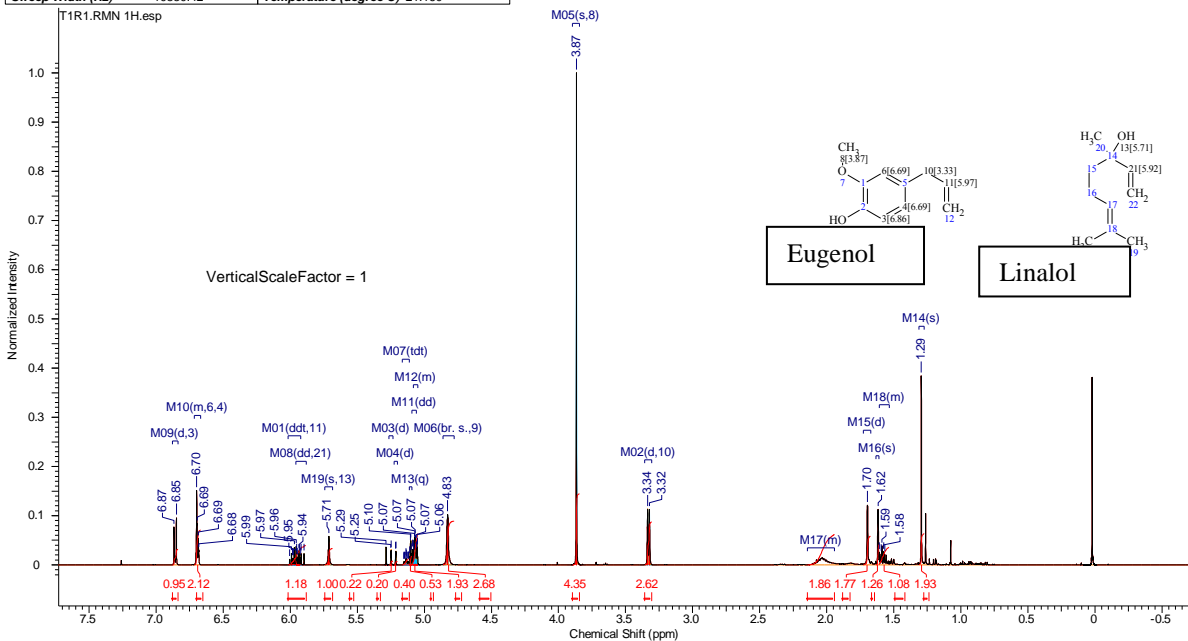


Figura 43. Espectro de RMN ¹H do óleo essencial manjeriçao variedade *Sweet Italian Large Leaf* em clorofórmio deuterado (CDCl₃) do tratamento com 50 kg N.ha⁻¹

22/09/2012 20:01:33

Formula C ₂₀ H ₃₀ O ₃		FW 318.4504 (164.2011+154.2493)		22/09/2012 20:01:33	
Acquisition Time (sec) 1.5860		Comment AMOSTRA: T2R1 (500 MHz) 1H SOLVENTE:CDCl3 OPERADOR:Cleber			
Date 31 Dec 2011 14:23:12		Date Stamp 31 Dec 2011 14:23:12	Frequency (MHz) 500.13		
File Name \SILVANA-PC\Users\Silvana\Documents\Sil\Doutorado\RMN\T2R1\1\pdata\1\1r		Origin spect	Original Points Count 16384	Receiver Gain 11.30	
Nucleus 1H		Pulse Sequence zg	Spectrum Offset (Hz) 3074.8127	Spectrum Type STANDARD	
Owner Administrator		Points Count 65536			
SW(cyclical) (Hz) 10330.58		Solvent CHLOROFORM-d			
Sweep Width (Hz) 10330.42		Temperature (degree C) 22.160			

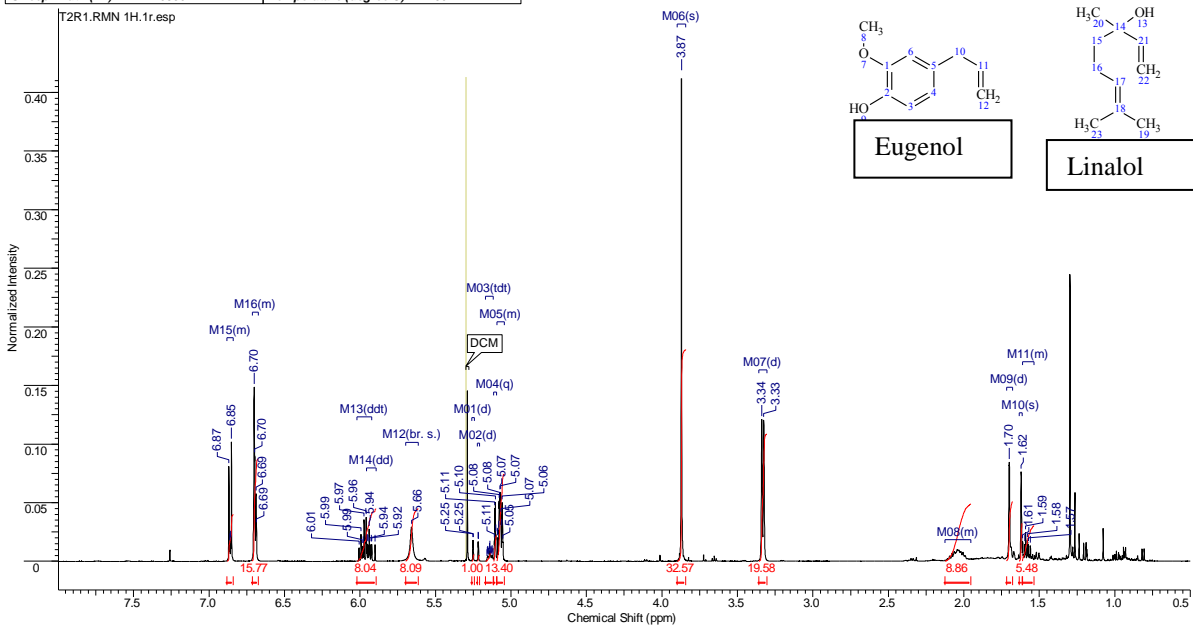



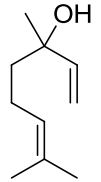
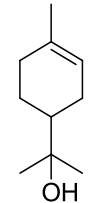
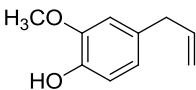
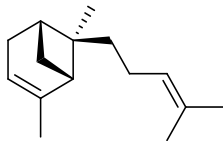
Figura 44. Espectro de RMN ¹H do óleo essencial Manjeriçao variedade *Sweet Italian Large Leaf* em clorofórmio deuterado (CDCl₃) do tratamento com 300 kg N.ha⁻¹

4.1.5.2 Análises de cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG-FID)

As análises de CG-FID identificaram quarenta e uma substâncias no óleo essencial das plantas de manjeriço cultivadas com 50 Kg N.ha⁻¹ e trinta e cinco substâncias no óleo essencial das plantas com 300 Kg N.ha⁻¹. Os tempos de retenção dos compostos estão ilustrados na Figura 45 e Figura 46 e os cromatogramas dos padrões de linalol e eugenol estão na Figura 47 e Figura 48.

O eugenol foi o produto majoritário identificado por CG-FID e espectroscopia de RMN ¹H, seguido do linalol, 1,8-cineol (eucaliptol), α-trans-Bergamoteno e α-Terpineol nos óleos analisados (Tabela 6). A abundância relativa do eugenol foi 57 e 68% e do linalol foi de 28 e 19% no óleo essencial das plantas cultivadas com 50 e 300 Kg N.ha⁻¹ respectivamente. Essas quantidades são semelhantes aos verificados na literatura, que apresentam aproximadamente 66% de eugenol e 28% de linalol (Zheljazkov et.al.,2008).

Tabela 6. Abundância relativa (%) dos principais compostos encontrados no óleo essencial de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* e Índices de Kovats calculados em função do suprimento com 50 e 300 Kg.ha⁻¹ de nitrato

Estrutura ^a	Compostos ^b	IK _{calc1}	IK _{calc2}	50Kg.ha ⁻¹ (%) ^c	300Kg.ha ⁻¹ (%) ^c
	1,8-Cineol	1032	1033	4,02	2,19
	Linalol	1103	1103	28,04	19,01
	α-Terpineol	1199	1200	0,56	0,61
	Eugenol	1362	1362	57,47	68,96
	α-trans-Bergamoteno	1435	1436	0,74	0,19

a e b= Estrutura e Compostos listados em ordem de eluição.

IK_{calc1} e IK_{calc2}= índice de Kovats calculados para os tratamentos com 50 e 300 Kg N.ha⁻¹ respectivamente

c= Percentagem das substâncias principais que compõe o óleo essencial nos tratamentos com o fornecimento de 50 e 300 Kg N.ha⁻¹ respectivamente.

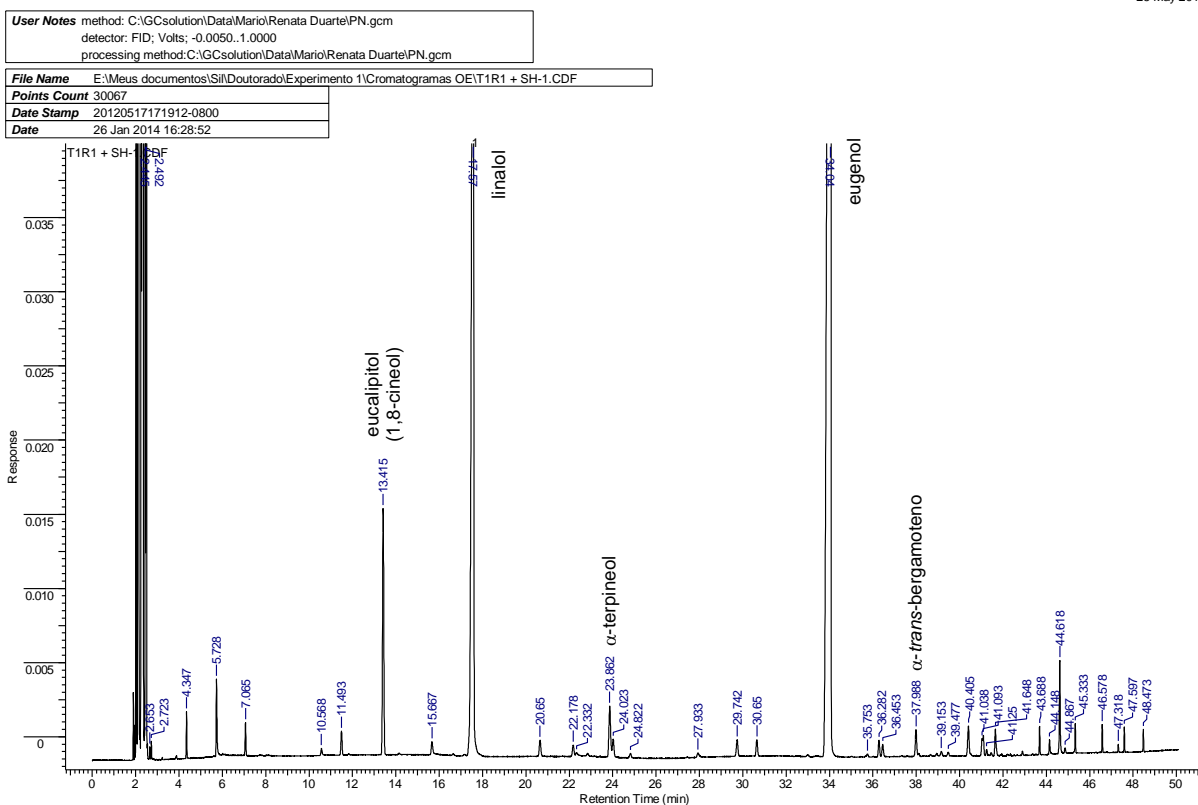


Figura 45. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha⁻¹ com a co-injeção dos padrões de alcanos

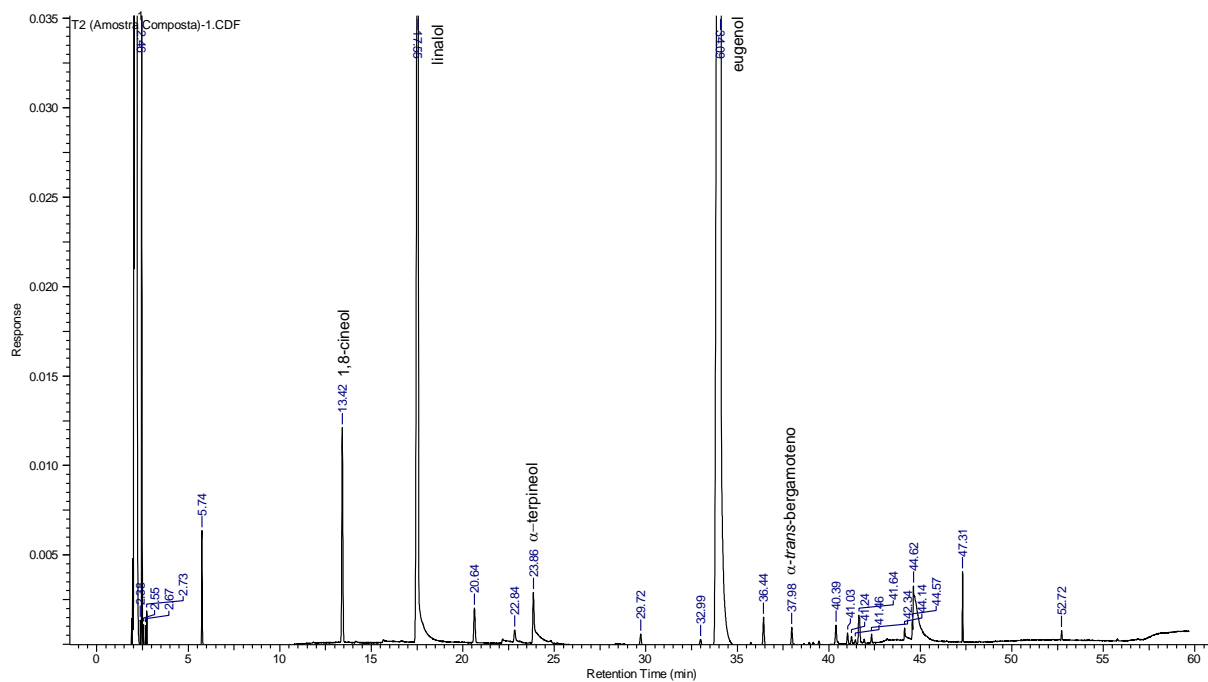


Figura 46. Análise cromatográfica por ionização por chama (CG-FID) dos componentes do óleo essencial variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 300 Kg N.ha⁻¹ com a co-injeção dos padrões de alcanos

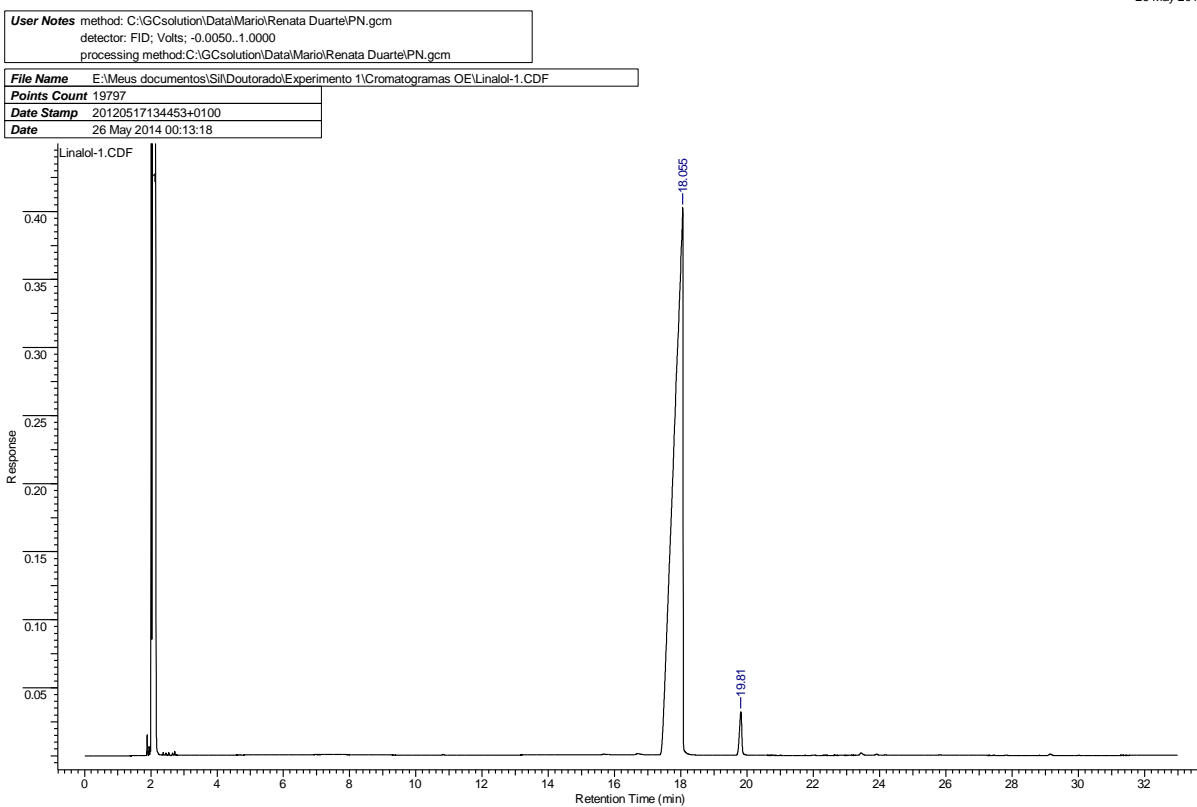


Figura 47. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de linalol (Sigma-Aldrich)

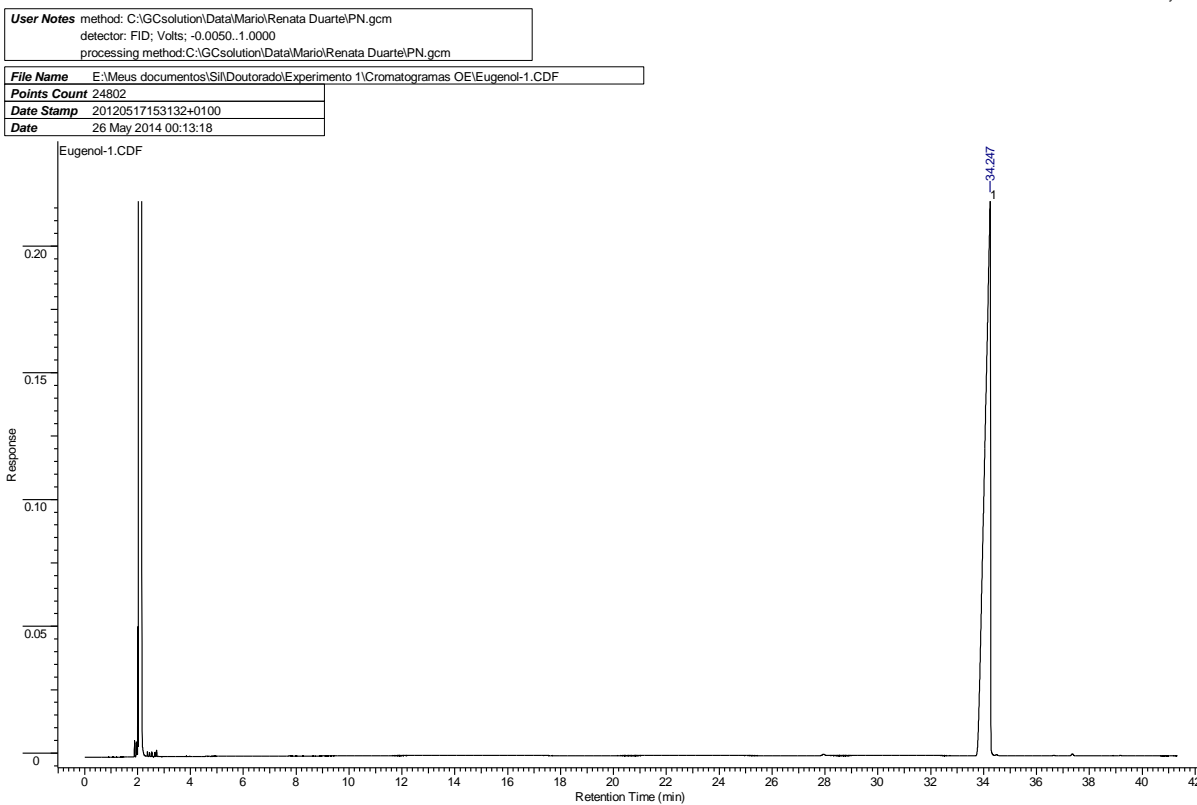


Figura 48. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich)

Com base na literatura (FATOPE *et al.*, 2008; LEWINSOHN *et al.*, 2000; SIFOLA; BARBIERI, 2006; VERMA *et al.*, 2013) e nos picos identificados por CG-FID, a predominância do eugenol presente no óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf*, permite caracterizá-la como quimiotipo eugenol/linalol.

O fornecimento de 50 Kg N.ha⁻¹ (Tabela 6), maximizou o rendimento de óleo essencial e a concentração dos compostos de interesse linalol, 1,8-cineol (eucaliptol) e α -trans-Bergamoteno. Karamanos; Sotiropoulou, (2013) obtiveram um efeito positivo sobre o conteúdo de linalol no óleo essencial de orégano utilizando 80 Kg N.ha⁻¹.

Quando as plantas foram cultivadas com 300Kg N.ha⁻¹ apresentaram aumento de 11% no eugenol e 0,05% de α -terpineol, de forma que não compensa encarecer o custo de produção para fornecer altos níveis de N para a produção de óleo essencial com alta concentração de eugenol. Dessa forma, o menor aporte nutricional se torna mais vantajoso para o maior rendimento de óleo essencial, e aumento do perfil de monoterpenos, garantindo uma abundância relativa alta de 57% de eugenol.

Visando a produção de óleo essencial de manjeriço, os resultados deste experimento com fornecimento de 50 e 300 Kg. N indicam que a menor dose nitrato seria a mais apropriada para a variedade estudada, visto os aumentos no rendimento de óleo e menor acúmulo de N nos tecidos das plantas, o que conseqüentemente minimiza os problemas ambientais gerados pelos resíduos de nitrato nas culturas e diminui os custos de produção.

4.2 Avaliação da Atividade Alelopática do Óleo Essencial de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* em Sementes de Alface (*Lactuca sativa*)

Resultados efetivos com 100% de inibição sobre a germinação das sementes de alface foram obtidos ao se aplicar 15 mg.mL^{-1} ($p < 0,05$) de óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e de eugenol (Tabela 7) ocasionando a morte das sementes.

Tabela 7. Número de sementes de alface germinadas, porcentagem de germinação e crescimento radicular sob o efeito dos tratamentos com 1,2 e 15 mg.mL^{-1} de óleo essencial de manjeriço, linalol e eugenol (15 mg.mL^{-1}) verificada no sétimo dia

Tratamentos	Sementes germinadas ¹	% Germinação ²	Comprimento Raiz (cm) ³
C (+) Água	48,00 a	96,50 a	3,66 a
C (-) Diclorometano	48,50 a	97,00 a	3,86 a
Óleo Essencial	1 mg.mL^{-1}	48,50 a	97,00 a
	2 mg.mL^{-1}	48,80 a	97,50 a
	15 mg.mL^{-1}	0,00 b	0,00 b
Linalol	15 mg.mL^{-1}	48,80 a	97,50 a
Eugenol	15 mg.mL^{-1}	0,00 b	0,00 b

1 número de sementes germinadas (valor médio); letras iguais na mesma coluna indicam diferenças não significativas (Scott knott), 2 porcentagem de germinação em função do número total de sementes adicionadas no experimento (50 sementes), 3 comprimento das raízes (valor médio) em centímetros.

A Figura 49 ilustra o ensaio *in vitro* das concentrações 1, 2 e 15 mg.mL^{-1} (C,D e E respectivamente) de óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* em sementes de alface.

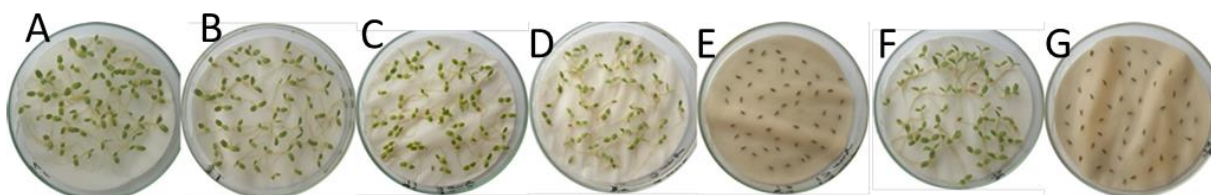


Figura 49. . Fotografias em Placas de Petri do sétimo dia do ensaio alelopático de óleo essencial de manjeriço, variedade *Sweet Italian Large Leaf* em sementes de alface.

A: Controle negativo (DMSO), B: Controle positivo (H_2O), C, D e E: óleo essencial de manjeriço nas concentrações de 1,2 e 15 mg.mL^{-1} , F e G: linalol e eugenol respectivamente (15 mg.mL^{-1})

As concentrações de 1 e 2 mg.mL^{-1} de óleo essencial afetaram ($p < 0,05$) o comprimento das raízes, com menor comprimento de raiz com 2 mg.mL^{-1} e uma coloração ligeiramente mais escura, evidenciando maior potencial alelopático em função do aumento da concentração, com resultados similares na literatura (GATTI *et al.*, 2004; ROSADO *et al.*, 2009).

O óleo essencial de manjeriço e o eugenol, ambos na concentração de 15 mg.mL^{-1} , demonstraram o mesmo grau de inibição (Tabela 7 e Figura 49). Possivelmente, o eugenol por ser o composto majoritário da variedade *Sweet Italian Large Leaf* (Tabela 6) tenha exercido o

efeito fitotóxico, levando a morte de 100% das sementes. Esse efeito também foi verificado por Mazzafera, (2003) que obteve inibição na germinação de várias plantas relatando o envolvimento do eugenol no efeito alelopático.

Em manjerição Filho; Zoghbi (2009) observaram que o linalol, a cânfora e o limoneno apresentaram atividade alelopática com plantas daninhas malícia e mata-pasto, entretanto não foi verificado o efeito inibitório do linalol sobre a germinação das sementes de alface, ao contrário se obteve alto índice de germinação (97,5%) semelhante ao controle positivo. Esse resultado divergente pode ser possível, porque o linalol pode exercer ou não efeito fitotóxico na germinação de outras plantas, dependendo da sua concentração e da concentração de outros monoterpenos que auxiliam de forma sinérgica na atividade alelopática e também da suscetibilidade da espécie de planta testada.

4.3 Efeito do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Larde Leaf* sobre fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia Solani*).

A concentração de 0,20 mg. mL⁻¹ do óleo essencial de manjeriço exerceu efeitos sobre o halo de crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* com redução do crescimento micelial comparados aos controles BDA e DMSO (Tabela 8 e Figura 50).

Tabela 8. Halo de crescimento micelial (mm) dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia Solani* em diferentes concentrações de óleo essencial de manjeriço (0,05; 0,10; 0,15 e 0,20 mg.mL⁻¹) variedade *Sweet Italian Large Leaf* e seus componentes majoritários, eugenol e linalol.

Tratamentos	Concentrações	<i>F.oxysporum</i>	<i>R.Solani</i>
Mancozeb	0,20 mg.mL ⁻¹	5,00 a	75,16 a
Óleo essencial	0,05 mg.mL ⁻¹	78,83 cd	87,03 b
	0,10 mg.mL ⁻¹	74,19 bc	82,26 ab
	0,15 mg.mL ⁻¹	72,89 bc	80,95 ab
	0,20 mg.mL ⁻¹	71,16 b	79,09 ab
	Linalol	0,20 mg.mL ⁻¹	75,34 bc
Eugenol	0,20 mg.mL ⁻¹	81,89 d	85,25 ab
Meio de cultura	BDA	77,99 cd	88,48 b
	Solvente	DMSO	78,94 cd

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott 5% .

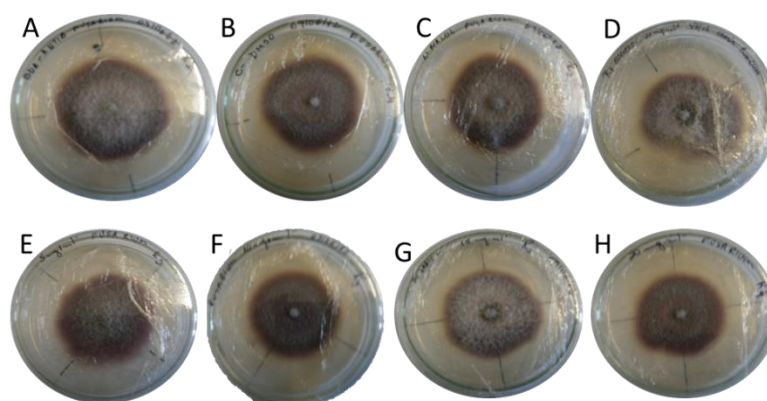


Figura 50. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do óleo essencial de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf* em *Fusarium oxysporum*.

A: BDA; B: DMSO; C Linalol (0,20 mg.mL⁻¹); D: Eugenol (0,20 mg.mL⁻¹); E, F,G e H: Óleo essencial nas concentrações de 0,05mg.mL⁻¹; 0,10mg.mL⁻¹; 0,15 mg.mL⁻¹e 0,20 mg.mL⁻¹ respectivamente.

Nos ensaios com o fungo *R. solani* as concentrações de 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20 mg.mL⁻¹ do óleo essencial e 0,20 mg.mL⁻¹ de eugenol não apresentaram diferenças no crescimento micelial. O antifúngico promoveu uma redução no crescimento da colônia, mas não uma inibição completa.

Em *Fusarium oxysporum* a inibição total ocorreu com o uso do antifúngico comercial de largo espectro Mankozeb (etileno-bis-ditiocarbamatos) (Tabela 8). Esse fungicida pertence ao subgrupo mais importante dos fungicidas ditiocarbamatos (compostos orgânicos sulfurados derivados do ácido bisditiocarbâmico). Essa classe é empregada na agricultura como fungicida não sistêmico, controlando grande espectro de fungos (ROSA; MARQUES, 2011).

A utilização desses fungicidas é a estratégia de primeira escolha do produtor para reduzir uma infestação por fitopatógenos porque o resultado é imediato e eficiente, mas muitas vezes não é considerado que essa prática a longo prazo pode ter consequências na saúde do agricultor, do consumidor e no meio ambiente.

Os resultados demonstram que o linalol teve um efeito semelhante ao do óleo essencial de manjerição na redução do crescimento micelial em *F. oxysporum*, sugerindo que o efeito do óleo essencial seja em parte devido aos seus componentes majoritários, nesse caso, o linalol seria o maior responsável pela ação fungitóxica do óleo essencial de manjerição. Esses resultados estão de acordo com estudos de Oxenham (2005) e Khan et al (2010) relatando a atividade antifúngica do linalol. Além do linalol, há evidências que o 1,8-cineol também pode ser responsável pela ação antifúngica frente aos fitopatógenos (MAREI *et al.*, 2012).

De acordo com Hashem *et al.* (2010) objetivando o controle efetivo de *F. oxysporum* foram utilizadas concentrações mais elevadas de 2, 4 e 8% v/v de óleo essencial de manjerição, onde a partir de 2% obteve-se efeito inibitório observado através do halo de inibição de crescimento. O extrato etanólico de manjerição apresentou inibição no crescimento de *F. proliferatum* e *F. subglutinans* nas concentrações de 0,35 e 0,70% (v/v), enquanto outros *Fusarium spp*, inclusive *F.oxysporum* só foram inibidos completamente na concentração de 1,50% (v/v) (KOCIĆ-TANACKOV *et al.*, 2011), demonstrando ser uma espécie com menor sensibilidade aos tratamentos.

O ensaio *in vitro* realizado por Hussain et al. (2008) para testar o óleo essencial de manjerição em alguns patógenos, dentre estes, *R. solani* demonstrou resultados inibitórios contra a espécie na concentração de 2,9 a 5,0 mg.mL⁻¹, e o linalol puro foi utilizado na concentração de 1,5 mg.mL⁻¹, sendo o linalol o componente majoritário do óleo essencial que apresentou atividade antifúngica. Esses dados evidenciam que a espécie *R. solani* possui uma baixa sensibilidade frente ao tratamento, pois a maioria dos outros microorganismos foram inibidos em doses mais baixas. Dessa forma, a efetividade do óleo essencial de manjerição depende não só da composição química desse óleo, mas também da sensibilidade do patógeno a ser tratado. O mesmo autor observou que as diferenças da atividade microbiana do óleo essencial foram atribuídas as diferenças na composição química do mesmo coletado nas quatro estações do ano. Houve maior produção de linalol e de outros monoterpenos oxigenados como 1,8-cineol, e também de sesquiterpenos oxigenados no inverno, e no verão os mesmos compostos se apresentaram em teores mais baixos. Essas observações também foram relatadas por Celiktas *et al.* (2007) e Van Vuuren *et al.* (2007).

4.4 Efeito de diferentes fontes e doses de nitrogênio (50 ou 100 Kg ha⁻¹ NO₃⁻, NH₄⁺ ou NH₄NO₃⁻) no metabolismo de N, na Biomassa, no rendimento e no perfil do óleo essencial, na expressão gênica e na anatomia foliar da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e Maria Bonita

4.4.1 Metabolismo das frações nitrogenadas e de açúcares solúveis e no N-total das plantas da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e cultivar Maria Bonita

4.4.1.1 Teores e conteúdos de Nitrato, amônio, aminoácidos livres e de açúcares solúveis na variedade *Sweet Italian Large Leaf* e na cultivar Maria Bonita

Na Figura 51 e Figura 52 são apresentados os resultados das frações solúveis expressos por grama de massa fresca (teor) e pelo total da concentração obtida (conteúdo), em cada parte (caule, folha e inflorescência) das plantas de manjeriço variedades *Sweet Italian Large Leaf* e Maria Bonita respectivamente, submetidas a diferentes fontes e níveis de N.

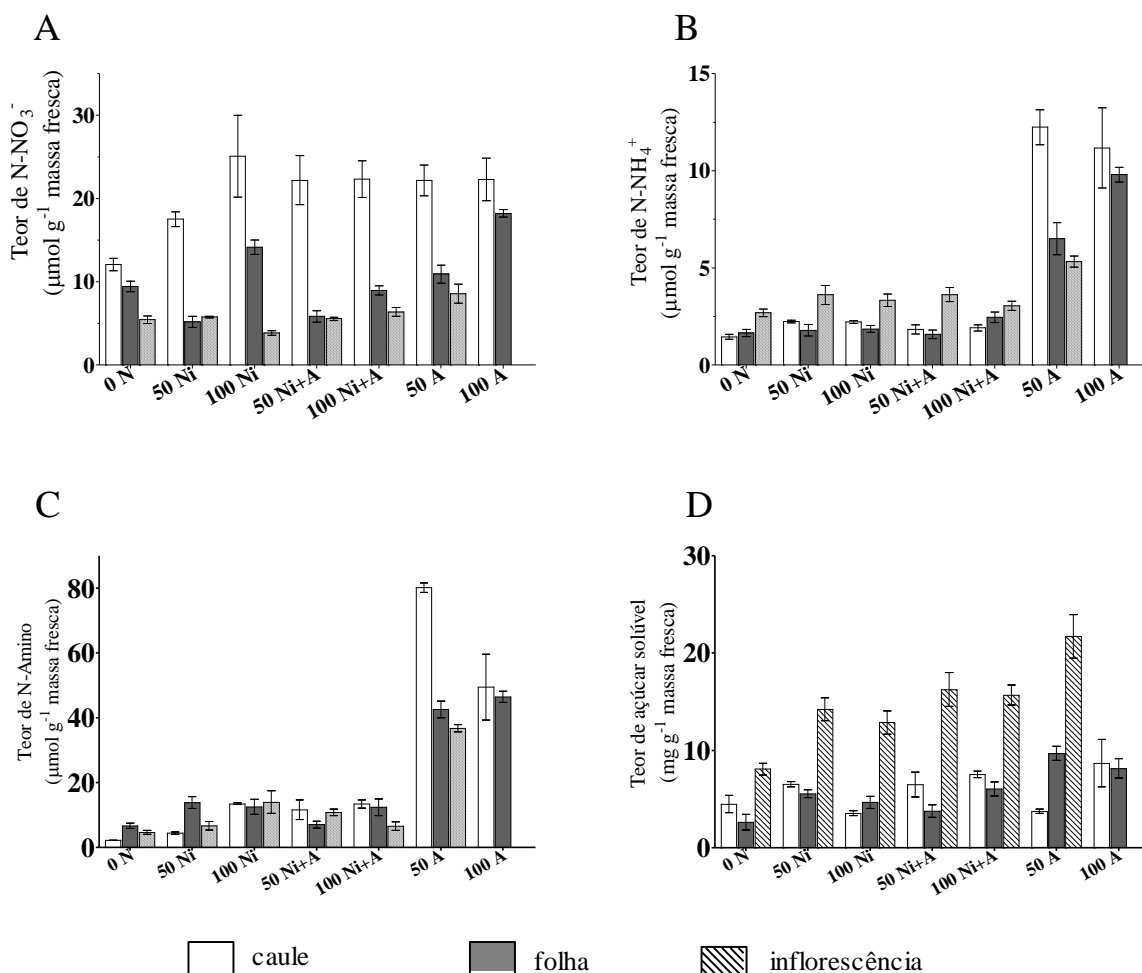


Figura 51. Teores de A) N- NO₃⁻, B) N-NH₄⁺, C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência na variedade *Sweet Italian Large Leaf*.

Os valores dos teores são em função do tratamento sem nitrogênio (0 N); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato (50Ni e 100 Ni); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato de amônio (50Ni+A e 100 Ni+A) e 50 e 100 Kg N. ha⁻¹ de amônio (50 A e 100 A)

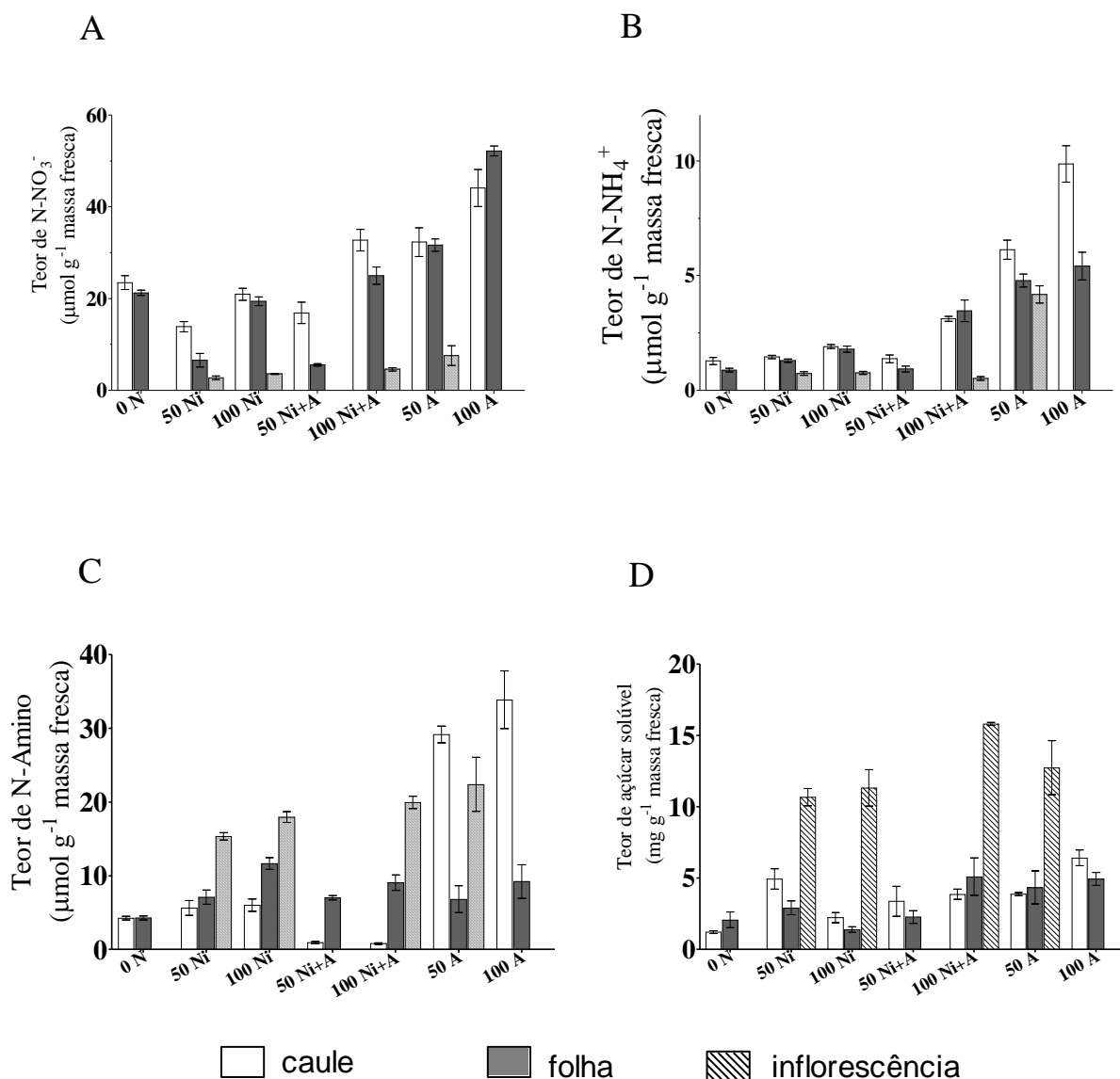


Figura 52. Teores de A) N- NO₃⁻, B) N-NH₄⁺, C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência na cultivar Maria Bonita.

Os valores dos teores são em função do tratamento sem nitrogênio (0 N); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato (50Ni e 100 Ni); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato de amônio (50Ni+A e 100 Ni+A) e 50 e 100 Kg N. ha⁻¹ de amônio (50 A e 100 A)

Sweet Italian Large Leaf apresentou maior teor de NO₃⁻ no caule para todos os níveis e fontes de N (Figura 51). Com o fornecimento de 50 kg.ha⁻¹ de amônio houve elevados teores de N-NH₄⁺ e N-amino no caule. Os tratamentos com nitrogênio promoveram maiores teores de açúcares na inflorescência em relação ao controle. Os teores de açúcares solúveis na inflorescência foram elevados tanto para *Sweet Italian Large Leaf* quanto para cv Maria Bonita. A distribuição da concentração de nitrato na variedade *Sweet Italian Large Leaf* mostrou o seguinte comportamento: foi maior no caule, seguido da folha e inflorescência para todos os níveis e fontes de N inclusive o controle, sugerindo neste estudo, que todas as doses e fontes de N foram importantes para armazenamento de N-NO₃⁻, servindo como fonte de N

mineral. Esses dados são corroborados por Chen et al. (2004) que verificou que o fornecimento de nitrato tem efeito no teor do íon em diferentes partes de planta de arroz.

Com o fornecimento de amônio houve elevados teores de N-NH₄⁺ no caule (11 e 12 μmolg⁻¹ massa fresca respectivamente) sugerindo que as plantas não conseguiram incorporar a grande quantidade de NH₄⁺ a que foram submetidas. Contudo os outros tratamentos apresentaram valores dentro dos padrões (valor máximo até 5 μmolg⁻¹ massa fresca). Teores de N- NH₄⁺ de 2,2 a 8,6 μmolg⁻¹ massa fresca foram encontrados na parte aérea em variedade de arroz Piauí submetidas a duas doses de nitrato (MARQUES et al. 2009).

Os teores de N-amino foram semelhantes entre os tratamentos, com exceção da aplicação de amônio que elevou esses teores no caule e na folha. As concentrações de NH₄⁺ a que as plantas foram submetidas pode ter ocasionado a necessidade de uma rápida assimilação se refletindo no aumento do teor de N-amino livre na planta. Em Crambe a aplicação de doses crescentes de nitrato aumentou os teores de N-amino na folha de 5 para 12 μmolg⁻¹ massa fresca (Brito et al. 2013). Em contrapartida, o aumento de 50 para 100 kg.ha⁻¹ de nitrato não foi suficiente para alterar os teores de N-amino na folha (12,5 e 13,8 μmolg⁻¹ massa fresca respectivamente).

Os teores de açúcares foram mais elevados nos tratamentos com N e a inflorescência apresentou teor de 21 mg.g⁻¹ massa fresca com o uso de 50 kg.ha⁻¹ de amônio, esse valor foi bem superior ao controle (8 mg.g⁻¹ massa fresca). Os teores de açúcares encontrados no caule e na folha foram semelhantes aos encontrados por Santos et al. (2003) que aplicando nitrato em arroz obteve de 12 a 14 mg.g⁻¹ massa fresca de açúcares na parte aérea.

A Figura 53 e a Figura 54 se referem aos conteúdos das frações solúveis no caule, na folha e inflorescência das variedades *Sweet Italian Large Leaf* e Maria Bonita, respectivamente.

Quando se avaliou os conteúdos observou-se uma mudança no local de armazenamento de N-NO₃⁻ na variedade *Sweet Italian Large Leaf* (Figura 53 A) do caule para a folha nas plantas controle (sem N) e naquelas submetidas ao amônio. Além disso, o conteúdo de N-NH₄⁺, N-amino (Figura 53 B, C e D) foi maior nas folhas, sugerindo que o local de assimilação de N foi nas folhas. Dessa forma, o fornecimento de nitrogênio é essencial para a biosíntese e pool de armazenamento de aminoácidos, pois o conteúdo de N-amino no controle foi 93 μmolg/planta e na maior dose de amônio foi de 1033 μmolg/planta nas folhas. O conteúdo de açúcar também foi maior nas folhas das plantas supridas com nitrogênio com máxima concentração de 233 μmolg/planta com 100 kg de nitrato de amônio.

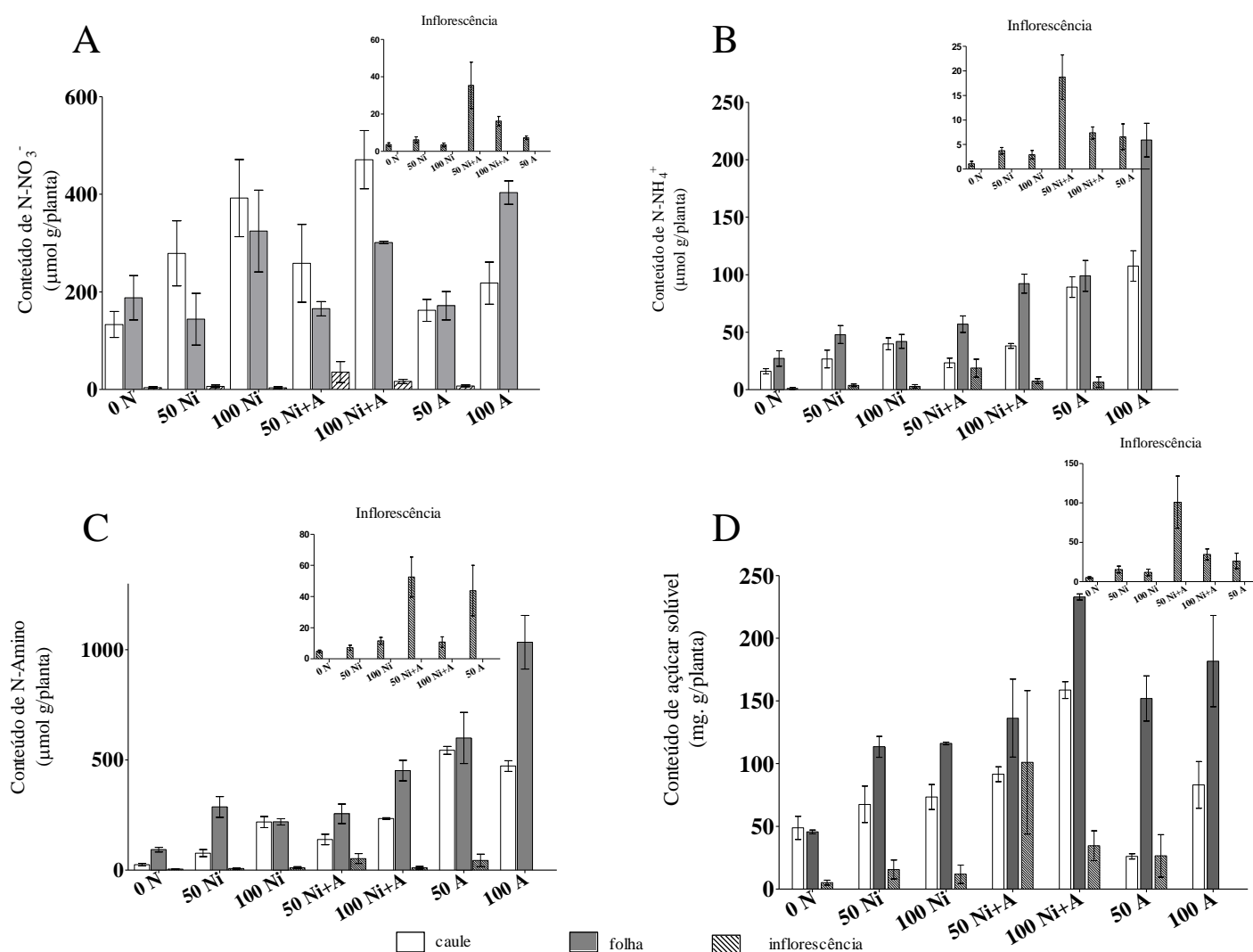


Figura 53. Conteúdo de A) N- NO₃⁻, B) N-NH₄⁺, C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência na variedade *Sweet Italian Large Leaf*

Os valores dos conteúdos são em função do tratamento sem nitrogênio (0 N); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato (50Ni e 100 Ni); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato de amônio (50Ni+A e 100 Ni+A) e 50 e 100 Kg N. ha⁻¹ de amônio (50 A e 100 A). Nos inserts a inflorescência.

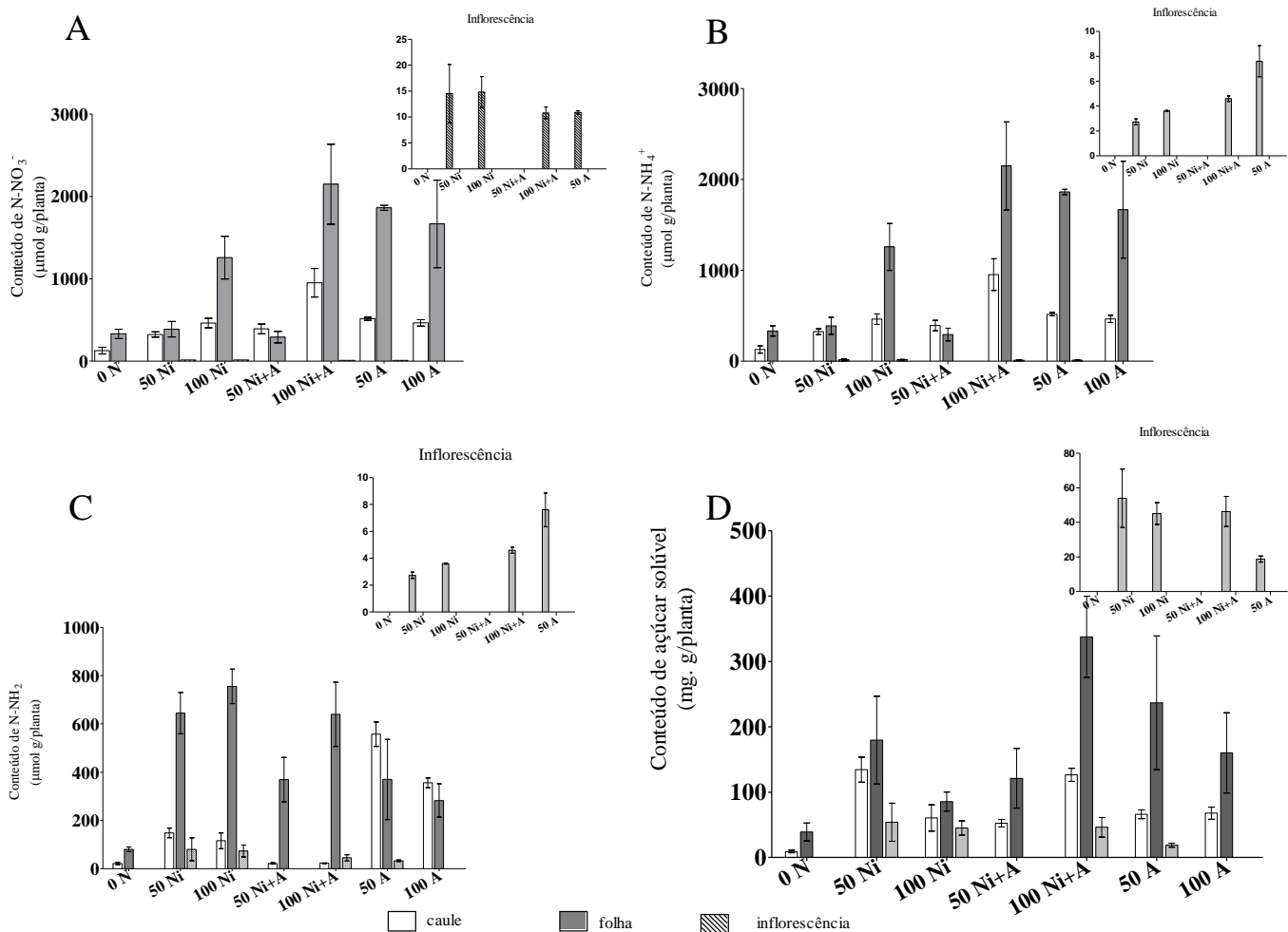


Figura 54. Conteúdo de A) N- NO₃⁻, B) N-NH₄⁺, C) N-amino livre, D) açúcares solúveis no caule, folha e inflorescência, respectivamente, na cultivar Maria Bonita.

Os valores dos conteúdos são em função do tratamento sem nitrogênio (0 N); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato (50Ni e 100 Ni); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato de amônio (50Ni+A e 100 Ni+A) e 50 e 100 Kg N. ha⁻¹ de amônio (50 A e 100 A). Nos inserts está representado o conteúdo da inflorescência

Além das análises das frações solúveis, observando os dados de biomassa, de rendimento e perfil do óleo essencial (dados mostrados abaixo), a variedade *Sweet Italian Large Leaf* demonstrou ser melhor adaptada as condições de escassez de nutrientes, acumulando açúcares tanto no caule quanto na folha e desviando estes para utilizar nas reações metabólicas para produção de óleo, visto os maiores rendimentos sem fornecimento de N. Segundo Scheible *et al.* (1997), após a suplementação nitrogenada, há um aumento nos níveis de transcritos para NR, PEPC com diminuição da ADP-glicose pirofosforilase, e em plantas não suplementadas a competição entre o metabolismo de nitrogênio e o de carbono é minimizada.

O tratamento sem o fornecimento de N demonstrou um metabolismo atenuado de N e de carboidrato na cv Maria Bonita (Figura 54), apresentando baixos conteúdos de N-NO₃⁻, NH₄⁺, N-amino e açúcares. Esses resultados atenuados do metabolismo de N que ambas as espécies apresentaram sob escassez de N é comum, pois as formas orgânicas de N como aminoácidos e proteínas normalmente diminuem nessas condições (KOVÁČIK; KLEJDUS,

2014; KOVÁČIK *et al.*, 2006), porque há uma diminuição na atividade da NR e GS/GOGAT contudo, tem que ser considerado que estes parâmetros são características que dependem da espécie/cultivar (HAKEEM *et al.*, 2011).

A cv Maria Bonita demonstrou ser muito responsiva a aos tratamentos com nitrogênio, apresentando maior biomassa e conteúdos de açúcar nas folhas, principalmente quando fornecido 100 Kg Ni+A, isso se refletiu em incrementos no metabolismo secundário promovendo maior rendimento de óleo essencial, evidenciando um impacto positivo no metabolismo de nitrogênio e de carbono dessa espécie.

4.4.1.2 Teores e conteúdo de N-Total na variedade *Sweet Italian Large Leaf* e na cultivar Maria Bonita

Na Figura 55 e Figura 56 podem ser observados os teores e conteúdos de N-total nas variedades *Sweet Italian Large Leaf* e Maria Bonita respectivamente, submetidas a diferentes fontes e níveis de N. Os maiores teores são observados nas folhas e inflorescências entre os tratamentos na *Sweet Italian Large Leaf* e Maria Bonita, contudo quando se observa o conteúdo todos os tratamentos acumularam mais N na folha, confirmando os resultados anteriores das frações solúveis neste experimento.

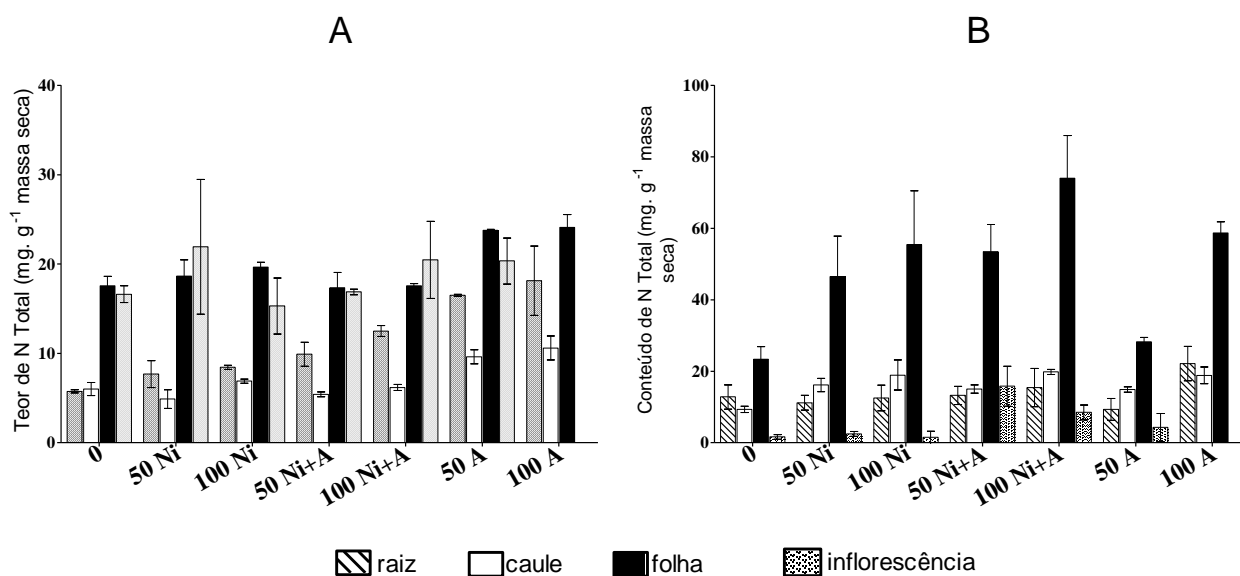


Figura 55. Teor e conteúdo de N-Total em *Sweet Italian Large Leaf*.

A: Teor de N-Total, B: Conteúdo de N-Total na raiz, caule, folha e inflorescência em função do tratamento sem nitrogênio (0 N); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato (50Ni e 100 Ni); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato de amônio (50Ni+A e 100 Ni+A) e 50 e 100 Kg N. ha⁻¹ de amônio (50 A e 100 A)

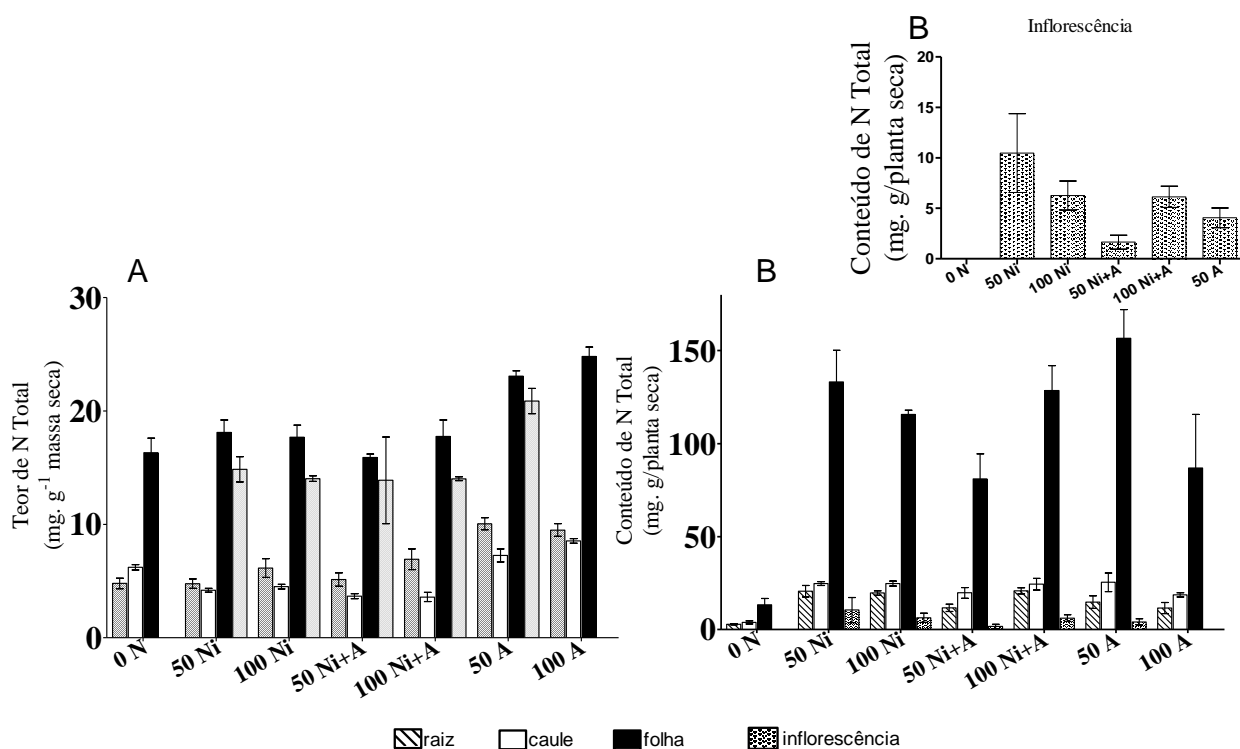


Figura 56. Teor e conteúdo de N-Total na cultivar Maria Bonita.

A) Teor de N-Total, B) Conteúdo de N-Total na raiz, caule, folha e inflorescência em função do tratamento sem nitrogênio (0 N); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato (50Ni e 100 Ni); 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato de amônio (50Ni+A e 100 Ni+A) e 50 e 100 Kg N. ha⁻¹ de amônio (50 A e 100 A). No inserto a inflorescência.

4.4.1.3 Acúmulo de N-Total na raiz, caule, folha e inflorescência da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e cultivar Maria Bonita

A Figura 57 confirma os resultados anteriores em relação alocação de N nas diferentes partes das plantas submetidas aos tratamentos, no qual o N absorvido foi acumulado na folha em ambas as espécies, de acordo com os dados de teor e conteúdo de N-total.

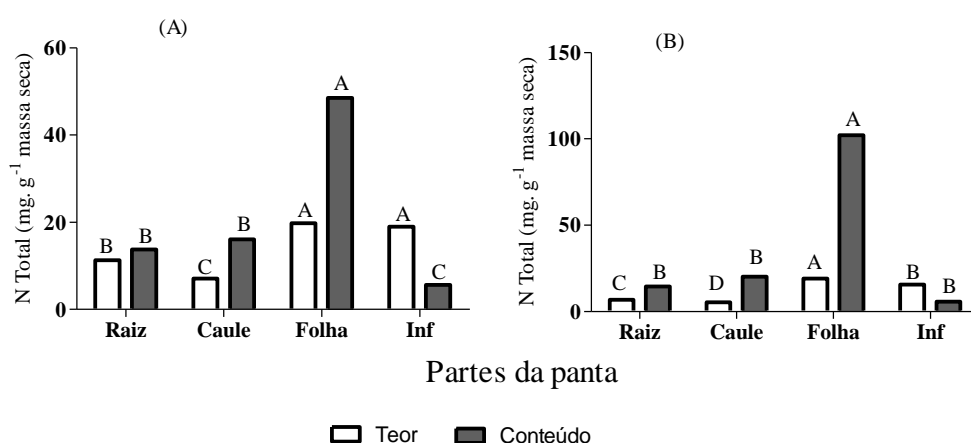


Figura 57. Teores e conteúdos de N acumulados na raiz, caule, folha e inflorescência sob os diferentes níveis e fontes de N.

A: Variedade *Sweet Italian Large Leaf* e B: Cultivar Maria Bonita

4.4.2 Biomassa total de plantas, massa fresca e seca de raiz, caule e folha de manjeriço cultivadas com 50 ou 100 Kg ha⁻¹ NO₃⁻, NH₄⁺ ou NH₄NO₃⁻

Os resultados na Tabela 9 mostram o efeito das diferentes fontes e doses de N na biomassa da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e na cultivar Maria Bonita.

Tabela 9. Massa fresca total, massa fresca e massa seca de folha, de caule e de raiz (g planta⁻¹) na época do florescimento da variedade *Sweet Italian Large Leaf* e da cultivar Maria Bonita, submetidas diferentes níveis e fontes de N (kg.ha⁻¹)

Tratamentos (KgN.ha ⁻¹)		Massa Fresca			Massa Seca		
		g planta ⁻¹					
<i>Sweet Italian Large Leaf</i>							
	MFT*	Folha	Caule	Raiz	Folha	Caule	Raiz
Controle (0 N)	30,47c	20,28b	11,09b	5,41a	1,93a	1,85b	2,23a
50Kg Nitrato	39,02b	23,61b	15,94a	6,92a	2,35a	2,41b	1,29b
100Kg Nitrato	39,17b	23,85b	16,05a	7,83a	2,31a	2,29b	1,02b
50Kg Ni+A	46,27a	36,54a	14,46a	11,82a	2,86a	2,60b	2,07a
100Kg Ni+A	53,03a	33,69a	21,10a	8,51a	3,75a	3,61a	1,22b
50Kg Amônio	21,32c	15,70b	6,69b	4,11a	1,23a	1,50b	0,67b
100Kg Amônio	30,94c	22,17b	9,75b	8,08a	2,44a	1,80b	1,28b
Maria Bonita							
Controle (0 N)	22,91b	17,43b	5,50b	2,69b	0,77c	0,67b	0,63b
50Kg Nitrato	83,76a	64,77a	23,51a	14,38a	7,63a	4,76a	3,60a
100Kg Nitrato	78,45a	62,13a	20,30a	14,83a	6,85a	5,26a	3,40a
50Kg Ni+A	74,76 a	51,33a	23,80a	12,48a	6,34a	4,47a	2,78a
100Kg Ni+A	97,17a	70,43a	29,71a	10,81a	7,74a	6,03a	2,59a
50Kg Amônio	76,39 a	58,80a	19,10a	8,13b	6,78a	3,98a	1,77b
100Kg Amônio	42,57b	31,93b	10,64b	5,85b	4,03b	2,18b	1,22b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si na mesma coluna, pelo teste Scott-Knott 5%

MFT*- Massa fresca total (massa de caule + folha + inflorescência)

Ni+A- Nitrato de amônio

Controle- (sem N)

Observou-se que os tratamentos com as fontes e doses de N foram benéficos em relação ao controle para acúmulo de massa fresca, com exceção dos tratamentos com amônio para ambas as variedades. E que fornecendo a fonte mista de nitrato de amônio às plantas, elas responderam positivamente com maior ganho de massa, quando se pesou toda a parte aérea (MFT) e as folhas.

A variedade *Sweet Italian Large Leaf* apresentou ganho de massa fresca de folha com nitrato de amônio e de caule com nitrato e nitrato de amônio, mas no tratamento com amônio o ganho de massa não foi significativo. Houve um aumento de massa seca de raiz com a limitação de N e com o suprimento de 50 Kg.ha⁻¹ nitrato de amônio.

Incremento na Massa fresca total (MFT = massa de caule + folha + inflorescência) de 151% e 174%, na massa fresca de folha (180 e 166%), na massa fresca de caule (130 e 190%) e na massa seca de caule (185 e 195%) foram obtidos com 50 e 100Kg Ni+A.ha⁻¹ para *Sweet Italian Large Leaf*. Estudos com manjeriço testando 50, 100 e 150 KgN.ha⁻¹ obteve-se rendimento máximo de parte aérea fresca e seca (caule, folha e inflorescência) de 62,9 e 7,1 g.planta⁻¹ (SHARAFZADEH *et al.*, 2011). Jha (2011) aplicando 80Kg N.ha⁻¹ com aumentos na massa seca de folha e incremento de 9,24% na massa seca de caule em *Artemisia annua*.

O aumento de biomassa seca de raiz para *Sweet Italian Large Leaf* ocorreu com a limitação de N e com o suprimento de 50 Kg Ni+A, o que está de acordo com Kovácik, *et al* (2006). Essa resposta de plantas deficientes em N pode ocorrer como um mecanismo para intensificar a assimilação de N do solo. Cultivares de arroz suplementadas com 25%, 35% e 50% NO₃⁻ apresentaram aumento de biomassa de raiz comparado ao fornecimento só de amônio NH₄⁺ (SONG *et al.*, 2011).

Para a cultivar Maria Bonita com exceção das plantas que receberam 100Kg .ha⁻¹ de amônio e apresentaram menor biomassa em todas as partes, os tratamentos com diferentes fontes e níveis de N, de forma geral influenciaram positivamente o ganho de biomassa fresca e seca principalmente na folha dessa cultivar, sugerindo que não existe uma fonte preferencial para a absorção de nutrientes e consequente ganho de massa para a produção de manjeriço, apesar de se ter observado nos dados valores mais elevados de massa fresca e de massa seca com o fornecimento de 100Kg .ha⁻¹ Ni+A, esse fato só não se aplica para massa fresca e seca de raiz.

Como observado, o fornecimento de nutrientes promoveu efeito positivo no ganho de massa em comparação ao controle, e entre os tratamentos o mais adequado foi à aplicação de nitrato de amônio para intensificar a produção de massa dessas variedades.

4.4.3 Efeito de diferentes fontes e níveis de N (50 ou 100 Kg.ha⁻¹ NO₃⁻, NH₄⁺ ou NH₄NO₃) no rendimento e no perfil do óleo essencial variedade *Sweet Italian Large Leaf* e *Maria Bonita*

Os resultados da Tabela 10 ilustram o efeito dos diferentes níveis e fontes de N no rendimento de óleo essencial das folhas de manjeriço dessas variedades.

O rendimento de óleo da cultivar (cv) Maria Bonita foi influenciado pelos tratamentos com N, obtendo-se um rendimento máximo com o fornecimento de 100Kg.ha⁻¹ Ni+A (1,46%). Experimento anterior utilizando 150 KgN.ha⁻¹ obteve rendimento máximo de 1,6% e o conteúdo máximo (105,3mg.planta⁻¹) de óleo essencial de manjeriço (SHARAFZADEH *et al.*, 2011).

O fornecimento de 50Kg.ha⁻¹ Ni+A promoveu um aumento no rendimento de óleo semelhante ao controle para a variedade *Sweet Italian Large Leaf* (Tabela 10), sendo que os outros tratamentos apresentaram rendimento inferior e a maior massa seca de folha não ocasionou maior rendimento de óleo essencial. Comportamento semelhante foi descrito em estudo de campo com plantas de manjeriço (ARABACI; BAYRAM, 2004) que não

receberam fornecimento de N e tiveram rendimentos de óleo superior as plantas supridas com N respectivamente (0,65-0,56%) e (0,78 e 0,71%) nos anos de 2000 e 2001.

Tabela 10. Massa fresca e massa seca de folhas pesadas para extração de óleo essencial, e rendimento de óleo essencial (ROE) (%) de acordo com os tratamentos para a variedade *Sweet Italian Large Leaf* e cv. Maria Bonita

Tratamentos (KgN.ha ⁻¹)	Massa Fresca <i>Sweet Italian Large Leaf</i> (g/ planta ⁻¹)	Massa Seca <i>Sweet Italian Large Leaf</i> (g/ planta ⁻¹)	ROE(%) (g/ planta ⁻¹)
Controle (0 N)	7,62 d	1,16c	0,37 a
50Kg Nitrato	18,51 b	3,26 a	0,16 b
100Kg Nitrato	16,86 b	2,64 b	0,14 b
50Kg Ni+A	20,58 b	2,69 b	0,41 a
100Kg Ni+A	25,19 a	3,31 a	0,10 b
50Kg Amônio	4,98 d	0,96 c	0,22 b
100Kg Amônio	13,17 c	2,23 b	0,09 b
	Maria Bonita (g/ planta ⁻¹)		(g/ planta ⁻¹)
Controle (0 N)	5,70 e	0,61 e	0,27 d
50Kg Nitrato	56,32 a	7,35 b	0,56 c
100Kg Nitrato	47,25 a	6,61 b	0,57 c
50Kg Ni+A	32,63 c	4,86 c	0,52 c
100Kg Ni+A	55,15 a	8,42 a	1,46 a
50Kg Amônio	42,34 b	6,51 b	1,01 b
100Kg Amônio	19,26 d	3,21 d	0,71 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si na mesma coluna, pelo teste Scott-Knott 5%
Ni+A= Nitrato de amônio

Os resultados encontrados no tratamento controle para a variedade *Sweet Italian Large Leaf* e os dados de Arabaci; Bayram (2004) são contrários a alguns trabalhos que afirmam que fornecimento de N aumenta o rendimento de óleo essencial em plantas (AZIZI *et al.*, 2009; SHARAFZADEH; ALIZADEH, 2011; SHARAFZADEH *et al.*, 2011; ZHELJAZKOV; CANTRELL; *et al.*, 2008).

Entretanto, outros estudos (GIORGI *et al.*, 2009; KOVÁČIK; KLEJDUS, 2014; KOVÁČIK *et al.*, 2006; KOVÁČIK *et al.*, 2007) afirmam que a deficiência de N pode ser considerada como um estresse abiótico que pode modificar o metabolismo de plantas favorecendo a maior produção de metabólitos secundários fenólicos.

Essa afirmativa pode explicar os resultados obtidos aqui para rendimento de óleo sem N (0,37%) na Tabela 10 e a alta concentração de eugenol (31,91%) obtido no controle (Tabela 11). Sob deficiência de N há uma intensificação da atividade da PAL, para gerar o ácido trans-cinâmico (precursor dos fenólicos) e íons amônio.

As variedades estudadas apresentaram rendimentos distintos de óleo essencial, a *Sweet Italian Large Leaf* variou de 0,09 a 0,41% e a Maria Bonita obteve maiores rendimentos (0,27 a 1,46%) neste estudo. A cv Maria Bonita é um planta com altos rendimento de óleo e elevado conteúdo de linalol como descrito anteriormente por Blank *et al.* (2007).

As análises de CG-MS e CG-FID identificaram doze compostos principais entre monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides no óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* (Tabela 11) obtido sob os diferentes níveis e fontes de N.

Tabela 11. Abundância relativa (%) dos principais compostos encontrados no óleo essencial de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf*, em função dos tratamentos com fontes e doses diferenciais de N.ha⁻¹

^a Compostos	IKcalc	IKlit	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)	T5 (%)	T6 (%)	T7 (%)
Eucaliptol	1039	1033	1,22	4,32	-	1,92	-	0,64	2,9
Linalol	1114	1098	38,90	24,94	14,44	21,21	6,48	4,78	5,37
Cânfora	1159	1143	0,99	0,24	-	1,38	-	-	2,54
α-Terpineol	1211	1189	4,5	6,69	2,19	2,87	2,21	1,45	4,12
Eugenol	1381	1356	31,91	21,06	36,9	21,04	30,3	33,71	11,9
α-Trans bergamoteno	1442	1436	1,15	1,7	-	1,73	0,93	-	-
D-Germacreno	1491	1480	0,68	0,49	-	-	-	-	-
γ Muruleno	1524	1477	1,59	0,93	-	1,5	1,71	-	-
Espatulenol	1599	1576	1,65	1,74	2,33	2,72	3,24	2,69	4,23
Cubenol	1646	1642	2,55	1,58	0,68	2,43	3,3	2,28	1,98
Cadinol	1675	1653	13,00	8,4	12,03	13,13	16,9	17,88	12,23
α-Bisabolol	1714	1683	1,34	0,46	-	0,43	1,18	1,03	-

^a Os compostos estão listados em ordem de eluição.

T1= Percentagem das substâncias principais que compõe o óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* das plantas controle

T2 ao T7= Percentagem das substâncias principais que compõe o óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* nos tratamentos com as fontes e níveis de T2 e T3: 50 e 100 Kg N-NO₃⁻.ha⁻¹, T4 e T5: 50 e 100 Kg NH₄NO₃⁻.ha⁻¹, T6 e T7: 50 e 100 Kg N-NH₄⁻.ha⁻¹.

IKcalc= índice de Kovats calculados para T1 ao T7 respectivamente.

IKlit= índice de Kovats encontrado na literatura para as substancias (Adams, 2001).

Os óleos essenciais e os padrões analíticos foram diluídos em diclorometano e injetados em CG-MS e CG-FID. Os constituintes extraídos foram submetidos a identificação por comparação dos tempo de retenção com os padrões de linalol e eugenol, 1,8 cineol, terpineol e α-trans-Bergamoteno injetados, e os Ik foram calculados através da co-injeção de n-alcanos, série C₈-C₂₀ e C₂₁-C₄₀.

Os compostos de maior abundancia na variedade *Sweet Italian Large Leaf* foram o eugenol e o linalol como descrito anteriormente no experimento com 50 e 300 Kg.N-NO₃⁻ (Tabela 6) , confirmando o quimiotipo eugenol/linalol neste experimento com o fornecimento de 100 Kg N-NO₃⁻ e NH₄NO₃⁻ como fontes. Entretanto sem N, houve um aumento na concentração de linalol, modificando o quimiotipo para linalol/eugenol, verificando também que o aumento de N diminuiu a concentração de linalol. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em estudo com *Tanacetum vulgare* utilizando N-NO₃⁻ como fonte, observou-se que conforme aumentava o fornecimento do nutriente houve uma diminuição na concentração de terpenos nas folhas independente do quimiotipo estudado (KLEINE; MÜLLER, 2013).

A aplicação de NO₃⁻ no solo modifica o metabolismo das plantas, induzindo os genes para redução do NO₃⁻, desviando os esqueletos de carbono para incorporação do NH₄⁺, através da síntese de ácidos orgânicos com aumento da expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase e piruvato Kinase (SCHEIBLE *et al.*, 1997). Mesmo nas situações onde ocorre baixas taxas de

assimilação de N (nas doses de 50 Kg. ha⁻¹) observa-se que há um desvio considerável de carbono para síntese de aminoácidos em relação ao controle e isso tem como consequência alterações no metabolismo secundário.

O estresse induzido pela deficiência de N ocasionou melhor qualidade do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf*, produzindo uma concentração elevada de compostos defensivos (eugenol e linalol), o que para a planta significa uma vantagem no meio ambiente contra os seus agressores naturais, mas por outro lado para a extração dessas substâncias e sua utilização em grande escala seja na indústria agrícola ou farmacêutica seria necessário um maior número de plantas no plantio para se obter biomassa suficiente para extração de óleo.

Na Tabela 12 estão ilustrados os resultados do perfil do óleo essencial da cultivar Maria Bonita. Como pode ser observado o linalol foi o monoterpene predominantemente majoritário, entretanto, outros três terpenos e um fenilpropanóide (eugenol) também foram caracterizados. Nessa espécie o fornecimento de N favoreceu a produção dos metabólitos secundários como eucaliptol, sabineno, terpineol e eugenol promovendo aumentos na concentração desses compostos em relação ao controle onde não foram detectados esses metabólitos.

Tabela 12. Abundância relativa (%) dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial de manjerição cultivar Maria Bonita, em função dos tratamentos com fontes e doses diferenciais de N.ha⁻¹

^a Compostos	IKcalc	IKlit	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)	T5 (%)	T6 (%)	T7 (%)
Eucaliptol	1039	1033	-	4,34	2,15	5,13	10,63	7,11	4,18
Sabineno	1083	1068	-	1,37	0,96	0,92	0,81	0,84	1,06
Linalol	1106	1098	61,86	61,15	62,68	64,62	69,25	68,40	65,94
a-terpineol	1212	1189	-	2,94	3,04	2,33	2,43	2,64	3,08
Eugenol	1379	1356	-	3,76	4,01	1,81	3,42	3,31	2,71

^a Os compostos estão listados em ordem de eluição.

T1= Percentagem das substâncias principais que compõe o óleo essencial da cultivar Maria Bonita das plantas controle

T2 ao T7 = Percentagem das substâncias principais que compõe o óleo essencial da cultivar Maria Bonita nos tratamentos com as fontes e níveis de N 50 e 100 Kg N-NO₃⁻.ha⁻¹, 50 e 100 Kg N-NH₄NO₃⁻.ha⁻¹ 50 e 100 Kg N-NH₄⁻.ha⁻¹ respectivamente.

IKcalc= índice de Kovats calculados para T1 ao T7 respectivamente

IKlit= índice de Kovats encontrado na literatura para as substâncias (Adams, 2001).

Os óleos essenciais e os padrões analíticos foram diluídos em diclorometano e injetados em CG-MS e CG-FID. Os constituintes extraídos foram submetidos a identificação por comparação dos tempo de retenção com os padrões de linalol e eugenol, eucaliptol, sabineno, α -terpineol e α -trans-Bergamoteno injetados, e os Ik foram calculados através da co-injeção de n-alcanos, série C₈-C₂₀ e C₂₁-C₄₀.

A concentração de linalol é uma característica fundamental para a qualidade do óleo essencial da cv Maria Bonita, dessa forma, visando a qualidade e a maior produtividade em rendimento de óleo essencial dessa espécie, o ideal foi o uso de 100 KgNi+A que promoveu incremento máximo de 69,25% na abundancia relativa do linalol. Esses dados do perfil da cv Maria Bonita sugere que esta é uma espécie responsiva a nutrição mineral com potencial para produção de óleo essencial e alto rendimento de linalol.

4.5 Atividade antifúngica do óleo essencial de manjeriço, cultivar Maria Bonita sobre fungos patogênicos e análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura

4.5.1 *Candida e Geothricum spp*

A Tabela 13 ilustra o efeito das concentrações crescentes do óleo essencial de manjeriço cultivar “Maria Bonita”, através da medida do halo de inibição expresso em centímetros sobre amostras de espécies de *Candida* e amostra do gênero *Geothricum spp*. Também são mostrados os efeitos do linalol e do antifúngico cicloexamida, utilizados como controles.

Tabela 13. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de manjeriço, cultivar Maria Bonita nas concentrações de 50, 100, 200 e 300mg.mL⁻¹, do linalol e do antifúngico cicloexamida (300mg.mL⁻¹) em *Candida* e *Geothricum spp*. avaliadas através da zona de inibição do crescimento (cm)

Espécies	C	Óleo essencial mg.mL ⁻¹				Linalol 300 mg.mL ⁻¹	Cicloexamida
		50	100	200	300		
<i>C. albicans</i>	0,00 ^c	0,63 ^c	1,16 ^b	2,50 ^a	2,73 ^a	1,50 ^b	2,23 ^a
<i>C. guilliermondii</i>	0,00 ^d	0,23 ^d	0,66 ^d	1,56 ^c	2,76 ^b	1,13 ^c	4,00 ^a
<i>C. parapsilosis</i>	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,30 ^b	0,96 ^b	0,26 ^b	4,50 ^a
<i>C. tropicalis</i>	0,00 ^d	0,90 ^c	1,43 ^b	1,96 ^b	3,13 ^a	1,96 ^b	3,80 ^a
<i>C. Krusei</i>	0,00 ^c	0,23 ^c	0,30 ^c	0,93 ^b	1,20 ^b	0,33 ^c	3,50 ^a
<i>Geothricum spp</i>	0,00 ^b	0,53 ^b	0,96 ^a	1,53 ^a	1,80 ^a	1,10 ^a	0,86 ^a

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott 5%. Valores médios de três replicatas

C: controle 15µL Dimetilsulfóxido (DMSO) aplicado no disco de papel

Pode-se visualizar as fotografias dos ensaios *in vitro* realizados em Placas de Petri (Figura 58 e 59) após 48 horas de exposição aos tratamentos nas espécies de *Candida* e *Geothricum spp*.

Foram observados os halos de inibição do crescimento (cm) das colônias com a aplicação de concentrações crescentes do óleo essencial da cultivar “Maria Bonita”.

Fotografias obtidas a partir de microscopia ótica com aumento de 1000x foram tiradas para a observação da estrutura morfológica das espécies de *Candida* e *Geothricum spp* (Figura 60) tratadas com o óleo essencial de manjeriço cultivar “Maria Bonita”.

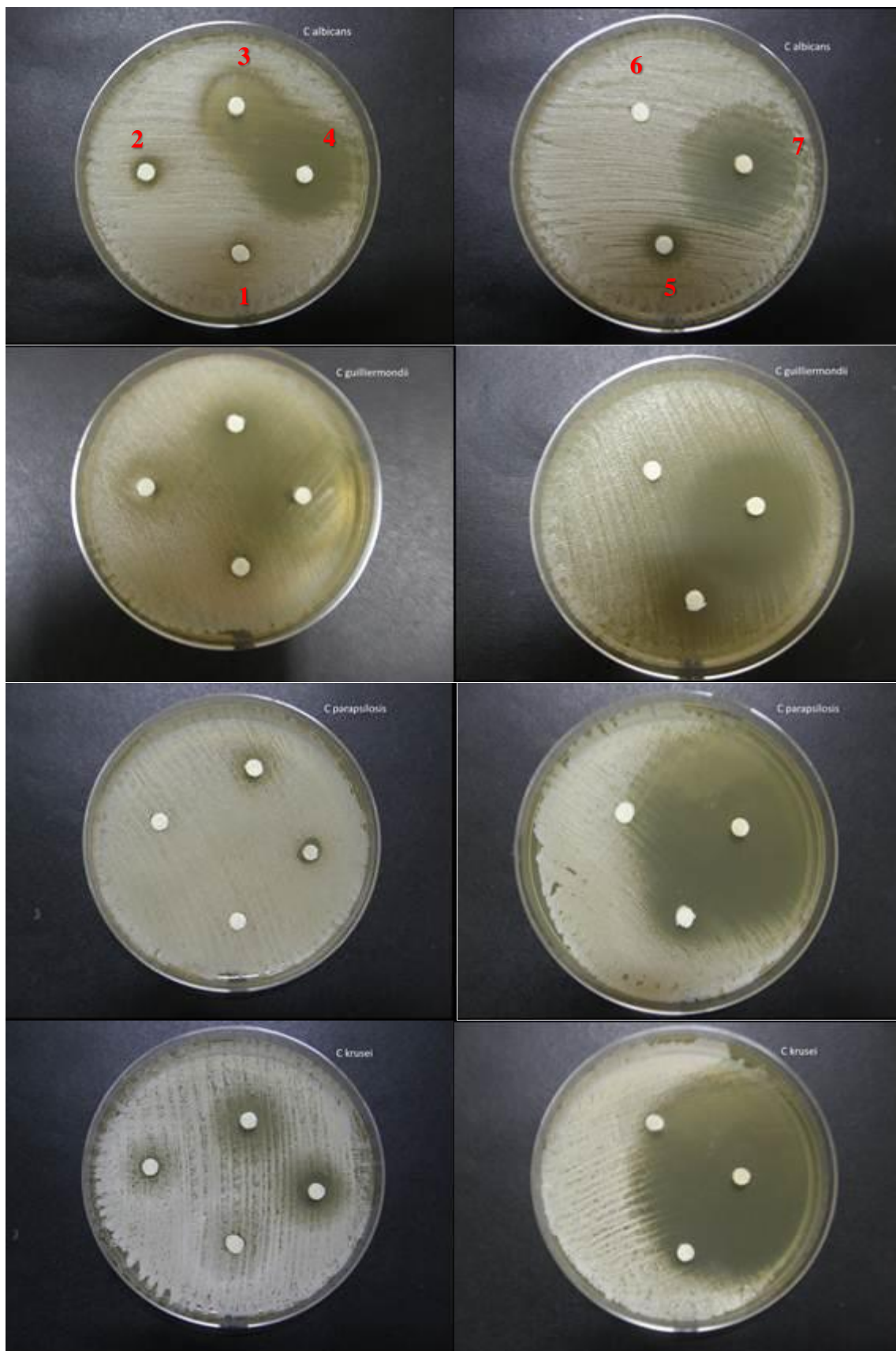


Figura 58. Ensaio de difusão em disco para espécies de *Candida*.

Realizado utilizando óleo essencial de manjerição, cultivar “Maria Bonita”, linalol, DMSO e Cicloexamida (as legendas 1, 2, 3 e 4 em vermelho correspondem a: 50, 100, 200 e 300 mg.mL⁻¹ de óleo essencial respectivamente. E as legendas 5, 6 e 7: 300 mg.mL⁻¹ de Linalol, DMSO e Cicloexamida respectivamente)



Figura 59. Ensaio de difusão em disco para *Geothricum* spp. Realizado com o óleo essencial de manjeriço, cultivar “Maria Bonita”, linalol, DMSO e Cicloexamida. (as legendas 1, 2, 3 e 4 em vermelho são: 50, 100, 200 e 300 mg.mL⁻¹ de óleo essencial respectivamente e 5, 6 e 7: 300 mg.mL⁻¹ de Linalol, DMSO e Cicloexamida respectivamente).

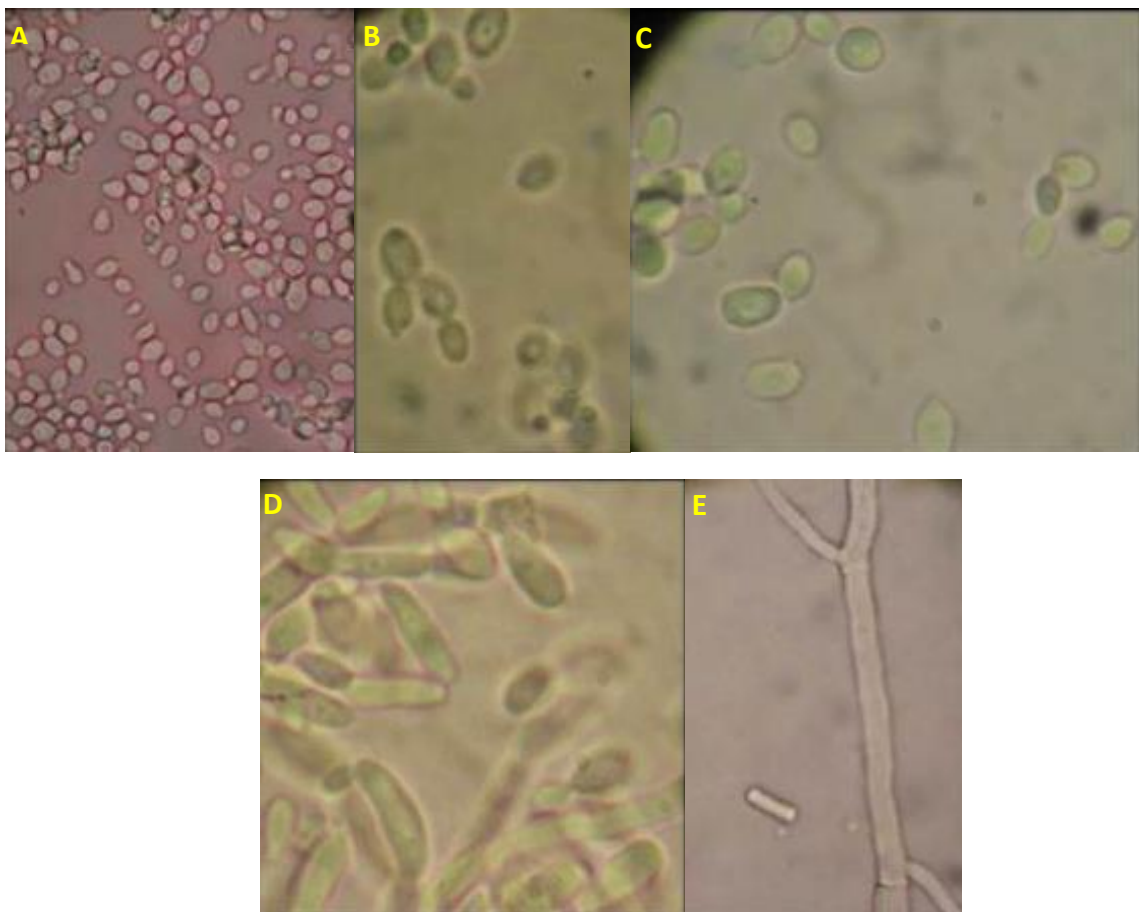


Figura 60. Microscopia óptica dos fungos utilizados nos ensaios com óleo essencial de manjeriço, cultivar “Maria Bonita” (aumento de 1000 X). A: *Candida albicans*; B: *C. guilliermondii*; C: *C. parapsilosis*; D: *C. krusei*; E: *Geothricum* spp

Ao comparar atividade antifúngica do óleo essencial da cultivar “Maria Bonita” e do linalol puro, seu componente majoritário (em torno de 70%) na mesma concentração de 300 mg.mL⁻¹, observa-se que ao linalol puro é menos efetivo, evidenciando a importância do sinergismo (POZZATTI *et al.*, 2010) entre o linalol e os outros componentes terpênicos encontrados no óleo como o eucaliptol, sabineno e α -terpineol.

Como visto na Tabela 13 e nas figuras acima, a capacidade do óleo essencial de manjeriço em inibir o crescimento teve melhor eficácia em torno de 200 a 300 mg.mL⁻¹ de acordo com a sensibilidade do microorganismo. *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* foram mais sensíveis a cicloexamida do que ao óleo essencial, sendo *C. parapsilosis* a espécie que apresentou menor halo de inibição após a exposição ao óleo da cv Maria Bonita, demonstrando muito baixa sensibilidade aos tratamentos com óleo. Um estudo comparando a sensibilidade de *C. parapsilosis* e *C. albicans*, verificaram a baixa sensibilidade de *C. parapsilosis* e que foi necessário uma maior concentração de óleo essencial de cinamom para inibir o crescimento da colônia (PIRES *et al.*, 2011).

Quando comparadas com as outras espécies, *Geothricum spp*, apresentou halo de inibição semelhante ao controle com o uso de 100 mg.mL⁻¹ de óleo essencial, e foi o fungo mais resistente ao antifúngico cicloexamida. Seguido de *C. albicans* que apresentou a mesma eficácia do controle com 200 mg.mL⁻¹ e *C. tropicalis* que apresentou redução de halo próximo ao da cicloexamida com 300 mg.mL⁻¹ de óleo essencial.

Embora não haja muitos estudos clínicos sobre a utilização de óleo essenciais em humanos para tratar dermatites superficiais, alguns estudos apresentaram resultados promissores em pacientes imunodeprimidos, que apresentavam quadro de candidíase resistente a fluconazol (JANDOUREK *et al.*, 1998) que é o antifúngico de primeira escolha. Casos de pacientes com pitiríase versicolor (KHOSRAVI *et al.*, 2009) tratados com loção de artemisia apresentaram melhora significativa comparando-se com clotrimazol que é o antifúngico de referência. Todos esses resultados dos estudos de atividade *in vitro* e dos ensaios clínicos são uma importante contribuição na busca por novos agentes naturais antifúngicos para tratamento de micoses superficiais da pele.

De acordo com os resultados de baixa sensibilidade ao antifúngico comercial por alguns dos fungos testados, e dos efeitos do óleo essencial da cultivar “Maria Bonita” com seu alto perfil de linalol sobre essas espécies, a utilização do óleo essencial pode se constituir em uma base para formulação de produtos para controle de patógenos em substituição dos produtos sintéticos. Acrescenta-se como vantagem o fato de serem mais seguros para todos. Esses resultados são reafirmados por ensaios atuais com plantas medicinais que possuem um alto perfil de linalol e mostraram boa atividade antifúngica *in vitro* para várias espécies (STEVIC *et al.*, 2014).

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 61, 62, 63 e 64) ilustram as características ultraestruturais externas de *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* com tratamento 300 mg.mL⁻¹ de óleo essencial de manjeriço cultivar “Maria Bonita” (A e C) e o tratamento controle (que não recebeu tratamento) estão ilustrados nos itens B e D.

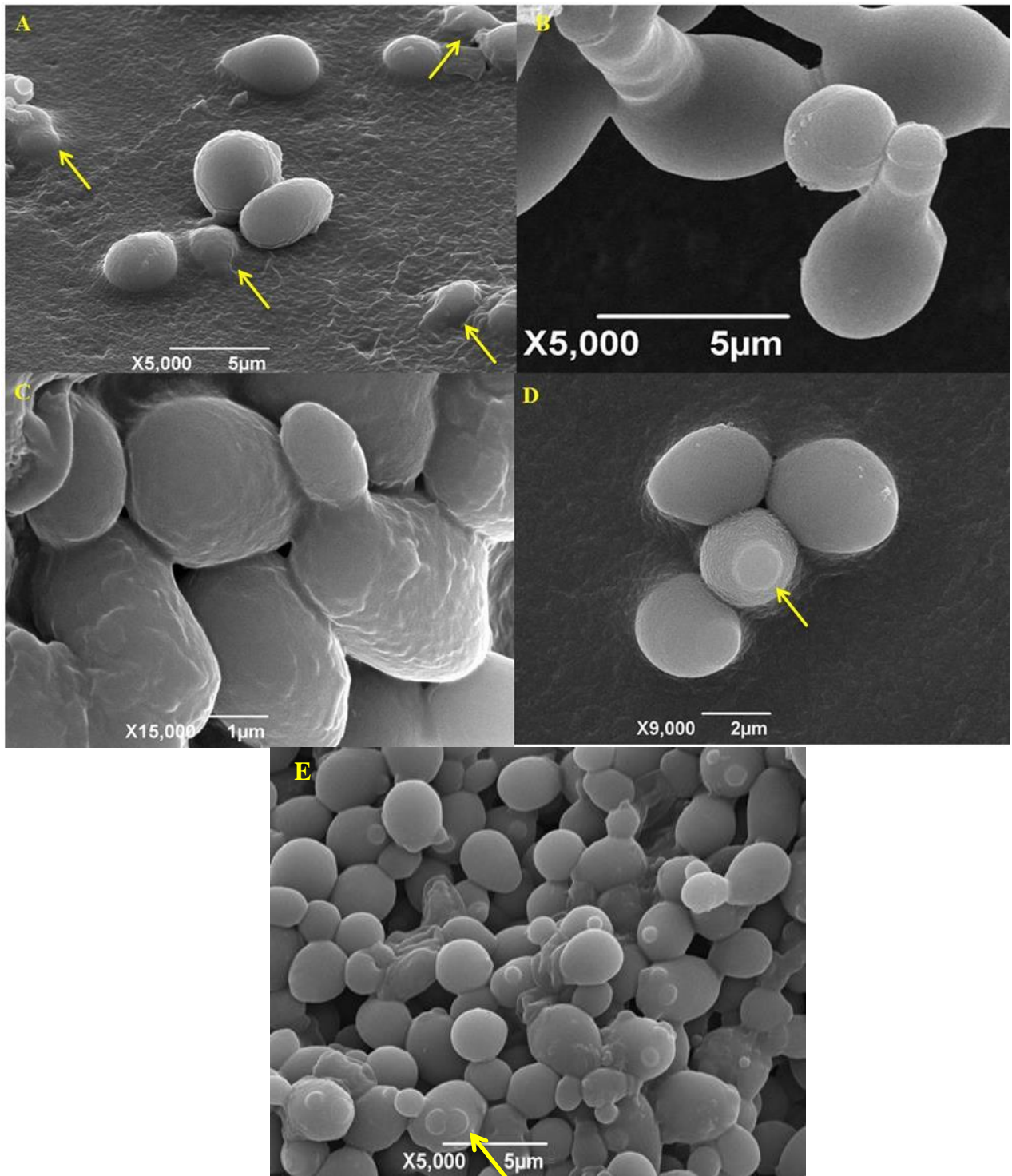


Figura 61. imagens de microscopia eletrônica de varredura em *C. albicans*.
 A e C: Tratamento com 300 mg.mL⁻¹ de óleo essencial, cv Maria Bonita, B e D: Controle (BDA); E:
 Tratamento com 300 mg.mL⁻¹ de cicloexamida

As imagens obtidas a partir das placas do controle em *C. albicans* (Figura 61 B e D) apresentaram células leveduriformes ovais e com a superfície lisa. A seta amarela indica nítida cicatriz de brotamento apical (D).

As imagens de varredura das placas tratadas com o óleo essencial (A e C) apresentam células diferentes daquelas apresentadas no controle. A exposição ao óleo essencial causou

uma aparente deformação nas células que apresentaram suas superfícies aparentemente irregulares indicadas pelas setas e possível murchamento das células com provável extravasamento de conteúdo citoplasmático. Após a exposição à cicloexamida observou-se murchamento aparente e brotamentos anormais (seta) nas células.

Esses efeitos são passíveis de ocorrer devido a multiplicidade dos componentes terpênicos e de outros compostos que compõem o óleo essencial de manjericao e que conferem características lipofílicas, apresentando, portanto afinidade pelos componentes da membrana plasmática do fungo, interferindo com a integridade da mesma (COX *et al.*, 2000). O acúmulo de substâncias lipofílicas na bicamada lipídica promove expansão da membrana e aumenta a fluidez e/ou interfere nas interações entre proteína-lipídios de membrana estrutura que tem efeito como barreira seletiva para íons e moléculas, causando um aumento no fluxo de prótons (SIKKEMA *et al.*, 1994).

Esta hipótese acima é corroborada pelos resultados obtidos aqui a partir da microscopia de varredura de *C. albicans*, após a exposição das células ao óleo essencial, pois as imagens obtidas mostraram superfícies irregulares e deformação nas células com ligeiro murchamento das mesmas e provável extravasamento celular.

As observações ultraestruturais em *C. guilliermondii* após 48 h de exposição ao óleo essencial da cv Maria Bonita (Figura 62 A e C) revelaram uma sutil deformação celular com murchamento leveduriforme. Já as colônias cultivadas no meio BDA mostram um aglomerado de células de levedura aderida à superfície do meio formando um biofilme organizado em várias camadas, com células individuais de formas mais alongadas (B) e botões distribuídos pela célula (D) formando pseudo-hifas alongadas pouco ramificadas.

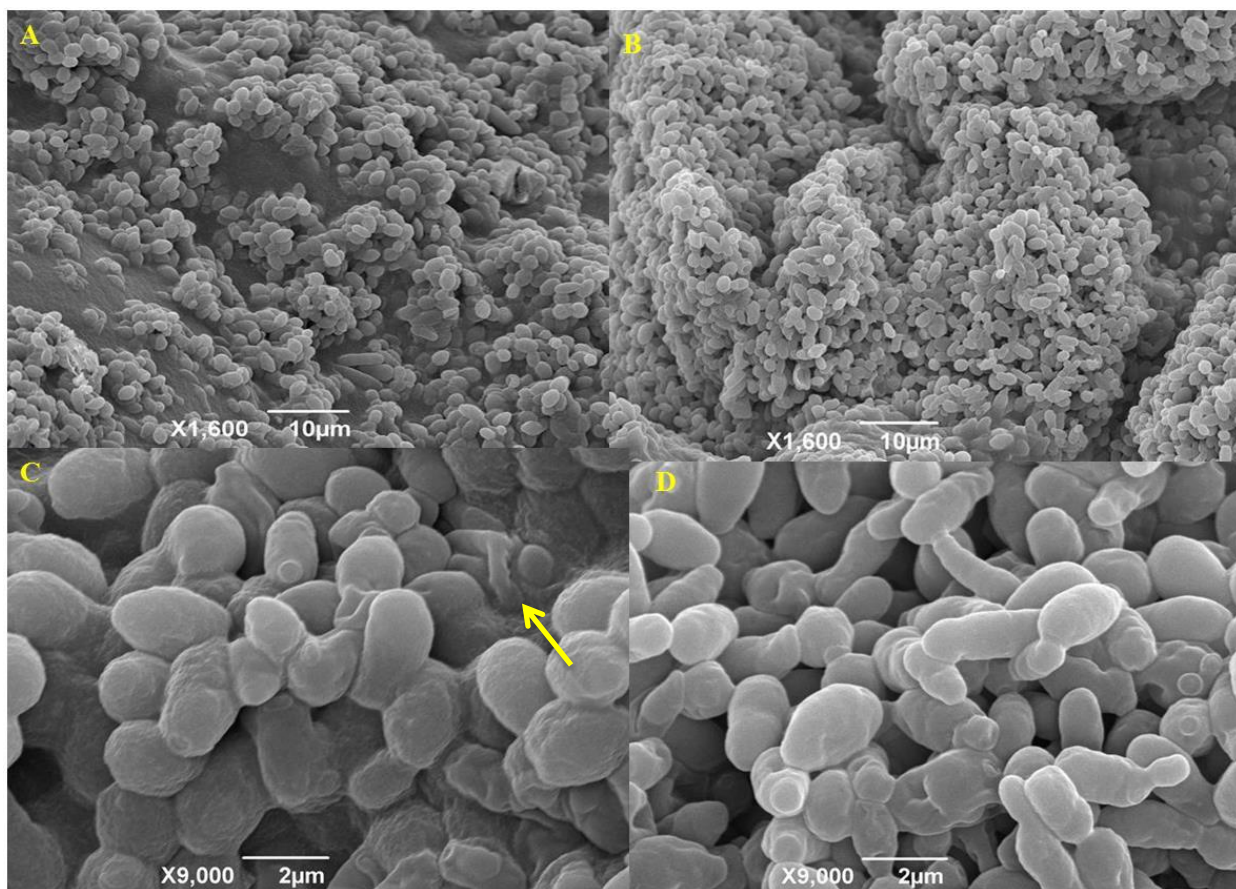


Figura 62. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *C. guilliermondii*. A e C: Tratamento com 300 mg.mL⁻¹ de OE e B e D: Controle (BDA)

As cepas de *C. parapsilosis* (Figura 63 A e C) que foram submetidas ao tratamento com o óleo essencial da cv Maria Bonita e aquelas cultivadas em BDA (B e D), aparentemente não apresentaram diferenças morfológicas visíveis entre si de acordo com as imagens obtidas.

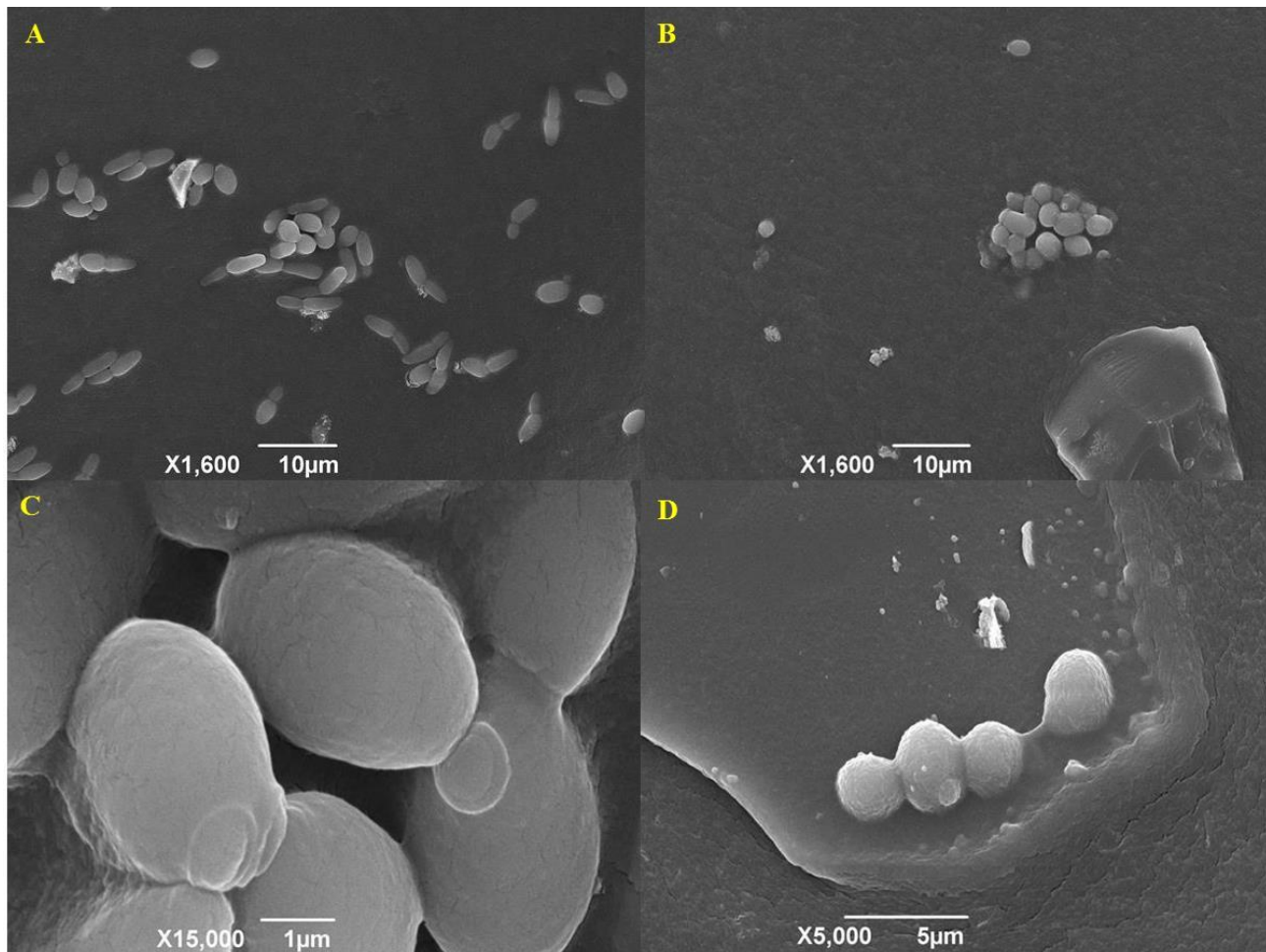


Figura 63. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *C. parapsilosis*.
A e C: Tratamento com 300 mg.mL⁻¹ de OE e B e D: Controle (BDA)

Para os ensaios realizados com *C. krusei* (Figura 64 A e C) foram nítidas as alterações morfológicas nas colônias que foram submetidas a aplicação do óleo essencial da cv “Maria Bonita”. Há a possibilidade de que essas alterações tenham promovido o murchamento e a ruptura da célula do fungo, além de ter apresentado superfícies curvas e irregulares.

A observação microscópica das colônias cultivadas somente em meio BDA (B e D) apresentaram forma lisa, ovóide alongadas com formação de pseudo-hifas abundantes, vigorosas e aparentemente poucas ramificações conforme descrito por Zheng *et al.* (2012).

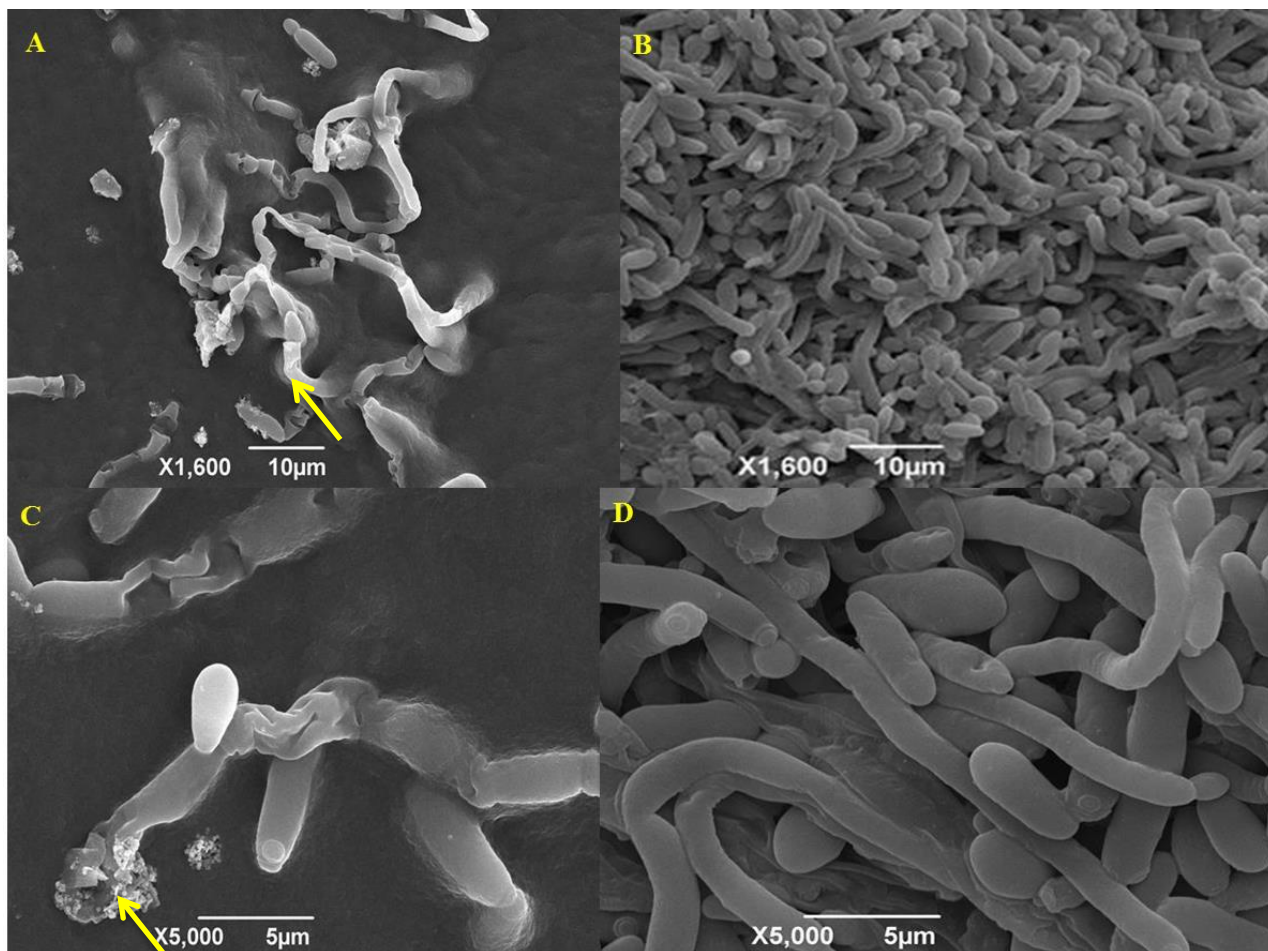


Figura 64. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *C. Krusei*.
A e C: Tratamento com 300 mg.mL⁻¹ de OE, B e D: Controle (BDA)

As observações ultraestruturais em *Geotrichum* spp (Figura 65 A, C, E) não revelaram deformações morfológicas aparentes, entretanto, comparando a densidade do micélio fúngico nas células expostas ao óleo essencial (A e C) observa-se uma diminuição da densidade do mesmo em relação ao controle (B e D), esses dados são confirmados pela medição do halo de crescimento neste experimento (Tabela 13). Em (B) que é o controle, as hifas verdadeiras desarticulam-se em muitos artroconídios cilíndricos, sugerindo intensa proliferação nas placas controle.

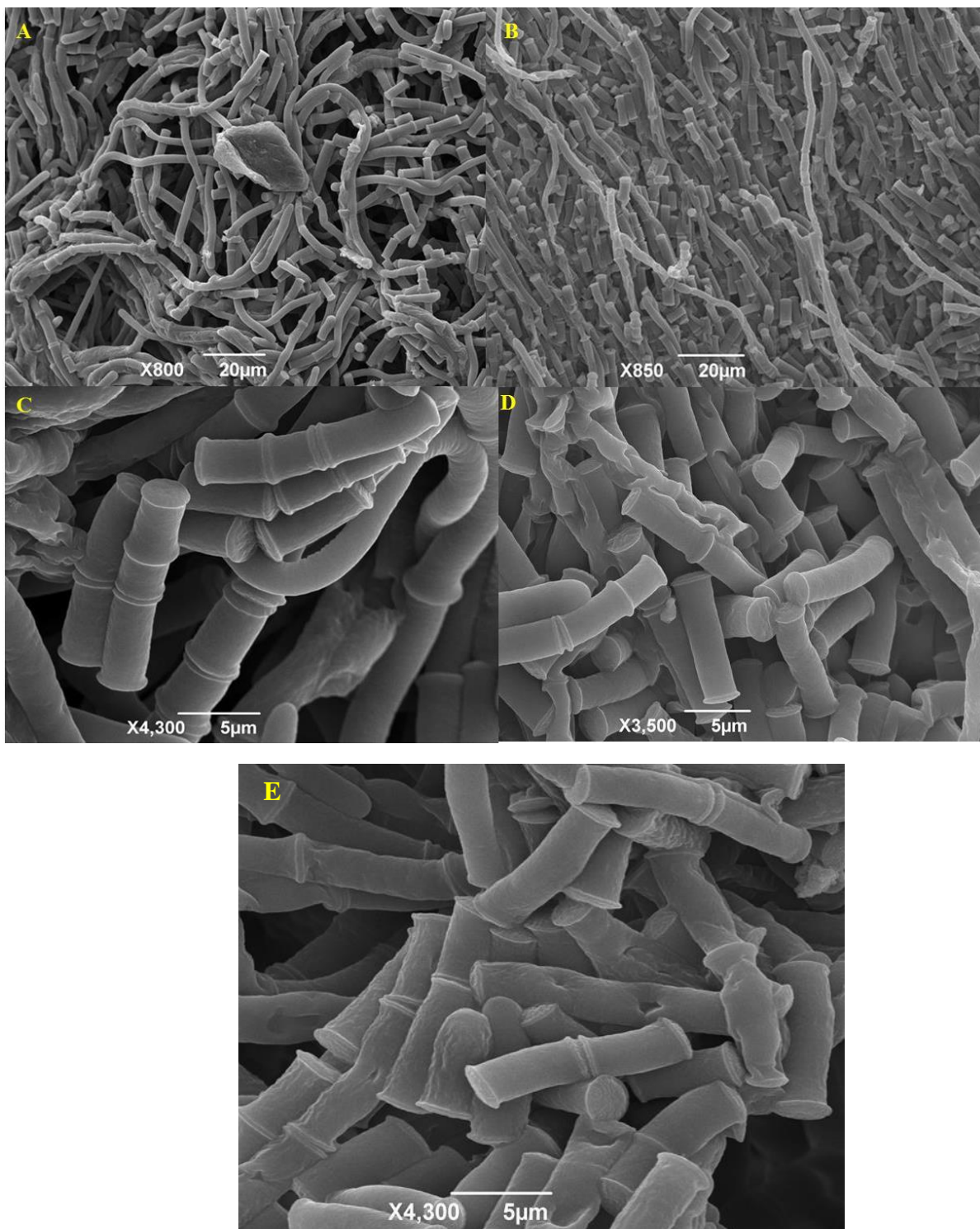


Figura 65. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Geothricum* spp. A e C: Tratamento com 300 mg.mL⁻¹ de óleo essencial, B e D: Controle (BDA); E: Tratamento com 300 mg.mL⁻¹ de cicloexamida

A atividade antifúngica da cicloexamida e a do óleo essencial foi semelhante para três espécies de fungos (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *Geothricum* spp), embora ambos apresentem estruturas químicas diferentes e mecanismo de ação diferenciados. A cicloexamida é um antifúngico que atua no interior da célula inibindo a síntese de proteínas nos ribossomos

(OBRIG; CULP, 1971), e o óleo essencial com base na literatura fornece indícios de atuar na parte externa da célula, interagindo com os componentes de membrana (COX *et al.*, 2000). Portanto, estudos complementares serão necessários para observar as estruturas morfológicas no interior das células, utilizando a microscopia de transmissão como ferramenta para auxiliar na investigação do mecanismo de ação do óleo essencial do manjeriço em fungos.

4.5.2 *Sacharomyces cerevisiae*

O ensaio *in vitro* com *S. cerevisiae* (Figura 66) mostrou que o óleo essencial da cultivar Maria Bonita na concentração de 6mg.mL^{-1} reduziu o crescimento da colônia em relação ao controle que teve um crescimento muito intenso atingindo toda a placa. E que a aplicação do linalol puro não foi tão eficiente quanto o óleo para reduzir o crescimento das leveduras.

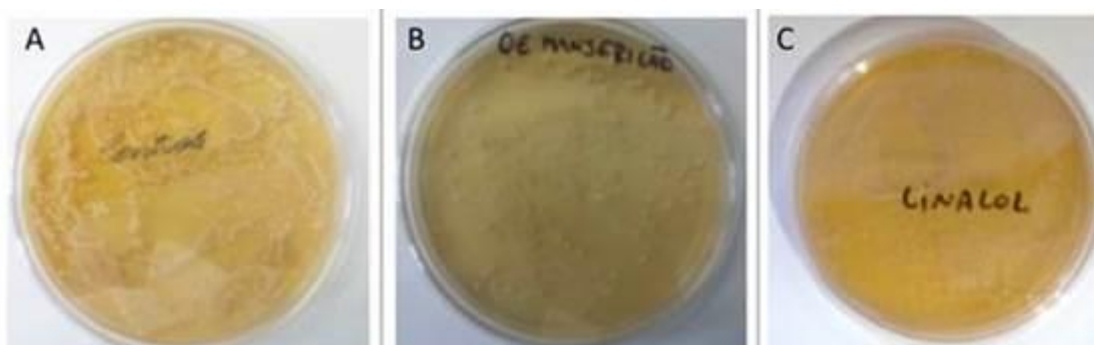


Figura 66. Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica do óleo essencial da cultivar Maria Bonita em *Sacharomyces cerevisiae*.

A: Controle; B: 6mg.mL^{-1} de óleo essencial de manjeriço cv. Maria Bonita e C: 6mg.mL^{-1} de Linalol

Na Figura 67 (A e C) está ilustrada a estrutura morfológica de *S.cerevisiae* após o tratamento com o óleo essencial, no qual as células parecem sutilmente irregulares, comparadas com as células cultivadas em meio BDA (B e D), devido ao efeito do tratamento com o óleo essencial de manjeriço cv Maria Bonita.

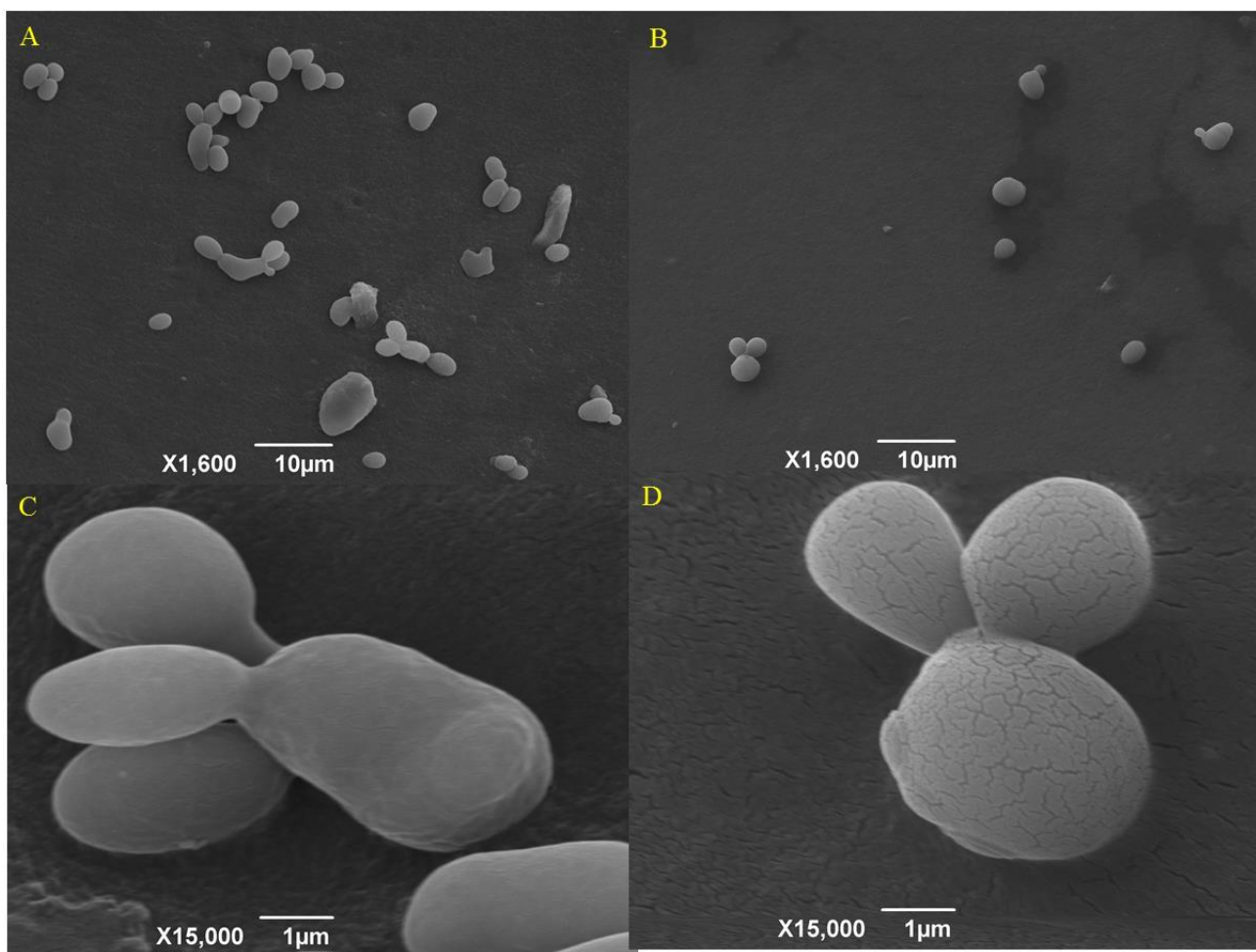


Figura 67. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura em *Sacharomyces cerevisiae*.
A e C: Tratamento com 6mg.mL^{-1} de óleo essencial cultivar Maria Bonita B e D: Controle (BDA)

4.5.3 Efeito do óleo essencial da cultivar Maria Bonita sobre fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*

4.5.4 *Fusarium oxysporum*

A Figura 68 ilustra o ensaio *in vitro* da aplicação de 6 mg.mL⁻¹ de óleo essencial de manjeriço cv Maria Bonita e do linalol (6 mg.mL⁻¹) para avaliar o efeito sobre o crescimento micelial (mm) do fungo *F. oxysporum*. O antifúngico promoveu inibição completa do crescimento fúngico (E).

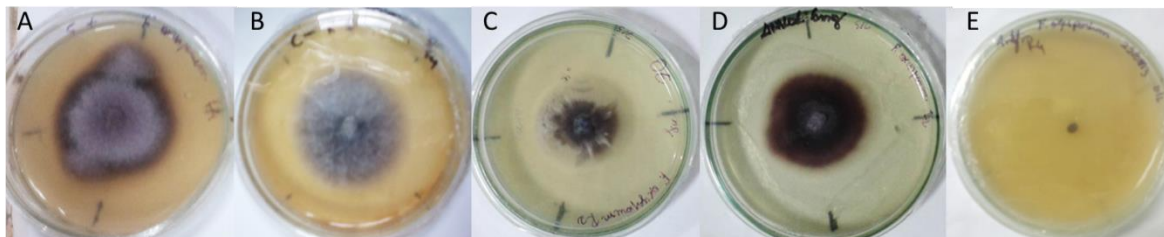


Figura 68. Efeito do óleo essencial de manjeriço cultivar Maria Bonita e do linalol. Ambos na concentração de 6 mg.mL⁻¹ em placas de Petri contendo o fungo *Fusarium oxysporum* no sexto dia de avaliação. A: controle positivo (meio BDA); B: controle negativo (DMSO), C, D e E: óleo essencial, linalol e antifúngico Mancozeb respectivamente na concentração de 6 mg.mL⁻¹

Observou-se que o óleo essencial e o linalol apresentaram um efeito de redução no crescimento micelial de *F. oxysporum* através da observação e medição das placas de Petri C e D, quando comparadas as Placas A e B que são os controles. Entretanto, o efeito do óleo foi mais intenso do que o linalol isolado, o que indica que outros constituintes do óleo essencial auxiliam na sua atividade antifúngica.

A Figura 69 ilustra o efeito das várias concentrações (0,5; 1; 2; 4 e 6 mg.mL⁻¹) do óleo essencial de manjeriço do linalol (6 mg.mL⁻¹) sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* no segundo, no quarto e no sexto dia de medição do crescimento. O efeito mais pronunciado na redução do crescimento da colônia foi observado com 6 mg.mL⁻¹ de óleo essencial.

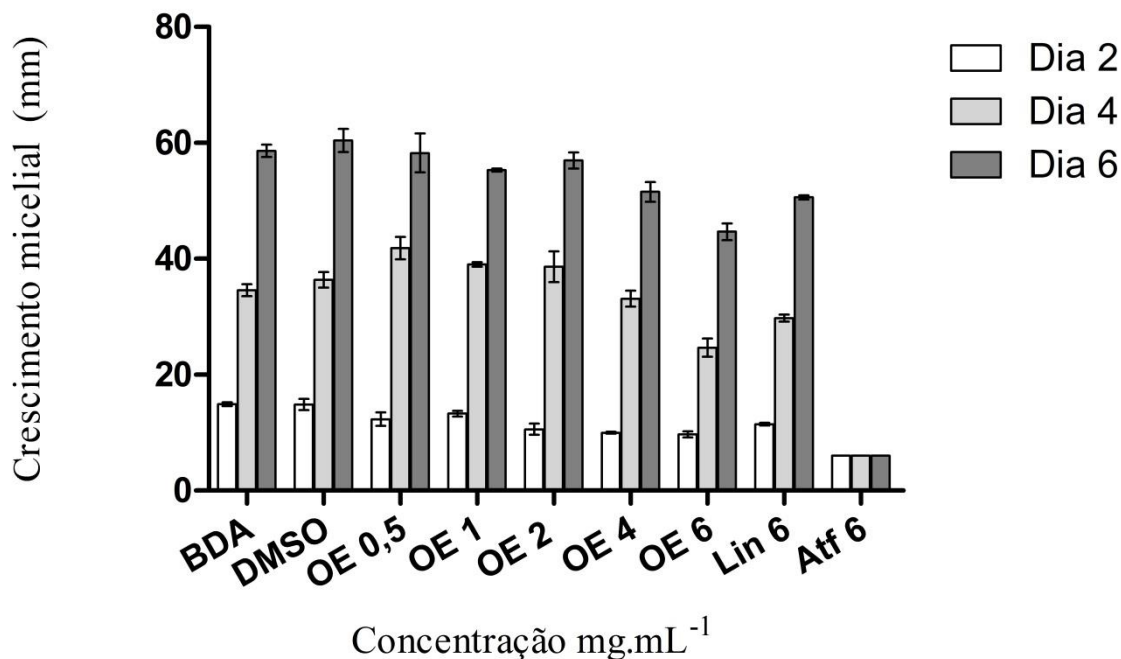


Figura 69. Efeito do ensaio in vitro do óleo essencial de manjerição cv Maria Bonita.

Testado nas concentrações de 0,5; 1; 2; 4 e 6 mg.mL⁻¹ e do seu componente linalol (6 mg.mL⁻¹) sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* no segundo, quarto e sexto dia de medição do crescimento. Controle positivo (BDA), negativo (DMSO), óleo essencial (OE), Linalol (Lin) e o antifúngico Mankozeb (Atf: 6 mg.mL⁻¹).

Hussain *et al.* (2008) e Kocić-Tanackov *et al.* (2011), verificaram potencial antifúngico em manjerição. Estes resultados sugerem que o manjerição pode desempenhar um papel importante no controle biológico de patógenos, sem afetar o meio ambiente devido a sua baixa toxicidade e persistência.

A observação das características ultraestruturais (Figura 70) no segundo dia de exposição ao óleo essencial de manjerição (A e C) mostrou a ausência de esporos germinativos, sugerindo que logo nos dias iniciais de exposição, o efeito do óleo essencial suprimiu a formação/germinação dos clamidoconídios. A formação desses esporos é uma característica natural desse fungo para sua sobrevivência, e essa característica permite que o fungo persista no solo como clamidósporos e isso dificulta o controle das doenças causadas por esse fungo em plantas. Enquanto que as placas do controle apresentaram maior abundância de clamidoconídios (B e C).

4.5.4.1 Ultraestrutura de *Fusarium oxysporum*

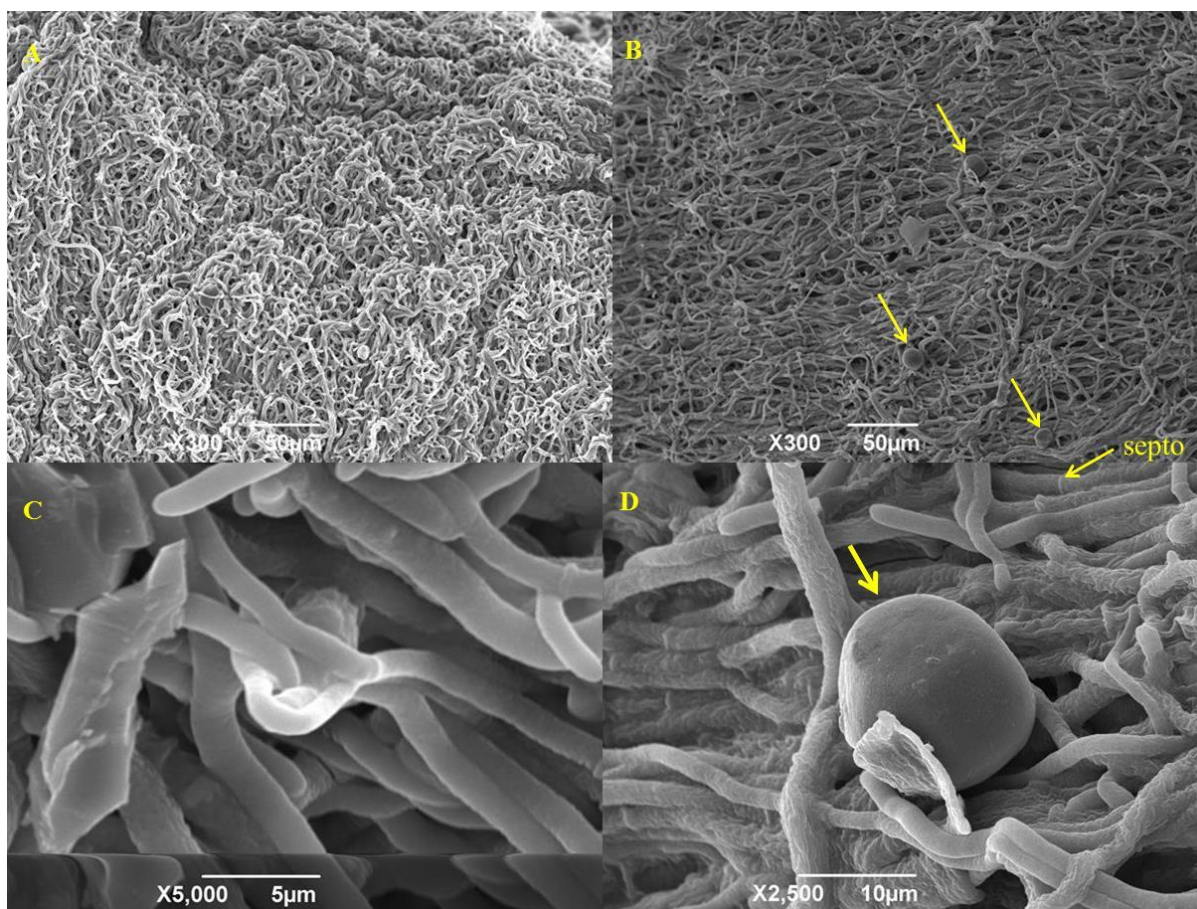


Figura 70. Imagens de microscopia eletrônica de varredura em *Fusarium oxysporum* observadas no segundo dia de experimento.

A e C: amostras retiradas das placas de *Petri* do tratamento com óleo essencial 6 mg.mL^{-1} ; B e D: controle positivo (BDA). As setas indicam os clamidoconídios e o septo das hifas

No sexto dia de exposição ao óleo essencial de manjeriço (Figura 71 A e C), deformações morfológicas visíveis como formato anormal e aumento da espessura das hifas com a lise das células foram observadas. E nos controles (Figura 71 B e D) observou-se ainda clamidoconídios existentes e hifas com anastomoses normais sem sinais de lise celular.

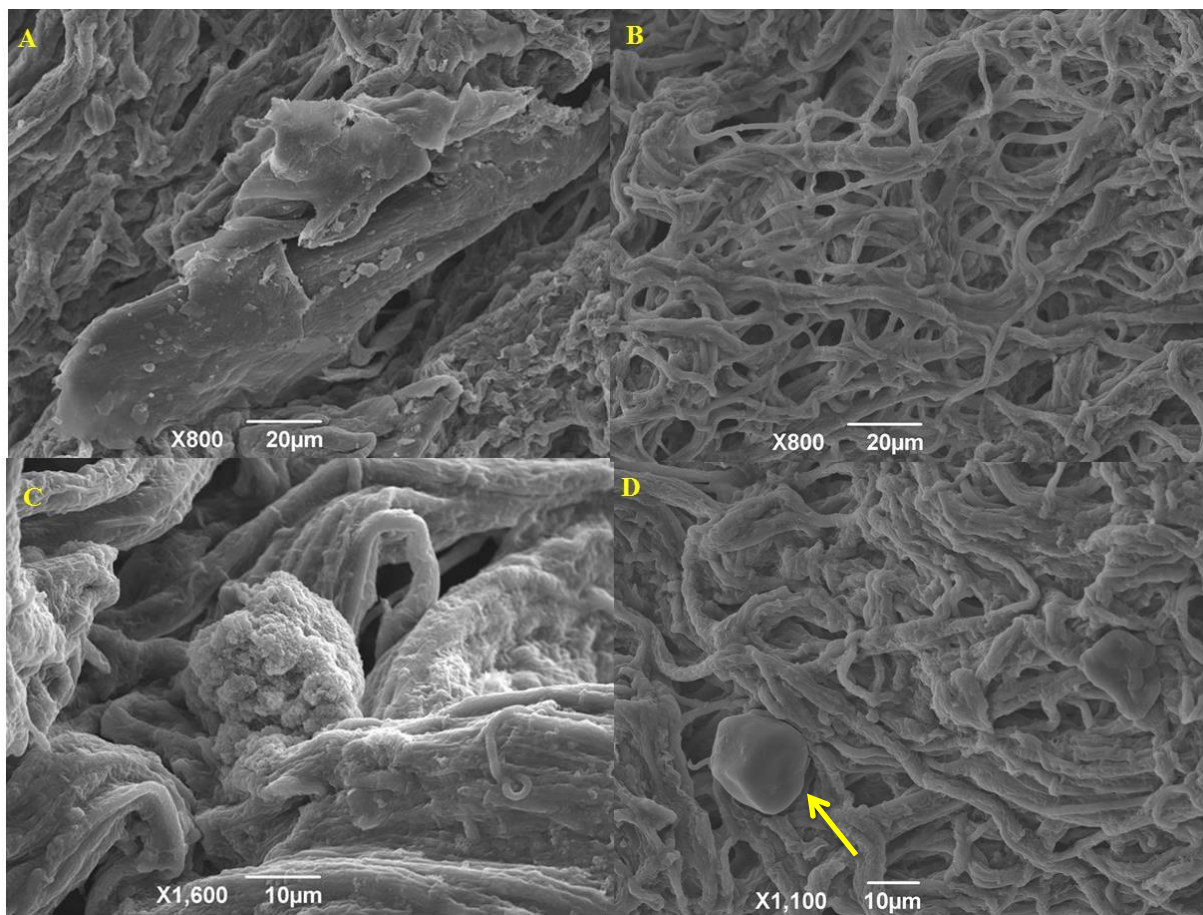


Figura 71. Imagens de microscopia eletrônica de varredura em *Fusarium oxysporum*, tirada no sexto dia de experimento.

A e C: amostras das placas de Petri do tratamento com óleo essencial 6 mg.mL⁻¹; B e D: Controle positivo (BDA)

Os resultados encontrados indicam que o óleo essencial de manjerição cv Maria Bonita pode ser utilizado para minimizar as infestações de populações de *F.oxysporum* nas culturas, levando a redução do micélio fúngico e inibição na germinação dos clamidoconídeos.

4.5.5 *Rhizoctonia solani*

A Figura 72 ilustra o crescimento micelial (mm) no ensaio em placas de *Pertri* do fungo *R. solani* no quarto dia com aplicação de 6 mg.mL⁻¹ óleo essencial (C).

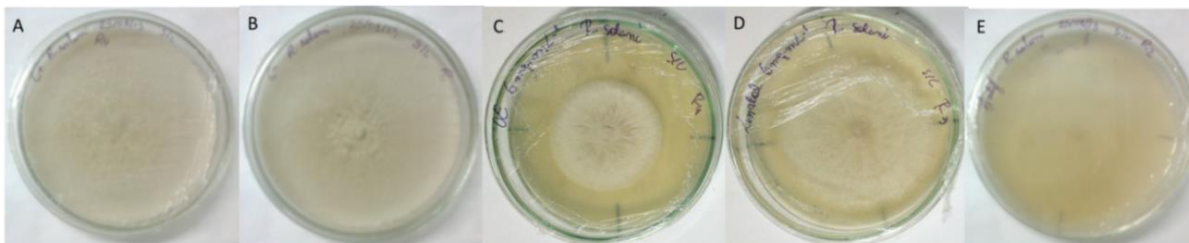


Figura 72. Efeito do óleo essencial de manjeriço cultivar Maria Bonita e do linalol, sobre o crescimento micelial do fungo *Rhizoctonia solani*.

A: controle positivo (BDA); B: controle negativo (DMSO), C: óleo essencial (6 mg.mL⁻¹), D: linalol (6 mg.mL⁻¹), E: antifúngico Mancozeb (6 mg.mL⁻¹)

As concentrações testadas de óleo essencial de manjeriço, cultivar Maria Bonita foram (0,5, 1, 2, 4 e 6 mg.mL⁻¹), sobre o crescimento micelial de *R. solani* medido no segundo e no quarto dia de experimento. A Figura 73 ilustra o comportamento do crescimento micelial do fungo medido no segundo e quarto dia de experimento, pode-se observar que o óleo essencial na concentração de 6 mg.mL⁻¹ foi mais efetivo com efeito intensificado no segundo dia em relação ao quarto dia de medição.

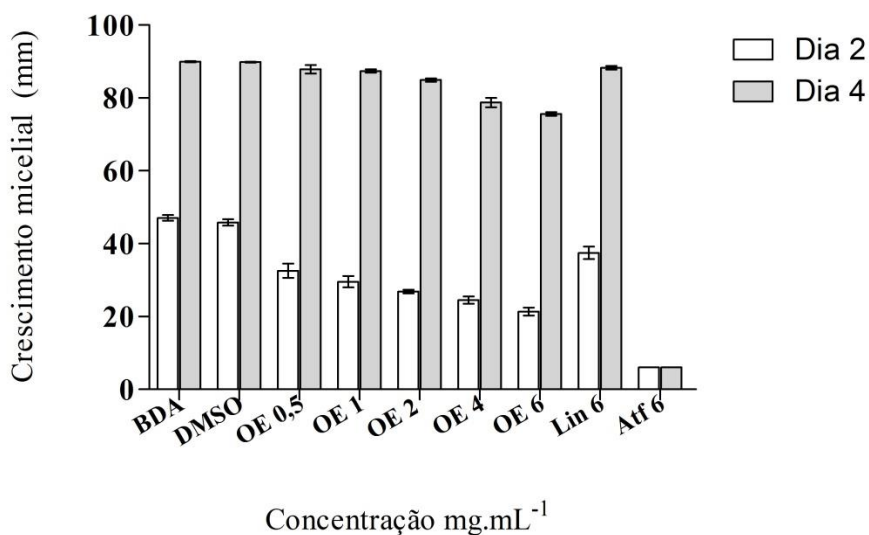


Figura 73. Efeito do óleo essencial de manjeriço, cultivar Maria Bonita testado nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 mg.mL⁻¹, do linalol (6 mg.mL⁻¹) e antifúngico (6 mg.mL⁻¹) sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*.

Controle positivo (BDA), controle negativo (DMSO), óleo essencial (OE), linalol (Lin) e antifúngico (Atf). As diferenças significativas foram calculadas usando (Tukey, p<0,05)

4.5.5.1 Ultraestrutura de *Rhizoctonia solani*

As observações de microscopia eletrônica de varredura para estudar o efeito na morfologia de *R. Solani* no segundo e no quarto dia de exposição ao óleo essencial revelaram anormalidades na estrutura das hifas (Figura 74 A e Figura 75 A e C) com aparência mais fina e uma superfície enrugada e murcha.

Deformações com rugosidade e lesão na membrana plasmática em *R. solani* foram observadas por Xiong (2013) utilizando um antibiótico natural produzido *S. padanus*, sugerindo uma interação com os esteroides de membrana resultando assim em mudanças na permeabilidade. As hifas do controle mostraram integridade estrutural (Figura 74 B Figura 75 Be D).

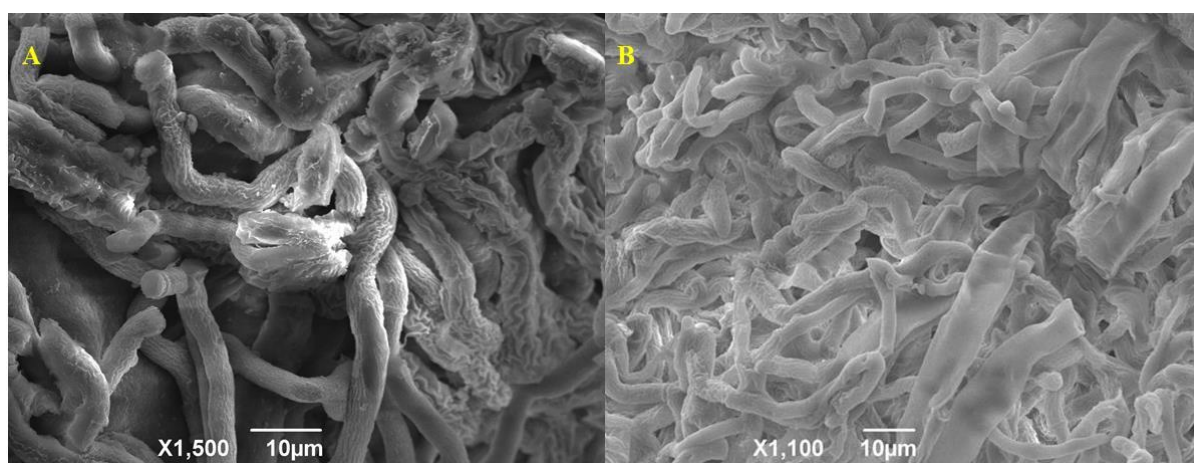


Figura 74. Imagens ultraestruturais em microscópio eletrônico de varredura no fungo *Rhizoctonia solani*, observadas no segundo dia de experimento.

A: amostras coletadas das placas de Petri tratadas com 6 mg.mL^{-1} de óleo essencial da cv Maria Bonita e B: Controle positivo (BDA)

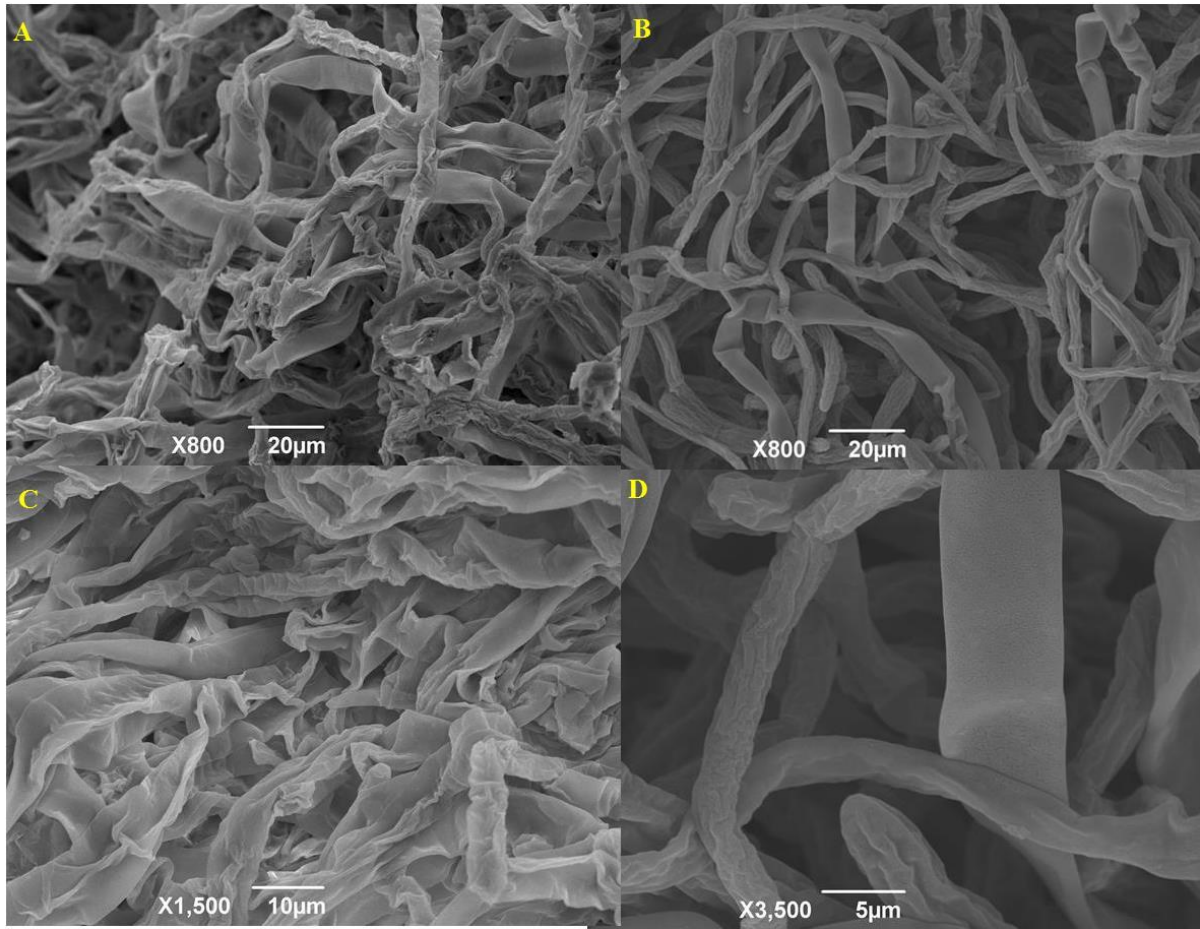


Figura 75. Observações ultraestruturais em microscópio eletrônico de varredura no fungo *Rhizoctonia solani*. Imagens obtidas no quarto dia de experimento.
A e C: amostras das placas de Petri do tratamento com 6 mg.mL^{-1} de óleo essencial da cv Maria Bonita
e B e D: Controle positivo (BDA)

Os estudos de microscopia eletrônica de varredura em todas as espécies de fungos analisadas forneceu uma grande contribuição sobre a ultraestrutura desses fungos em seu desenvolvimento normal em meio de cultura BDA e após a exposição ao óleo essencial, propiciando um passo inicial nesse estudo para elucidação do mecanismo de ação fúngistático pelo qual o óleo essencial atuou na célula tanto das leveduras quanto dos fungos filamentosos. O próximo passo será a avaliação ultraestrutural por microscopia de transmissão para avaliar o efeito nas organelas no interior da célula.

4.5.6 Efeito de diferentes fontes e níveis de N na expressão dos genes que codificam as vias dos terpenos e fenilpropanóides na variedade Sweet Italian Large Leaf e cultivar Maria Bonita

4.5.6.1 Variedade Sweet Italian Large Leaf

A expressão dos genes que codificam para as enzimas envolvidas nas vias de biossíntese do óleo essencial em folhas de manjeriço foi avaliada por PCR em tempo real. Foram detectadas os níveis de expressão da 3-hidroxi metil glutaril Coenzima A redutase (HMGR), 1 Deoxi xilulose sintase (DXS), Linalol sintase (LIS), Fenilalanina amônia liase (PAL) e Eugenol sintase (EGS), nos tratamentos sem nitrogênio (controle), 50 Kg de nitrato e 50 Kg.ha⁻¹ de nitrato de amônio (Figura 76).

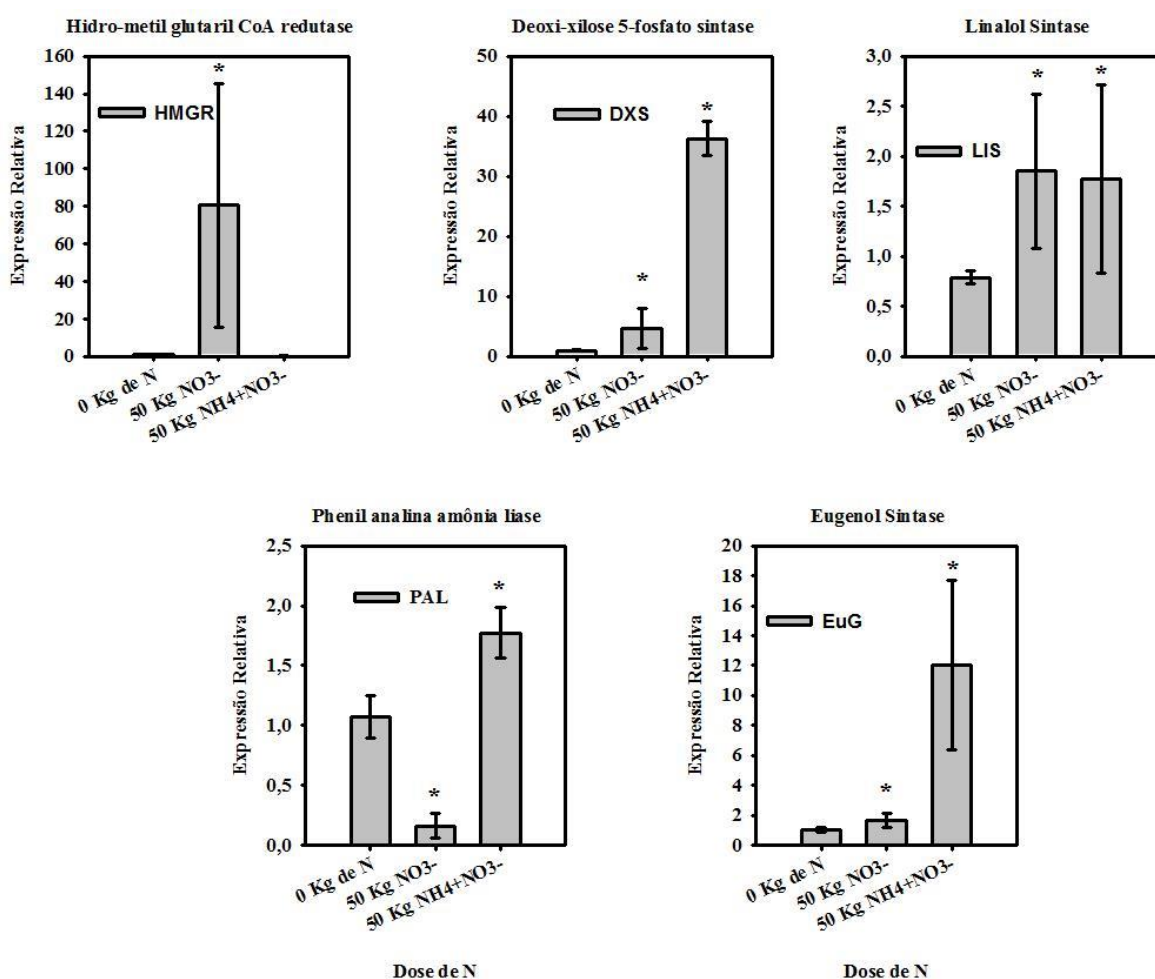


Figura 76. Expressão relativa dos genes das vias de biossíntese de óleo essencial para a variedade Sweet Italian large Leaf.

Genes da 3-hidroxi metil glutaril Coenzima A redutase (HMGR), 1 Desoxi xilulose sintase (DXS), Linalol sintase (LIS), Fenilalanina amônia liase (PAL) e Eugenol sintase (EGS) de acordo com o fornecimento de 0, 50 Kg de nitrato e 50 Kg.ha⁻¹ de nitrato de amônio. Nos tratamentos com 100Kg de nitrato e nitrato de amônio e amônio a concentração de RNA total extraída foi insuficiente para a síntese de cDNA.

Observou-se uma variação na expressão dos genes de acordo com o fornecimento de N. A expressão dos genes das enzimas das vias dos terpenos foi estimulada diferentemente, de forma que os genes *upstream* na via dos terpenos, como a *HMGR* e a *DXS* foram induzidos com 50 Kg.ha⁻¹ de nitrato e 50 Kg.ha⁻¹ de nitrato de amônio respectivamente. E o gene *downstream* na via dos terpenos, como a *LIS* foi induzida em todos os tratamentos, isso sugere que pode haver uma complementação entre as vias mevalonato (MVA) e metil eritrol fosfato (MEP), onde no ponto em que uma via é inibida a outra pode ser ativada para complementar a biossíntese dos precursores IPP e DMAPP e assim manter a produção de terpenos (HEMMERLIN *et al.*, 2003).

Além disso, deve ser considerado que modificações pós-transcricionais podem ocorrer na via *DXS* culminando na diferença entre os níveis de transcritos e o de suas proteínas correspondentes, tendo como consequência direta disso um aumento ou diminuição nos metabólitos finais como o linalol (GUEVARA-GARCIA *et al.*, 2005).

A baixa expressão observada para os genes que codificam a *HMGR* quando a planta foi cultivada sem N e com 50 Kg.NO₃⁻, pode ser um indicativo que os genes que codificam para *DXS* seriam os responsáveis pela biossíntese de IPP e DMAPP para formar Geranyl pirofosfato (GPP) que é o substrato para monoterpênicos sintases como a *LIS* e formar o linalol, visto esses tratamentos terem obtido os maiores rendimentos (0,37 e 0,41%) de óleo essencial e as maiores concentrações de linalol (38 e 21%) respectivamente. Desse ponto de vista, isso seria uma vantagem para a planta ou uma estratégia desenvolvida a, pois as vias MEP e chiquimato estão localizadas nos plastídios, o que permitiria uma interação no mesmo compartimento celular e um controle recíproco dessas vias para produção de terpenos e fenilpropanóides.

O cultivo das plantas com 50 Kg.NO₃⁻ e 50 Kg.Ni+A promoveu um aumento da expressão da *LIS*, entretanto ao comparar com a concentração dos metabólitos (linalol) caracterizados por CG-MS/FID, essa maior expressão não foi acompanhada de maiores concentrações de linalol nos tratamentos em relação ao controle, tendo em vista as menores concentrações de linalol nesses tratamentos. Essas diferenças encontradas entre os níveis de transcritos para *LIS* e os de metabólitos, possivelmente podem ser explicadas devido à ocorrência de modificações pós-traducionais como fosforilação e ubiquitinação (XIE *et al.*, 2008).

As enzimas que codificam a via dos fenilpropanóides, *PAL* e *EGS*, foram expressas nos tratamentos, exibindo níveis mais elevados com 50 Kg.ha⁻¹ de nitrato de amônio em relação ao controle, que não levaram ao aumento na produção do metabólito final que é o eugenol. Isso pode se caracterizar como um indicativo de que a *PAL* e *EGS* são reguladas transcricional e pós-transcricionalmente em resposta a estímulos ambientais (DIXON; PAIVA, 1995),

4.5.6.2 Cultivar Maria Bonita

Os tratamentos influenciaram a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de óleo essencial (Figura 77), de forma que todos os genes das vias metabólicas foram expressos, exceto o gene para *DXS* que foi reprimido com o amônio.

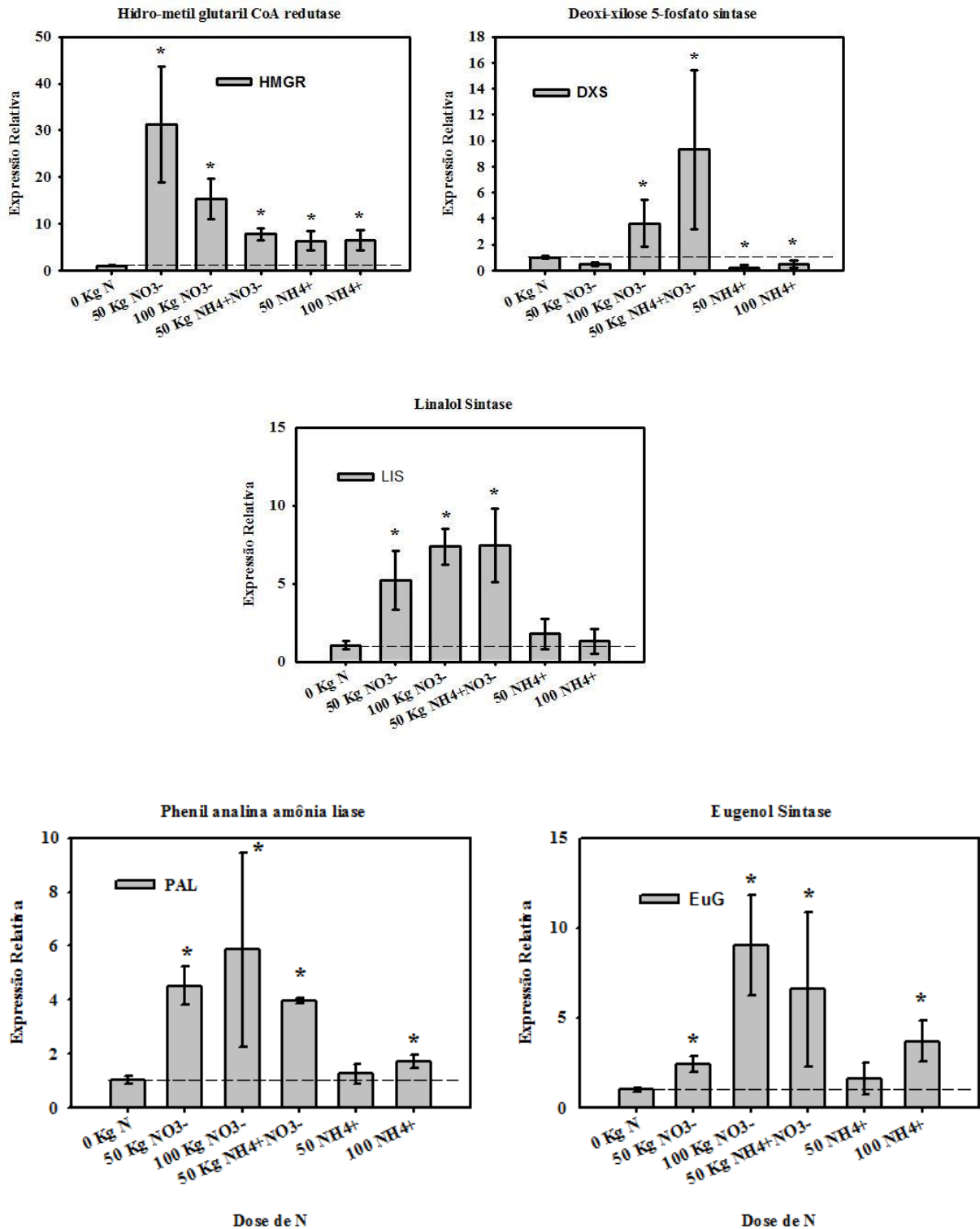


Figura 77. Expressão relativa dos genes das vias de biossíntese de óleo essencial para a cultivar Maria Bonita.

Expressão dos genes da 3-hidroxi metil glutaril Coenzima A redutase (*HMGR*), 1 Deoxi xilulose sintase (*DXS*), Linalol sintase (*LIS*), Fenil alanina amônia liase (*PAL*) e Eugenol sintase (*EGS*) de acordo com o fornecimento de 0, 50 e 100 Kg ha⁻¹ de nitrato e 50 Kg.ha⁻¹ de nitrato de amônio e 50 e 100 Kg ha⁻¹ de amônio.

Os níveis mais elevados da expressão dos genes para *HMGR* nos tratamentos sugerem, que a via MVA é bem ativa nessa variedade e que a *DXS* teve um comportamento muito variável apresentando baixos níveis de expressão e sendo reprimida com o amônio. Duas possibilidades podem explicar esses resultados no sentido de avaliar a contribuição relativa das duas vias na biossíntese dos produtos finais, a primeira seria o que foi discutido acima em relação à teoria de que as vias não são completamente independentes e se complementam (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006) e nesse caso a via MVA, supriria a produção de precursores IPP e DMAPP para formar os monoterpenos. A segunda possibilidade seria um controle pós-transcricional na via MEP (GUEVARA-GARCIA *et al.*, 2005), e que quando há níveis reduzidos de transcritos, os genes que codificam para *DXS* são sensíveis ao bloqueio da via e aumentam os níveis de proteína e de metabólitos.

Resultados diferentes relatando baixa expressão dos genes para *HMGR* e altos níveis de expressão dos genes para *DXS* em manjeriço independente do quimiotipo analisado (IIJIMA; DAVIDOVICH-RIKANATI; *et al.*, 2004), sugerem que a via MVA não teria papel significativo na biossíntese de terpenos nos tricomas glandulares de manjeriço, mas de acordo com os resultados aqui encontrados, é necessário avaliar mais profundamente a real participação da via MVA no metabolismo dos terpenos.

A expressão dos genes que codificam para *LIS* foi mais evidente com NO_3^- e Ni+A, a análise desses transcritos são compatíveis com o perfil metabólico, e confirmam o quimiotipo linalol dessa variedade. O mesmo estudo acima na cultivar quimiotipo linalol, encontrou níveis de transcritos para (R)-linalol sintase mais abundante, de acordo com os encontrados aqui para a Maria Bonita.

Os genes da via dos fenilpropanóides (*PAL* e *EGS*) foram também expressos em todas as condições, e em níveis mais elevados também com NO_3^- e Ni+A, contudo houve baixa biossíntese de eugenol, com base nisso, é possível que a regulação pós-transcricional destas enzimas pode ser um fator importante que controle os níveis de proteínas e de metabólitos finais, direcionando do fluxo de carbono entre as vias (XIE *et al.*, 2008).

Os resultados demonstraram que o nitrogênio é um modulador da expressão gênica e que o fornecimento diferencial de N induziu a expressão dos genes que codificam para as enzimas chaves de produção de óleo essencial, e assim, a produção destes compostos é regulada transcricionalmente em manjeriço. Os controles transcricionais e pós-transcricionais parecem exercer um papel crucial no direcionamento do fluxo de carbono entre as vias metabólicas nessas duas variedades de manjeriço.

4.5.7 Anatomia das folhas de Manjeriço da variedade Sweet Italian Large Leaf e da cv Maria Bonita cultivadas em diferentes fontes e doses de Nitrogênio.

Na Figura 78, os itens A e B mostram que em ambas as espécies de manjeriço apresentam folhas anfiestomáticas e exibem uma estrutura dorsiventral, e os itens C e D mostram os tricomas secretores.

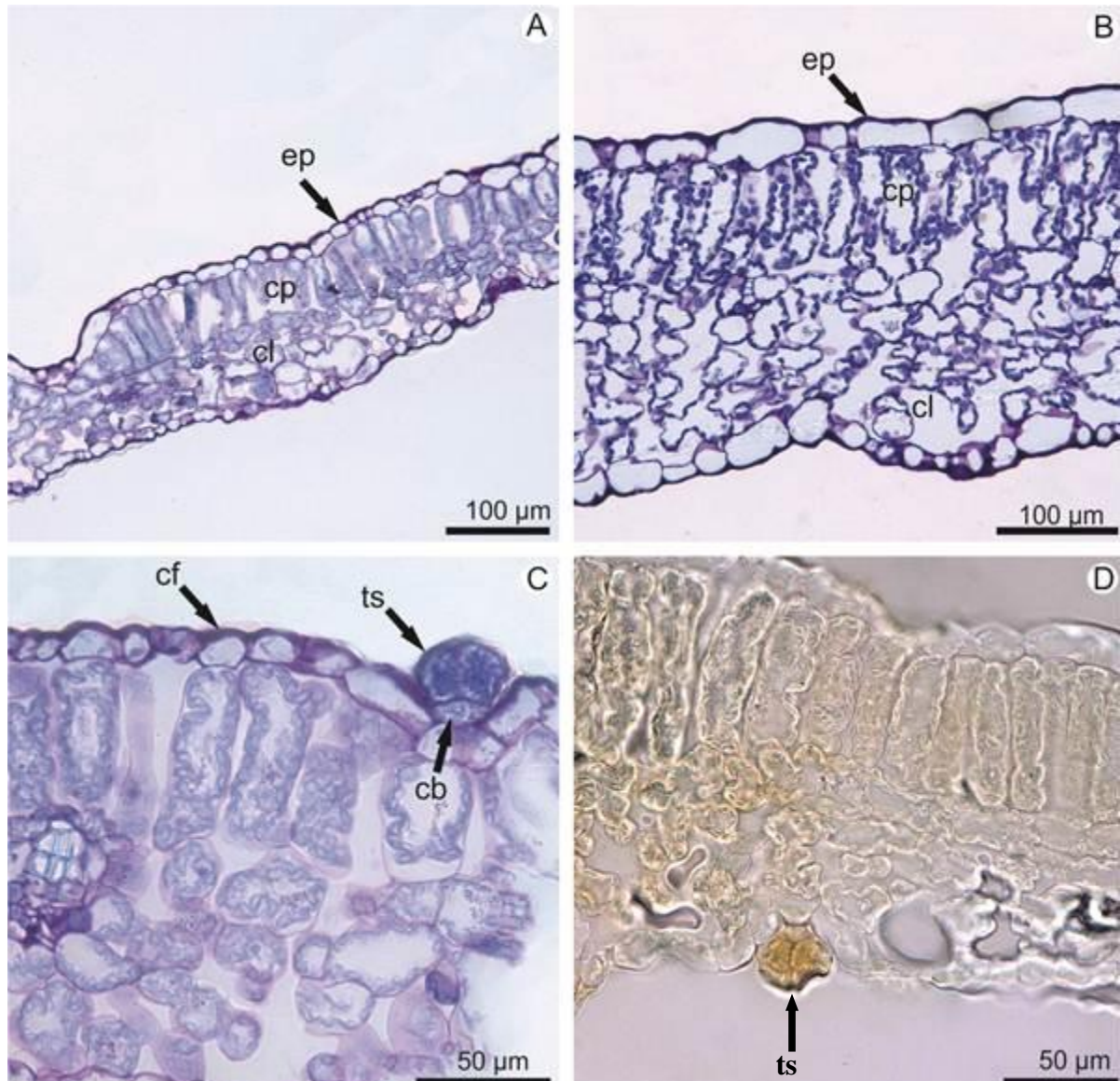


Figura 78. Secções transversais do mesofilo observadas em microscopia de luz.

A e B Estrutura dorsiventral com epiderme (ep) apresentando células fundamentais com tamanhos variados e mesofilo formado por um estrato de clorênquima paliçadiçadico (cp) e três a cinco estratos de clorênquima lacunoso (cl) A- Amostra 10. B- Amostra 2. C- Amostra 10 detalhe de um tricoma secretor (ts) pluricelular apresentando uma célula basal (cb) que se insere em um nível abaixo das células fundamentais da epiderme (cf). D- Teste histoquímico com dicromato de potássio na amostra 10 evidenciando com a cor castanha, a presença de substâncias fenólicas no tricoma secretor e nas células parenquimáticas.

A epiderme em ambas as faces apresenta células fundamentais com tamanhos variados (Figura 78 A e B) e tricomas secretores (Figura 78 C e D). Estes tricomas são pluricelulares e apresentam uma célula basal (pedicelo) que se inserem em um nível abaixo das células epidérmicas fundamentais (Figura 78 C e D). Werker (1993) classificou os tricomas peltados de manjerição em pequenos com uma célula basal, um pedúnculo, uma cabeça alongada com duas células largas ou ovais, esta caracterização observada na figura Figura 78(C e D) dos tricomas confirma esse relato.

O mesófilo (Figura 78 e Figura 79) apresenta um estrato de clorênquima paliádico com células alongadas, dispostas perpendicularmente ao limbo foliar, e apresenta três a cinco estratos de clorênquima lacunoso com células irregulares, com projeções estendendo de uma célula a outra, formando espaços entre si, semelhantes ao mesofilo de *Menta* (MARTINS, 2002).

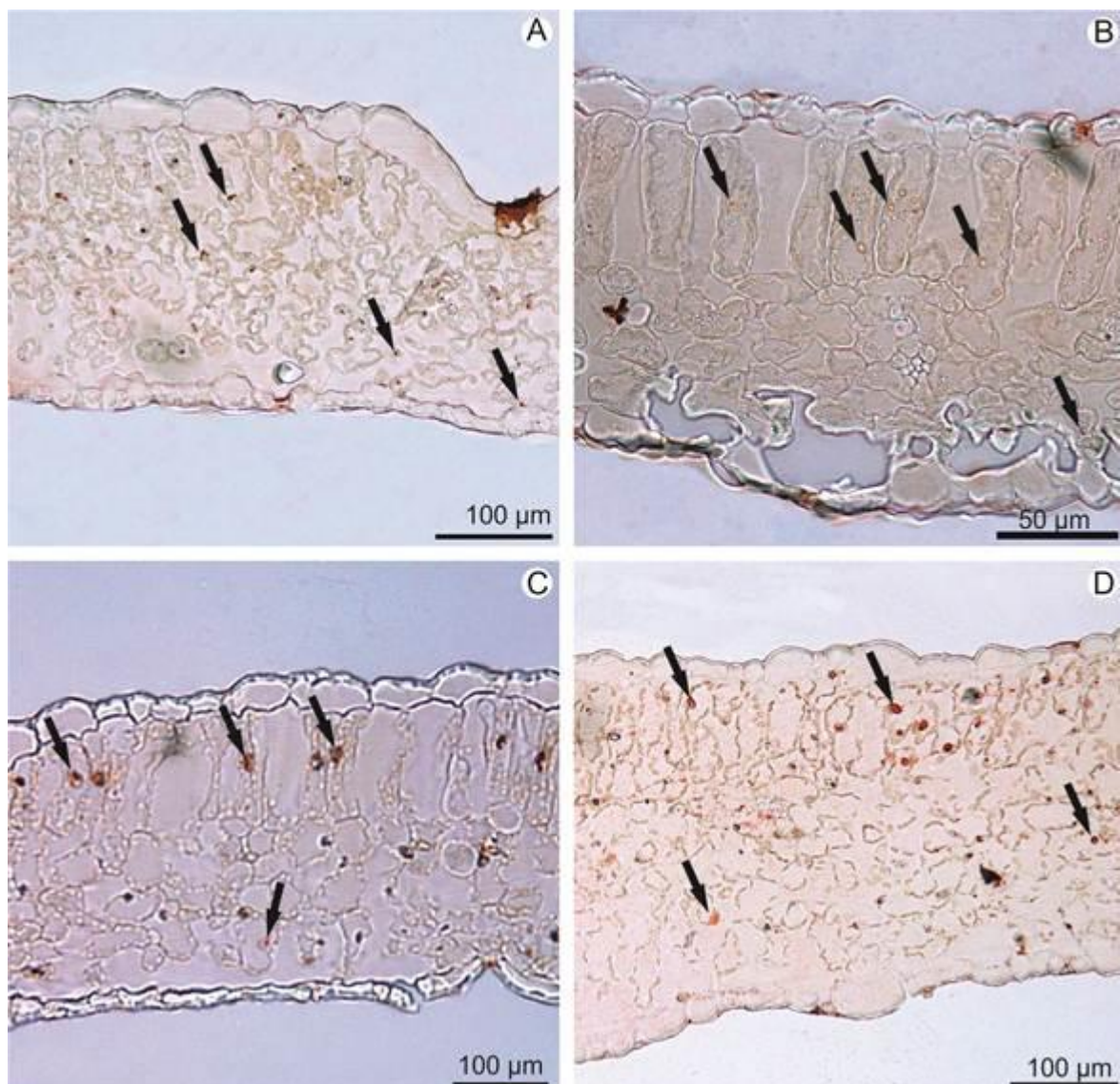


Figura 79. Secções transversais do mesófilo observadas submetidas ao teste histoquímico com sudan IV evidenciando com a cor laranja as substâncias lipídicas. Notar as gotas de óleo (setas). A e C: *Maria Bonita*; B e D: *Sweet Italian Large Leaf*

Sob as diferentes condições de fornecimento de nitrogênio as duas variedades de manjeriço cultivadas em casa de vegetação, apresentaram apenas um tipo de tricoma, o tricoma secretor peltado, que apresentou uma baixa distribuição nas faces abaxial e adaxial. Em *Menta pulegium* o estresse salino aumentou a densidade e o tamanho dos tricomas em ambas às faces de folhas jovens, comparando as folhas do terceiro e décimo nó, e o aumento na densidade foi correlacionado com incremento no rendimento de óleo essencial (KARRAY-BOURAOUI *et al.*, 2009).

Durante a floração, houve predominância de gotículas de óleo espalhadas por todo o mesófilo (Figura 79) e os tricomas secretores apresentaram uma densidade tão baixa que não foi possível a sua contagem.

Esses resultados indicam uma nova descoberta em relação aos sítios de produção de óleo essencial em manjeriço, pois, de acordo com relatos anteriores afirma-se serem as glândulas peltadas o maior, e possivelmente o único sítio de biosíntese e armazenamento de fenilpropanóides (GANG *et al.*, 2001) e de terpenos (IIJIMA; DAVIDOVICH-RIKANATI; *et al.*, 2004). Os resultados deste experimento sugerem que a biossíntese de metabólitos secundários como monoterpenos e sesquiterpenos não ocorre exclusivamente nas glândulas peltadas e nem mesmo que o rendimento de óleo essencial depende da densidade dos tricomas, como pode ser observado nas Figura 78 e Figura 79 e Tabela 11 e Tabela 12.

Em ambas as faces foram encontrados somente tricomas peltados, essa característica diferencia essas duas variedades estudadas das outras espécies de manjeriço. A densidade dos tricomas nas folhas não foi influenciada pelos níveis de nitrogênio, sugerindo que em folhas já completamente expandidas a produção de óleo essencial não depende da densidade dos tricomas contrariando todos os relatos da literatura em manjeriço (GANG *et al.*, 2001; IIJIMA; DAVIDOVICH-RIKANATI; *et al.*, 2004; IIJIMA; GANG; *et al.*, 2004; WERKER *et al.*, 1993; XIE *et al.*, 2008), visto a escassez de tricomas e a predominância de gotas de óleo no mesófilo.

Esses resultados são inéditos nessa espécie e conduzem a reflexão de que os tricomas secretores não atuam exclusivamente na produção de óleo essencial em manjeriço e que na ausência destes, a planta desenvolve outros mecanismos para produção de metabólitos secundários.

5 CONCLUSÕES

O menor aporte de N entre as doses contrastantes de nitrato é o mais indicado para a produção de óleo essencial de manjeriço variedade *Sweet Italian Large Leaf*, sendo favorável à via de formação dos terpenos com maior concentração de linalol.

O óleo essencial de manjeriço demonstrou potencial alelopático e poderia ser uma alternativa estratégica como bioherbicida.

A ação fungistática do óleo essencial se deve provavelmente a interferência na integridade da membrana plasmática dos fungos testados, sendo possível seu uso no controle de patógenos humanos e de fitopatógenos, além de ser um manejo menos prejudicial ao meio ambiente e a saúde da população.

O fornecimento de 100 Kg.ha⁻¹ de nitrato de amônio promoveu altos rendimentos e alto teor de linalol no óleo essencial da cv Maria Bonita, e a variedade *Sweet Italian Large Leaf* mostrou ser muito bem adaptada às condições de escassez de nutrientes, maximizando o rendimento e o perfil de metabólitos secundários.

O nitrogênio é um modulador da expressão gênica induzindo a expressão dos genes que codificam para as enzimas chaves de produção de óleo essencial, e assim, a produção destes compostos é regulada transcricionalmente em manjeriço.

Os resultados anatômicos mostraram que a produção de óleo essencial não depende dos tricomas secretores visto à escassez destes e a predominância de gotículas de óleo espalhadas pelo mesófilo. Esses resultados são inéditos em manjeriço e sugerem que os tricomas não atuam exclusivamente na produção de óleo essencial desta espécie e que na ausência destes, a planta desenvolve outros mecanismos para produção de metabólitos secundários.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, A.; MOSLEM, M.; BAHKALI, A. First morpho-molecular identification of *Rhizoctonia solani* AG-7 from potato tuber-borne sclerotium in Saudi Arabia. **Afr J Microbiol Res**, v. 3, n. 12, p. 952–956, 2009.

ABOUZIENA, H. F. H.; OMAR, A. A. M.; SHARMA, S. D.; SINGH, M. Efficacy Comparison of Some New Natural-Product Herbicides for Weed Control at Two Growth Stages. **Weed Technology**, v. 23, n. 3, p. 431–437, jul 2009.

ADEOLA, S.; FOLORUNSO, O.; AMISU, K. Antimicrobial Activity of *Ocimum basilicum* and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of *Salmonella typhimurium*. **research Journal of Biology**, v. 02, n. 05, p. 138–144, 2012.

ADOUBRYN, K. D.; N’GATTIA, V. K.; KOUADIO-YAPO, G. C.; *et al.* Epidemiology of otomycoses at the University Hospital of Yopougon (Abidjan-Ivory Coast). **Journal de mycologie medicale**, p. 7, 17 out 2014.

AJIKUMAR, P. K.; XIAO, W.; TYO, K. E. J.; *et al.* Isoprenoid Pathway Optmization for for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli*. **SCIENCE**, v. 330, p. 70–74, 2010.

AKINSANMI, O. A.; DRENTH, A. Economic returns from fungicide application to control husk spot of macadamia in Australia is influenced by spray efficiency, rates and costs of application. **Crop Protection**, v. 41, p. 35–41, 2012.

ALCANTARA, J. M.; L, Y. K. K.; JUNIOR, V. F. V. Composição Química de Óleos Essenciais de Espécies de Aniba E Licaria e suas Atividades Antioxidante e Antiagregante Plaquetária. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 141–145, 2010.

ALMEIDA, I. DE; ALVIANO, D. S.; VIEIRA, D. P.; *et al.* Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitology Research**, p. 443–452, 2007.

AMTMANN, A.; ARMENGAUD, P. Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. **Current opinion in plant biology**, v. 12, p. 275–283, 2009.

ARABACI, O.; BAYRAM, E. The effect of nitrogen fertilization and different plant densities on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L.(Basil). **Journal of Agronomy**, v. 3, n. 4, p. 255–262, 2004.

ASHA, M. K.; PRASHANTH, D.; MURALI, B.; PADMAJA, R.; AMIT, A. **Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol**. **Fitoterapia**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868749>>. , ago 2001

AZIZI, A.; YAN, F.; HONERMEIER, B. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2-3, p. 554–561, mar 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–75, fev 2008.

BARNEIX, A. J.; CAUSIN, H. F. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. **Journal of Plant Physiology**, v. 149, n. 3-4, p. 358–362, jan 1996.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. Production of food grade yeasts. **Food Technology and ...**, v. 44, n. 3, p. 407–415, 2006.

BHARATHI, V.; SHANMUGA PRIYA, A.; FIRDOUS, S. J. Antibacterial activity of stem extracts of *Ocimum basilicum*. **Journal of Chemical , Biological and Physical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 298–301, 2012.

BILAL, A.; JAHAN, N.; AHMED, A.; *et al.* PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES ON OCIMUM BASILICUM LINN - A REVIEW. **Int J Cur Rev**, v. 04, n. 23, p. 73–83, 2012.

BISWAS, K. K.; FOSTER, A. J.; AUNG, T.; MAHMOUD, S. S. Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 1, p. 13–19, 16 set 2008.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BLANK, A.; CARVALHO FILHO, J.; SANTOS NETO, A.; *et al.* Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura ...**, v. 22, n. 1, p. 113–116, 2004.

BLANK, A. F.; SOUZA, E. M. DE; ARRIGONI-BLANK, M. D. F. Maria Bonita : cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesq. agropec.bras.**, v. 42, n. 12, p. 1811–1813, 2007.

BOUVIER, F.; SUIRE, C.; D'HARLINGUE, A; BACKHAUS, R. A; CAMARA, B. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 24, n. 2, p. 241–52, out 2000.

BRAMLEY, P. Isoprenoid metabolism. **Plant Biochemistry**, 1997.

BRITO, D. D. M. C. DE; SANTOS, C. D. DOS; GONÇALVES, F. V.; CASTRO, R. N.; SOUZA, S. R. DE. Effects of Nitrate Supply on Plant Growth, Nitrogen, Phosphorus and Potassium Accumulation, and Nitrate Reductase Activity in Crambe. **Journal of Plant Nutrition**, v. 36, n. 2, p. 275–283, 28 jan 2013.

BURT, S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223 – 253, 2004.

BUYSSE, J.; BROECK, H. VAN DEN; MERCKX, R. The effect of different levels of N limitation on sugars, amino acids, growth and biomass partitioning in broadbean (*Vicia faba* L.). **Annals of Botany**, v. 78, p. 39–44, 1996.

CALABRESE, J. C.; JORDAN, D. B.; BOODHOO, A.; SARIASLANI, S.; VANNELLI, T. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11403–16, 14 set 2004.

CARDENAS-NAVARRO, R.; ADAMOWICZ, S.; ROBIN, P. Nitrate accumulation in plants: a role for water. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 334, p. 613–624, 1 maio 1999.

CAROVIĆ-STANKO, K.; ORLIĆ, S.; POLITEO, O.; *et al.* Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 196–201, mar 2010.

CARRASCO, H.; RAIMONDI, M.; SVETAZ, L.; *et al.* Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 1, p. 1002–24, jan 2012.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 171–176, jan 2009.

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; *et al.* Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553–559, 2007.

CHALCHAT, J.; OZCAN, M. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 501–503, 15 set 2008.

CHAPPELL, J.; WOLF, F.; PROULX, J.; CUELLAR, R.; SAUNDERS, C. Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1337–1343, dez 1995.

CHARLES, D.; SIMON, J. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of the American ...**, v. 115, n. 3, p. 458–462, 1990.

CHEN, B.-M.; WANG, Z.-H.; LI, S.-X.; *et al.* Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 635–643, set 2004.

CHRISTIAN, E. J.; GOGGI, A. S. Aromatic Plant Oils as Fungicide for Organic Corn Production. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1941, 2008.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170–5, jan 2000.

CRAWFORD, N. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 10, p. 389–395, out 1998.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant cell**, v. 7, n. 7, p. 859–68, jul 1995.

CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chem. Rev.**, v. 87, p. 929–954, 1987.

CROWELL, A. L.; WILLIAMS, D. C.; DAVIS, E. M.; WILDUNG, M. R.; CROTEAU, R. Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 405, n. 1, p. 112–21, 1 set 2002.

DALE, S.; ARRÓ, M.; BECERRA, B.; *et al.* Bacterial expression of the catalytic domain HMGR from Arabidopsis and its inactivation by phosphorylation at Ser577-Dale.pdf. **Eur. J. Biochem.**, v. 233, p. 506–513, 1995.

DEENEN, V. N.; BACHMANN, A.-L.; SCHMIDT, T.; *et al.* Molecular cloning of mevalonate pathway genes from *Taraxacum brevicorniculatum* and functional characterisation of the key enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 4, p. 4337–49, abr 2012.

DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J. L.; ROSWALKA, L.; *et al.* Densidade de tricomas glandulares e produção de óleo essencial em *Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. e *Mentha cf. aquatica* L. **Ciencia e Natura**, v. 28, n. 1, p. 23–34, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. [S.l: s.n.], 2002. p. 515

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. [S.l: s.n.], 1997. p. 529

DHIMA, K. V.; VASILAKOGLU, I. B.; GATSIS, T. D.; PANOU-PHILOTHEOU, E.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Effects of aromatic plants incorporated as green manure on weed and maize development. **Field Crops Research**, v. 110, n. 3, p. 235–241, fev 2009.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. **The Plant cell**, v. 7, p. 1085–1097, jul 1995.

ENACHE-ANGOULVANT, A.; HENNEQUIN, C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41, n. 11, p. 1559–68, 1 dez 2005.

ESTÉVEZ, J. M.; CANTERO, A.; ROMERO, C.; *et al.* Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 124, n. 1, p. 95–104, set 2000.

FATOPE, M. O.; MARWAH, R. G.; HADHRAMI, N. M. AL; ONIFADE, A. K.; WILLIAMS, J. R. Identification of the Chemotypes of *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR Spectroscopy. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 2457–2463, 2008.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. ABSORÇÃO DE NUTRIENTES. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: [s.n.], 2006. p. 115–152.

FILHO, S. A. P. S.; BAYMA, J. C.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. G. B. Potentially Allelopathic Activity of the Essential Oil of *Ocimum americanum*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 499–505, 2009.

FISCHER, R.; NITZAN, N.; CHAIMOVITSH, D.; RUBIN, B.; DUDAI, N. Variation in essential oil composition within individual leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is more affected by leaf position than by leaf age. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4913–22, 11 maio 2011.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–94, 12 abr 2012.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of chromatography. A**, v. 1250, p. 34–48, 10 ago 2012.

FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. Protein family review The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. 2004.

GANG, D. R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; *et al.* An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant physiology**, v. 125, n. 2, p. 539–55, fev 2001.

GARCÍA, D. E. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. **Pastos y Forrajes**, v. 27, n. 1, p. 1–12, 2004.

GARCÍA, V. G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. R. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of ...**, v. 4, n. 1, p. 55–79, 2006.

GATTI, A. B.; CRISTINA, S.; GUALTIERI, J.; PEREZ, D. A.; SALGUEIRO, I. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O . Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L . e *Raphanus sativus* L . **Ecologia**, v. 18, n. 3, p. 459–472, 2004.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant physiology**, v. 122, n. 1, p. 205–14, jan 2000.

GIORGI, A.; MINGOZZI, M.; MADEO, M.; SPERANZA, G.; COCUCCI, M. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 204–211, maio 2009.

GLAS, J. J.; SCHIMMEL, B. C. J.; ALBA, J. M.; *et al.* Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 17077–103, jan 2012.

GLASS, N. L.; RASMUSSEN, C.; ROCA, M. G.; READ, N. D. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 3, p. 135–41, mar 2004.

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

GOLDANI, L. Z.; MÁRIO, P. S. S. *Candida tropicalis* Fungemia in a Tertiary Care Hospital. **Journal of Infection**, v. 46, n. 3, p. 155–160, abr 2003.

GOW, N. A. R.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 4, p. 406–12, ago 2012.

GOW, N.; VEERDONK, F. VAN DE. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews ...**, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2013.

GRANADA, E. DE; AMÉZQUITA, M. O. DE; BAUTISTA, G. R.; VALENCIA, H. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. **Acta Biológica ...**, v. 6, n. 1, p. 7–26, 2001.

GUEVARA-GARCIA, A.; ROMÁN, C. S.; ARROYO, A.; *et al.* Characterization of the *Arabidopsis* *clb6* Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl- D -Erythritol 4-Phosphate Pathway. **The Plant cell**, v. 17, n. February, p. 628–643, 2005.

GUTIÉRREZ-NAVA, M. DE L. L.; GILLMOR, C. S.; JIMÉNEZ, L. F.; GUEVARA-GARCÍA, A.; LEÓN, P. CHLOROPLAST BIOGENESIS Genes Act Cell and Noncell Autonomously in Early. **Plant p**, v. 135, p. 471–482, 2004.

HAKEEM, K. R.; AHMAD, A.; IQBAL, M.; GUCEL, S.; OZTURK, M. Nitrogen-efficient rice cultivars can reduce nitrate pollution. **Environmental science and pollution research international**, v. 18, n. 7, p. 1184–93, ago 2011.

HARKER, M.; HOLMBERG, N.; CLAYTON, J. C.; *et al.* Enhancement of seed phytosterol levels by expression of an N-terminal truncated *Hevea brasiliensis* (rubber tree) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. **Plant biotechnology journal**, v. 1, n. 2, p. 113–21, mar 2003.

HASHEM, M.; MOHARAM, A. M.; ZAIED, A. A.; SALEH, F. E. M. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. **Crop Protection**, v. 29, n. 10, p. 1111–1117, out 2010.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 12, p. 591–6, dez 2001.

HEMMERLIN, A.; HARWOOD, J. L.; BACH, T. J. Progress in Lipid Research A raison d ' être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis ? **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 95–148, 2012.

HEMMERLIN, A.; HOEFFLER, J.-F.; MEYER, O.; *et al.* Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26666–76, 18 jul 2003.

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. THE SHIKIMATE PATHWAY. **Annu. Rev. Plant Physiol.Mol. Biol**, v. 50, p. 473–503, 1999.

HUSSAIN, A.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p. 986–995, 2008.

HUSSEIN, M. S.; EL-SHERBENY, S. E.; KHALIL, M. Y.; NAGUIB, N. Y.; ALY, S. M. Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 3, p. 322–331, maio 2006.

HUTER, O. F. Use of natural products in the crop protection industry ". **Phytochemistry Rev**, v. 10, p. 185–194, 2011.

IJIMA, Y.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; FRIDMAN, E.; *et al.* The Biochemical and Molecular Basis for the Divergent Patterns in the Biosynthesis of Terpenes and Phenylpropenes in the Peltate Glands of Three Cultivars of Basil 1. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 136, p. 3724–3736, 2004.

IJIMA, Y.; GANG, D. R.; FRIDMAN, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. Characterization of Geraniol Synthase from the Peltate Glands of Sweet Basil 1. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 134, n. January, p. 370–379, 2004.

IKRAM, S.; BEDU, M. Natural variation of Arabidopsis response to nitrogen availability. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 1, p. 91–105, 2012.

JANDOUREK, A.; VAISHAMPAYAN, J. K.; VAZQUEZ, J. A. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. **AIDS (London, England)**, v. 12, n. 9, p. 1033–7, 18 jun 1998.

JHA, P.; RAM, M.; KHAN, M. A.; KIRAN, U.; ABDIN, M. Z. Impact of organic manure and chemical fertilizers on artemisinin content and yield in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops & Products**, v. 33, n. 2, p. 296–301, 2011.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts--the ascomycetes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 503–17, jan 2013.

KALINOVA, J.; TRISKA, J.; VRCHOTOVA, N. Occurrence of eugenol, coniferyl alcohol and 3,4,5-trimethoxyphenol in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and their biological activity. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 5, p. 1679–1685, 13 jan 2011.

KALKANCI, A.; BERK, E.; AYKAN, B.; *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from hospitalized patients. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 17, n. 1, p. 16–20, mar 2007.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. Linalool- A Review of a Biologically Active Compound of Commercial Importance. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 7, p. 1183–1192, 2008.

KARAMANOS, A. J.; SOTIROPOULOU, D. E. K. Field studies of nitrogen application on Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) essential oil during two cultivation seasons. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 246–252, abr 2013.

KARRAY-BOURAOUI, N.; RABHI, M.; NEFFATI, M.; *et al.* Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 338–343, nov 2009.

KATAN, T.; SHLEVIN, E.; KATAN, J. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on Stem Surfaces of Tomato Plants and Aerial Dissemination of Inoculum. **Phytopathology**, v. 87, n. 7, p. 712–9, jul 1997.

KAWURI, R.; SUPRAPTA, D. N.; NITTA, Y.; HOMMA, T. Destructive Leaf Rot Disease Caused by *Fusarium oxysporum* on *Aloe barbadensis* Miller in Bali . **Agricultural Science Research Journal**, v. 2, n. June, p. 295–301, 2012.

KAYA, I.; YİĞİT, N.; BENLİ, M. Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy. **African Journal of Traditional, Complementary and ...**, v. 5, n. 4, p. 363–369, 2008.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; *et al.* *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816–23, dez 2010.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 54, jan 2013.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; DARABI, M. H.; *et al.* Comparative study on the effects of a new antifungal lotion (*Artemisia sieberi* essential oil) and a clotrimazole lotion in the treatment of pityriasis versicolor. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 19, n. 1, p. 17–21, mar 2009.

KLEINE, S.; MÜLLER, C. Differences in shoot and root terpenoid profiles and plant responses to fertilisation in *Tanacetum vulgare*. **Phytochemistry**, v. 96, p. 123–31, dez 2013.

KLIMÁNKOVA, E.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J.; *et al.* Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. **Food Chemistry**, v. 107, p. 464–472, 2008.

KOCIĆ-TANACKOV, S.; DIMIĆ, G.; LEVIĆ, J.; TANACKOV, I.; TUCO, D. Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10188–10195, 2011.

KOUTSOS, T. V.; CHATZOPOULOU, P. S.; KATSIOTIS, S. T. Effects of individual selection on agronomical and morphological traits and essential oil of a “Greek basil” population. **Euphytica**, v. 170, n. 3, p. 365–370, 4 set 2009.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B. Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. **Food chemistry**, v. 142, p. 334–41, 1 jan 2014.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; BAČKOR, M.; REPČÁK, M. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. **Plant Science**, v. 172, n. 2, p. 393–399, fev 2007.

KOVÁČIK, J.; REPCA, M.; KRON, I. Nitrogen deficiency induced changes of free amino acids and coumarin contents in the leaves of *Matricaria chamomilla*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 28, n. 2, p. 159–164, 2006.

KRAFT, J. M. Fusarium wilt of peas (a review). **Agronomie**, v. 14, p. 561–567, 1994.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 246–51, jun 2011.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts. A taxonomic study**. 5 th ed. Amsterdam: [s.n.], 2011. p. 2080

LACHOWICZ, K. J.; JONES, G. P.; BRIGGS, D. R.; *et al.* Characteristics of Essential Oil from Basil (*Ocimum basilicum* L .) Grown in Australia. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 877–881, 1996.

LACHOWICZ, K. J.; JONES, G. P.; BRIGGS, D. R.; *et al.* The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L .) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology**, p. 209–214, 1998.

LANGE, B. M.; TURNER, G. W. Terpenoid biosynthesis in trichomes — current status and future opportunities. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, p. 2–22, 2013.

LAPCZYNSKI, A; LETIZIA, C. S.; API, A M. Fragrance material review on d-linalool. **Food and chemical toxicology**, v. 46 Suppl 1, n. 11, p. S193–4, nov 2008.

LAWRENCET, B. Essential oils: from agriculture to chemistry. **International Journal of Aromatherapy**, v. 10, n. 3/4, p. 82–98, 2001.

LEONE, M.; ALBANÈSE, J.; ANTONINI, F.; *et al.* Long-term epidemiological survey of *Candida* species: comparison of isolates found in an intensive care unit and in conventional wards. **Journal of Hospital Infection**, v. 55, n. 3, p. 169–174, nov 2003.

LEWINSOHN, E.; ZIV-RAZ, I.; DUDAI, N.; *et al.* Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. **Plant science**, v. 160, n. 1, p. 27–35, 7 dez 2000.

LI, Y.; YANG, X.; REN, B.; SHEN, Q.; GUO, S. Why Nitrogen Use Efficiency Decreases Under High Nitrogen Supply in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 1, p. 47–52, 23 jun 2011.

- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; *et al.* Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 377–382, 2009.
- LOGUERCIO-LEITE, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. v. 19, n. 2, p. 17–27, 2006.
- LOUIE, G. V.; BAIGA, T. J.; BOWMAN, M. E.; *et al.* Structure and reaction mechanism of basil eugenol synthase. **PloS one**, v. 2, n. 10, p. e993, jan 2007.
- MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 3, p. 250–8, jun 2009.
- MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 612–631, out 2010.
- MAREI, G. I. K.; ABDEL RASOUL, M. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, p. 56–61, maio 2012.
- MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Differences in Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian Cultivars Related to Morphological Characteristics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 3926–3929, 1996.
- MARQUES, A.; SANTOS, D. O. S.; BUCHER, C. A.; *et al.* Efeito da disponibilidade de nitrato em solução nutritiva sobre a absorção de nitrogênio e atividade enzimática de duas cultivares de arroz. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 215–220, 2009.
- MARTINS, M. B. G. Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varresura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* x *suaveolens* (Lamiaceae). **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 205–218, 2002.
- MATT, P.; KRAPP, A.; HAAKE, V.; MOCK, H.-P.; STITT, M. Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. **The Plant journal**, v. 30, n. 6, p. 663–77, jun 2002.
- MAZUTTI, M.; BELEDELLI, B.; MOSSI, A. J.; *et al.* Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1198–1202, 2006.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231–238, 2003.
- MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Isopentenyl Diphosphate is the Terminal Product of the Deoxyxylulose-5-Phosphate Pathway for Terpenoid Biosynthesis in Plants. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 653–656, 1999a.

MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 31–6, jan 1999b.

MEYERS, M. **An Herb Society of America Guide**. [S.l: s.n.], 2003. p. 1–45

MICHIELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular plant pathology**, v. 10, n. 3, p. 311–24, maio 2009.

MITHOFER, A.; BOLAND, W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. **Annu.Rev. Plant Biol.**, v. 63, p. 431–50, 2012.

MIZIORKO, H. M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 505, n. 2, p. 131–143, 2011.

MUKHERJEE, MOUMITA; DATTA, A. K. The Basils - A Review. **Plant Archives**, v. 7, n. 2, p. 473–483, 2007.

MURPHY, A.; KAVANAGH, K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: Implications for biotechnology. **Enzyme and microbial technology**, v. 25, p. 551–557, 1999.

NATION, R.; JANICK, J.; SIMON, J. Estimation of outcrossing in basil. **HortScience**, v. 27, n. 11, p. 1221–1222, 1992.

OBRIG, T.; CULP, W. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. **Journal of Biological ...**, v. 246, p. 174–181, 1971.

OLIVER, D. J.; NIKOLAU, B. J.; WURTELE, E. S. Acetyl-CoA—Life at the metabolic nexus. **Plant Science**, v. 176, n. 5, p. 597–601, maio 2009.

OXENHAM, S. K.; SVOBODA, K. P.; WALTERS, D. R. Antifungal Activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). **J. Phytopathology**, v. 153, p. 174–180, 2005.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J.-C. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. **Czech Journal Of Food Sciences**, v. 20, n. 6, p. 223–228, 2002.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 50–2, 22 ago 2005.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life sciences**, v. 78, n. 7, p. 719–23, 11 jan 2006.

PEREIRA, R. C. A.; MOREIRA, A. L. M. Manjerição Cultivo e Utilização. **Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 29, 2011.

PETER, A.; SHANOWER, T. Plant glandular trichomes. **Resonance**, n. March, p. 41–45, 1998.

PETROSKI, R. J.; STANLEY, D. W. Natural compounds for pest and weed control. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8171–9, 23 set 2009.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 237–243, 2002.

PICHERSKY, E.; LEWINSOHN, E.; CROTEAU, R. Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in *Clarkia breweri*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 316, n. 2, p. 803–7, 1 fev 1995.

PIRES, R. H.; MONTANARI, L. B.; MARTINS, C. H. G.; *et al.* Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 453–64, dez 2011.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticité et pathogénie. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2013, n. 450, p. 37–46, mar 2013.

POZZATTI, P.; LORETO, É. S.; NUNES MARIO, D. A.; *et al.* Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 20, n. 3, p. 185–189, set 2010.

RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; KATZIR, I.; LEWINSOHN, E. Enantiomeric Composition of Linalol in the Essential Oils of *Ocimum* Species and in Commercial Basil Oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, n. 1923, p. 293–296, 1997.

REN, X.; KONG, Q.; WANG, H.; *et al.* Biocontrol of fungal decay of citrus fruit by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 796–801, abr 2012.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 17 jun 2006.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; FORÉS, O.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. F.; *et al.* Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during *Arabidopsis* Seedling Development. **The Plant cell**, v. 16, n. January, p. 144–156, 2004.

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Natural product reports**, v. 16, n. 5, p. 565–74, out 1999.

ROSA, A. DA; MARQUES, M. DA C. METODOLOGIA PARA PRESERVAÇÃO DO FUNGICIDA MANCOZEBE EM AMOSTRAS DE SOLO. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, p. 1639–1642, 2011.

ROSADO, L. D. S. .; RODRIGUES, H. C. A.; PINTO, J. B. P. .; *et al.* Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço “ Maria Bonita ” na germinação de alface , tomate e melissa. **Rev. Bras.Pl.Med.**, v. 11, n. 4, p. 422–428, 2009.

SAGGIORATO, A. G. **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE IN VITRO E NA SUPERFÍCIE DE SALAME TIPO ITALIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERICÃO (Ocimum basilicum L) SUPERFÍCIE DE SALAME TIPO ITALIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE.** [S.l: s.n.], 2008.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth regulation**, v. 34, p. 3–21, 2001.

SANTOS, A. M.; STARK, E. M. L. M. .; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Teores de nitrogênio, fósforo e frações solúveis em duas variedades de arroz cultivadas em solução nutritiva sob dois níveis de nitrato. **Agronomia**, v. 37, n. 1, p. 76–81, 2003.

SCHEIBLE, W.-R.; GONZÁLES-FONTES, A.; LAUERER, M.; *et al.* Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. **The Plant Cell**, v. 9, p. 783–798, 1997.

SCHEIBLE, W.-R.; KRAPP, A.; STITT, M. Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 11, p. 1155–1167, nov 2000.

SCHILLMILLER, A. L.; LAST, R. L.; PICHERSKY, E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 54, n. 4, p. 702–11, maio 2008.

SCHUSTER, M. G.; MEIBOHM, A.; LLOYD, L.; STROM, B. Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: a matched, case-control study. **The Journal of infection**, v. 66, n. 3, p. 278–84, mar 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. D. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, p. 129–137, 2004.

SHARAFZADEH, S.; ALIZADEH, O. Nutrient Supply and Fertilization of Basil. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 5, p. 956–960, 2011.

SHARAFZADEH, S.; ESMAEILI, M.; MOHAMMADI, A. H. Interaction Effects of Nitrogen, Phosphorus and Potassium on Growth, Essential Oil and Total Phenolic Content of Sweet Basil. **Adv. in Environ. Biol.**, v. 5, n. 6, p. 1285–1289, 2011.

SIFOLA, M. I.; BARBIERI, G. Growth , yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 408–413, 2006.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A DE; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022–8, 18 mar 1994.

SINGH, G.; MAURYA, S. Antimicrobial , antifungal and insecticidal investigations on essential oils ó An overview. **Natural Product Radiance**, v. 4, n. 3, p. 179–192, 2005.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the Accumulation and Reduction of Nitrate by Nitrogen and Carbon Metabolites in Maize Seedlings. **Plant physiology**, v. 114, n. 2, p. 583–589, jun 1997.

SMALLING, K. L.; KUIVILA, K. M.; ORLANDO, J. L.; *et al.* Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 73, n. 1, p. 144–153, 2013.

SOLOMONSON, L. P.; BARBER, M. J. Assimilatory nitrate reductase : functional properties and regulation. **Annu. Rev. Plant Physiol.Mol. Biol**, v. 41, p. 225–53, 1990.

SONG, W.; MAKEEN, K.; WANG, D.; *et al.* Nitrate supply affects root growth differentially in two rice cultivars differing in nitrogen use efficiency. **Plant and Soil**, v. 343, n. 1-2, p. 357–368, 20 fev 2011.

SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2. ed. Fortaleza: [s.n.], 2004. p. 432

SOUZA, S. R. **Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteínas em grãos de arroz**. [S.l.]: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.

SOUZA, S. R. .; STARK, E. M. L. M. .; FERNANDES, M. S. Effects of Supplemental Nitrogen on Nitrogen-Assimilation Enzymes, Free Amino Nitrogen, Soluble Sugars, and Crude Protein of Rice. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 30, n. 5, p. 711–724, 1999.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Ix - nitrogênio. In: FERNANDES, M. . (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: [s.n.], 2006. p. 216–245.

STEFANELLI, D.; GOODWIN, I.; JONES, R. Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrients. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1833–1843, ago 2010.

STERMER, B. A; BIANCHINI, G. M.; KORTH, K. L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. **Journal of lipid research**, v. 35, n. 7, p. 1133–40, jul 1994.

STEVIC, T.; BERIC, T.; ŠAVIKIN, K.; *et al.* Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 116–122, abr 2014.

SUGAWARA, Y.; HARA, C.; AOKI, T.; SUGIMOTO, N.; MASUJIMA, T. Odor distinctiveness between enantiomers of linalool: difference in perception and responses elicited by sensory test and forehead surface potential wave measurement. **Chemical senses**, v. 25, n. 1, p. 77–84, fev 2000.

SUH, S.-O.; BLACKWELL, M. Three new asexual arthroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum histeridarum* sp. nov., and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov., isolated from the gut of insects. **Mycological research**, v. 110, n. Pt 2, p. 220–8, fev 2006.

SUN, Y.-J.; SUN, Y.-Y.; LI, X.-Y.; GUO, X.; MA, J. Relationship of Nitrogen Utilization and Activities of Key Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism in Rice Under Water–Nitrogen Interaction. **Acta Agronomica Sinica**, v. 35, n. 11, p. 2055–2063, nov 2009.

SVOBODA, K. P.; HAMPSON, J.; HUNTER, T. Secretory tissues- Storage and chemical variation of essential oil in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. **The international journal of aromatherapy**, v. 9, n. 3, p. 124–131, 1999.

SVOBODA, K. P.; SVOBODA, T. G. **SECRETORY STRUCTURES OF AROMATIC AND MEDICINAL PLANTS**. [S.l.]: British Library, 2000. p. 61

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. [S.l.: s.n.], 2006. p. 722

TELCI, I.; BAYRAM, E.; YILMAZ, G.; AVCI, B. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 6, p. 489–497, 2006.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173–82, set 2011.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, p. 1005–1024, 2000.

TORTORANO, A M.; CASPANI, L.; RIGONI, A L.; *et al.* Candidosis in the intensive care unit: a 20-year survey. **The Journal of hospital infection**, v. 57, n. 1, p. 8–13, maio 2004.

TOYOTA, K.; KIMURA, M. Colonization of chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* by soil bacteria and their effects on germination. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 193–197, 1993.

TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; BHATTACHARYA, P. R. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 1, n. 5, p. 52–63, 2009.

TSAI, P.-W.; CHEN, Y.-T.; HSU, P.-C.; LAN, C.-Y. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. **BioMedicine**, v. 3, n. 1, p. 51–64, mar 2013.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant physiology**, v. 124, n. 2, p. 655–64, out 2000.

- TZIN, V.; GALILI, G. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. **Molecular plant**, v. 3, n. 6, p. 956–972, 2010.
- VERMA, R. S.; PADALIA, R. C.; CHAUHAN, A.; THUL, S. T. Exploring compositional diversity in the essential oils of 34 *Ocimum* taxa from Indian flora. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 7–19, fev 2013.
- VIEIRA, R. F. & SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and use in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, v. 54, n. 2, p. 207–216, 2000.
- VUUREN, S. F. VAN; VILJOEN, A. M.; ÖZEK, T.; DEMIRCI, B.; BAŞER, K. H. C. Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity. **South African Journal of Botany**, v. 73, n. 3, p. 441–448, 2007.
- WANG, Y.-Y.; HSU, P.-K.; TSAY, Y.-F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 458–67, ago 2012.
- WEAVER, L. M.; HERRMANN, K. M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. **Trends in plant science**, v. 2, n. 9, p. 1360–1385, 1997.
- WERKER, E.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U. Glandular hairs and essential oils in developing leaves on *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Annals of ...**, v. 71, p. 43–50, 1993.
- WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 529–53, jan 2007.
- WITHERS, S. T.; KEASLING, J. D. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 980–90, jan 2007.
- XIE, Z.; KAPTEYN, J.; GANG, D. R. A systems biology investigation of the MEP / terpenoid and shikimate / phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. **The Plant Journal**, v. 54, p. 349–361, 2008.
- XIONG, Z.-Q.; TU, X.-R.; WEI, S.-J.; *et al.* The mechanism of antifungal action of a new polyene macrolide antibiotic antifungalmycin 702 from *Streptomyces padanus* JAU4234 on the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. 1–6, jan 2013.
- YAZAKI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS letters**, v. 580, n. 4, p. 1183–91, 13 fev 2006.
- YOUSSEF, D. R.; SOUZA, G. R. DE; HALFELD-VIEIRA, B. D. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* associados à queima foliar em Roraima. **revista Agro@ambiente**, v. 6, n. 2, p. 158–165, 2012.
- ZHANG, J.; LI, S.; WU, W. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 1, p. 273–8, jan 2009.

ZHELJAZKOV, V. D.; CALLAHAN, A.; CANTRELL, C. L. Yield and oil composition of 38 basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions grown in Mississippi. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 1, p. 241–5, 9 jan 2008.

ZHELJAZKOV, V. D.; CANTRELL, C. L.; EBEIHAR, M. W.; ROWE, D. E.; COKER, C. Productivity , Oil Content , and Oil Composition of Sweet Basil as a Function of Nitrogen and Sulfur Fertilization. **Hortscience**, v. 43, n. August, p. 1415–1422, 2008.

ZHENG, A.; WANG, Y. The research of infection process and biological characteristics of *Rhizoctonia solani* AG-1 IB on soybean. **Journal of Yeast and Fungal Research Vol**, v. 2, n. July, p. 93–98, 2011.

ZHENG, R.-C.; GE, Z.; QIU, Z.-K.; WANG, Y.-S.; ZHENG, Y.-G. Asymmetric synthesis of (R)-1,3-butanediol from 4-hydroxy-2-butanone by a newly isolated strain *Candida krusei* ZJB-09162. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 969–76, maio 2012.

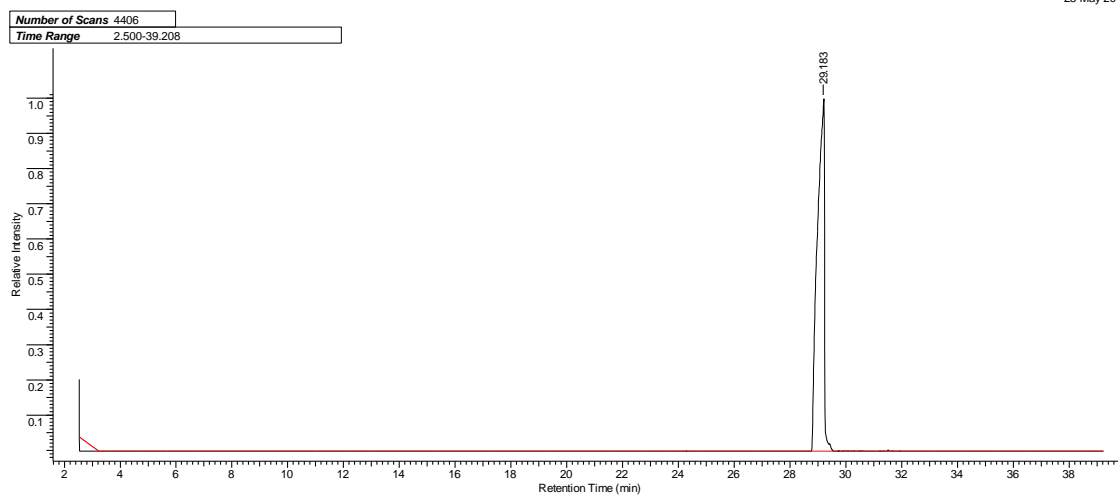
ZIAEI, M.; SHARIFI, M. Gene expression and activity of phenyl alanine amonia-lyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. **Iranian Journal of ...**, v. 10, n. 1, p. 32–39, 2012.

7 ANEXOS

Anexo A – Cromatogramas de padrões e das amostras de óleo essencial analisadas no CG-MS

Padrão Eugenol

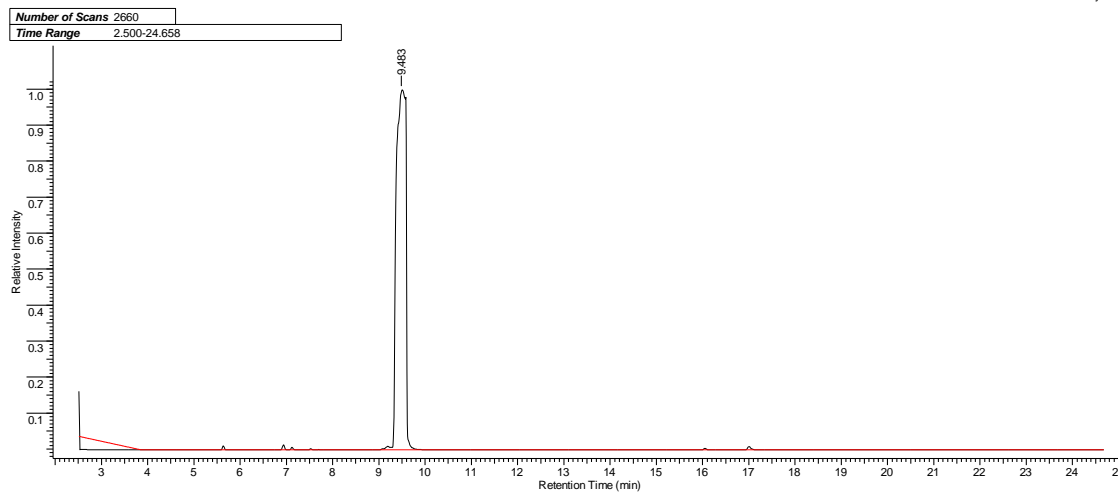
25 May 2014



Anexo 1. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich)

Padrão eucaliptol

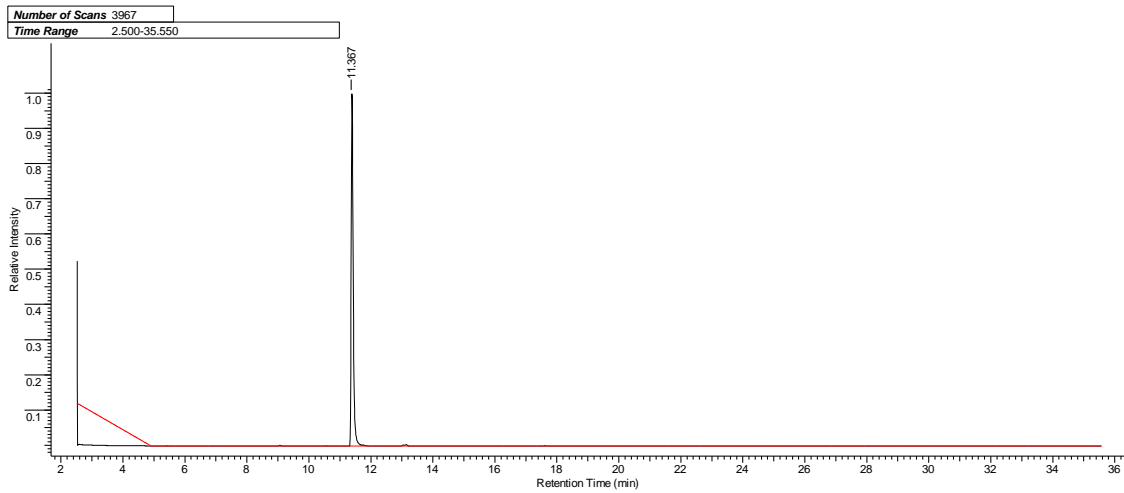
25 May 2014



Anexo 2. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de eucaliptol (1,8 cineol) (Sigma-Aldrich)

Padrão sabineno

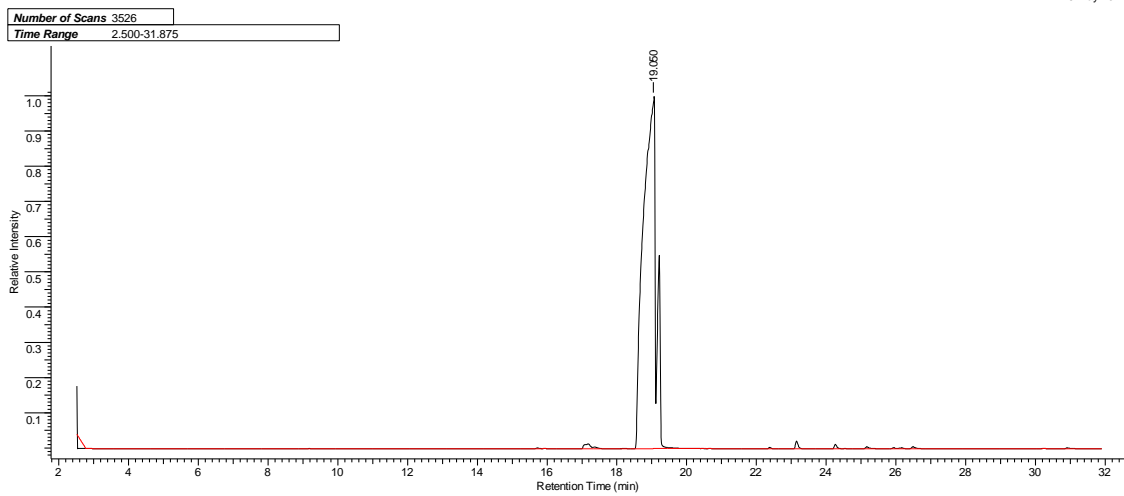
25 May 2014



Anexo 3. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de sabineno (Sigma-Aldrich)

Padrão alfa-terpineol

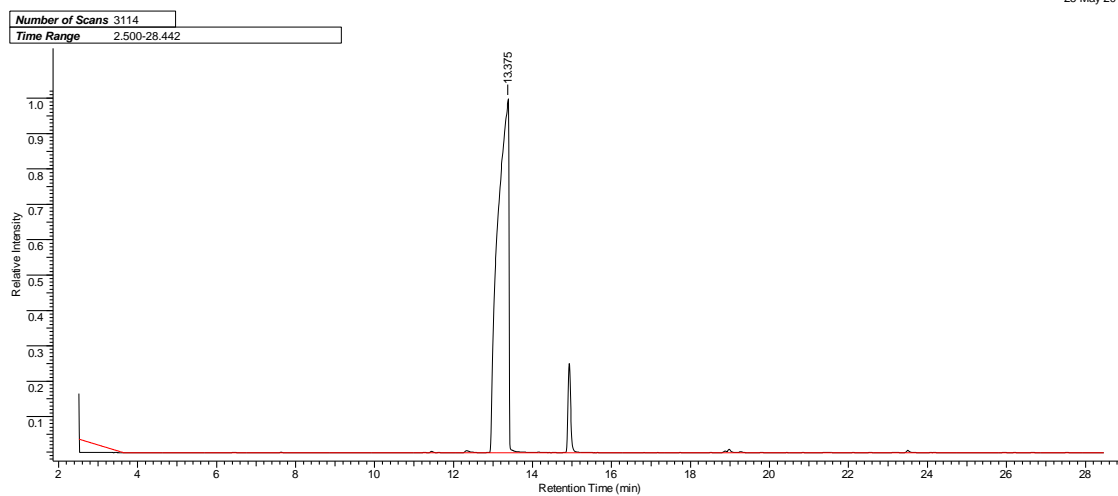
25 May 2014



Anexo 4. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de α -terpineol (Sigma-Aldrich)

Padrão linalol

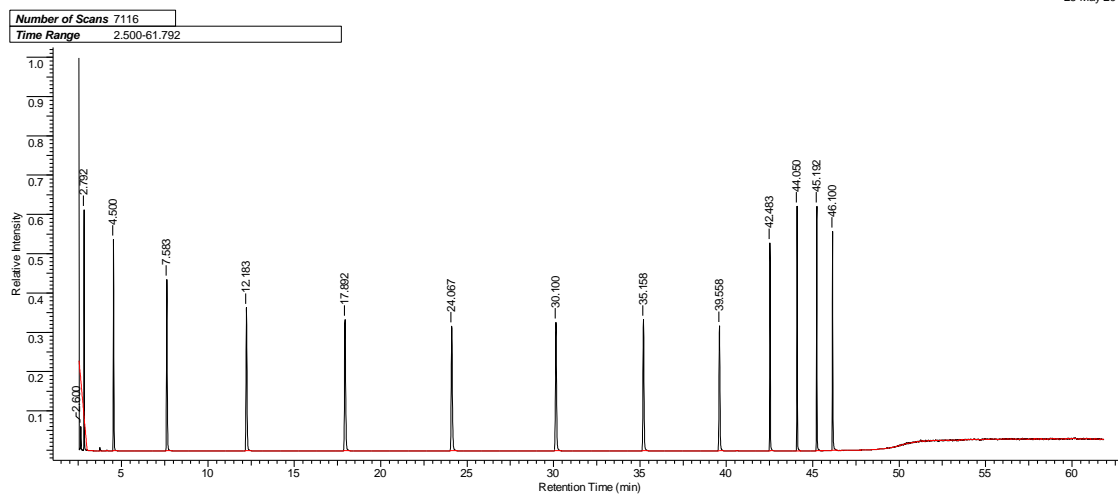
25 May 2014



Anexo 5. Análise cromatográfica por CG-MS do padrão de linalol (Sigma-Aldrich)

Padrão C8-C20

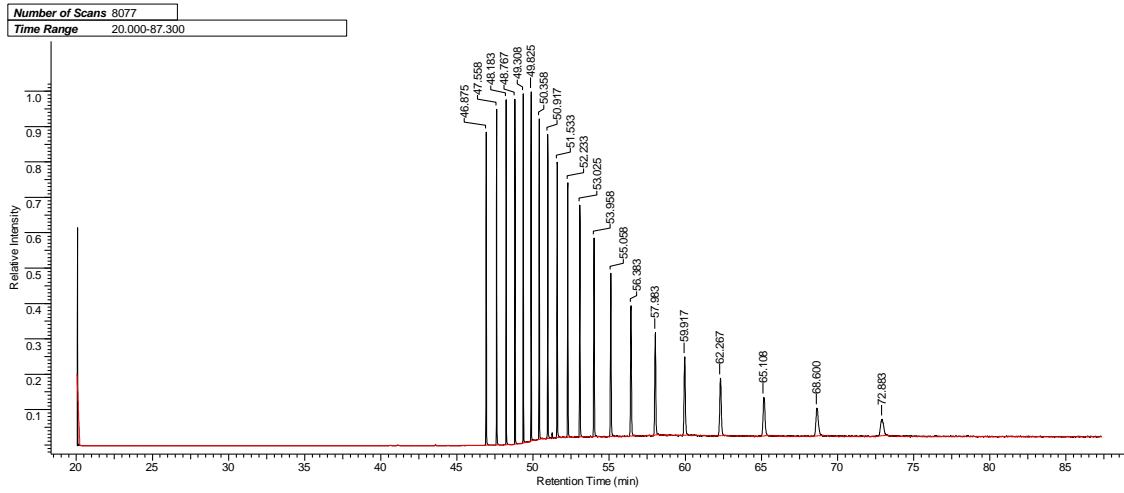
25 May 2014



Anexo 6. Análise cromatográfica por CG-MS da série homóloga de alcanos C₈-C₂₀ (Sigma-Aldrich)

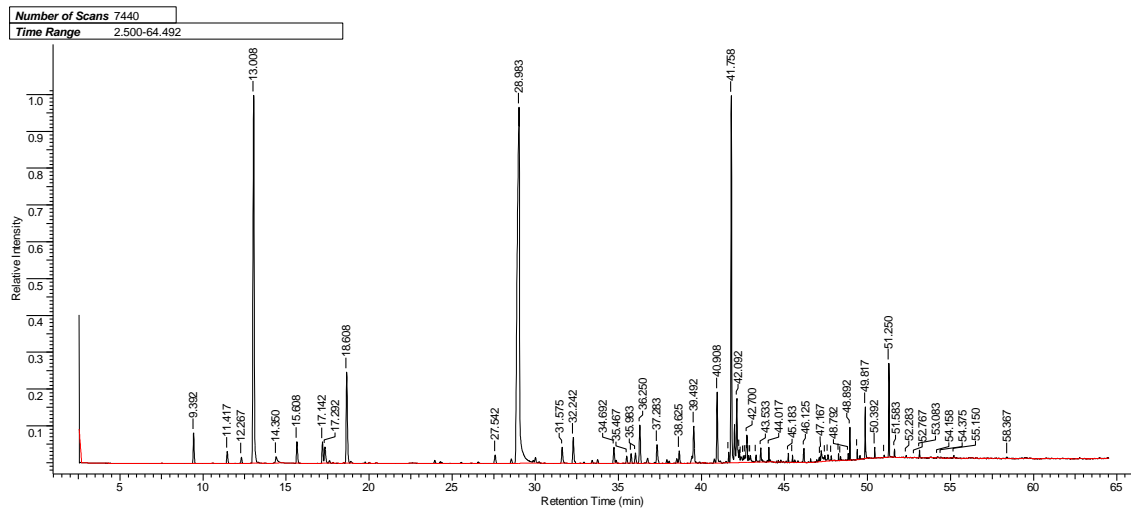
Padrão C21-C40

25 May 2014

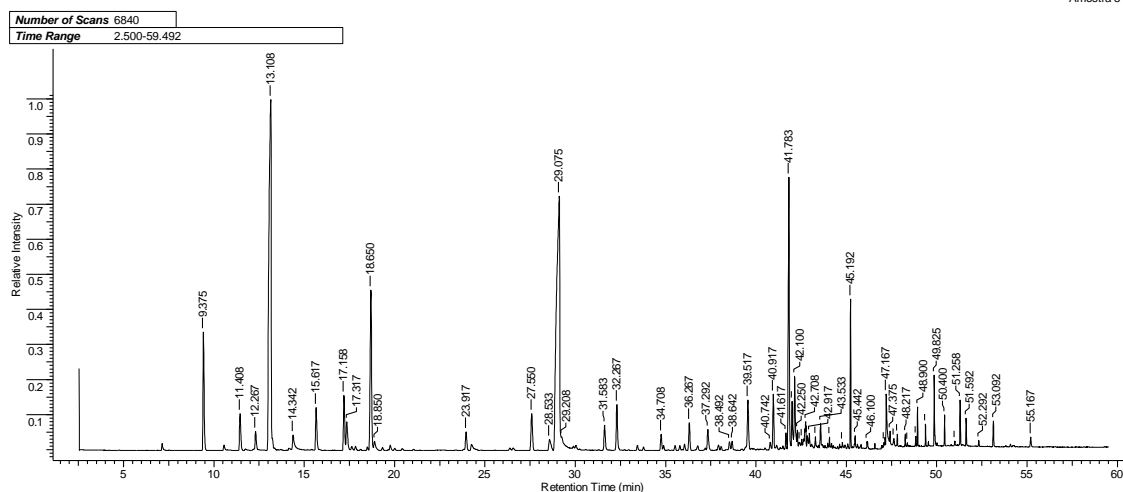


Anexo 7. Análise cromatográfica por CG-MS da série homóloga de alcanos C₂₁-C₄₀ (Sigma-Aldrich)

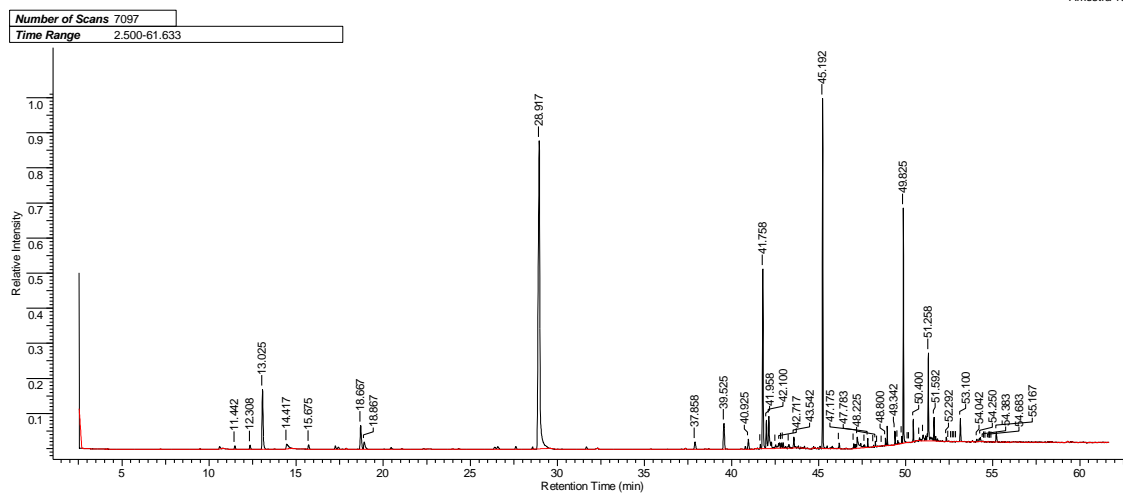
25 May 2014
Amostra 3



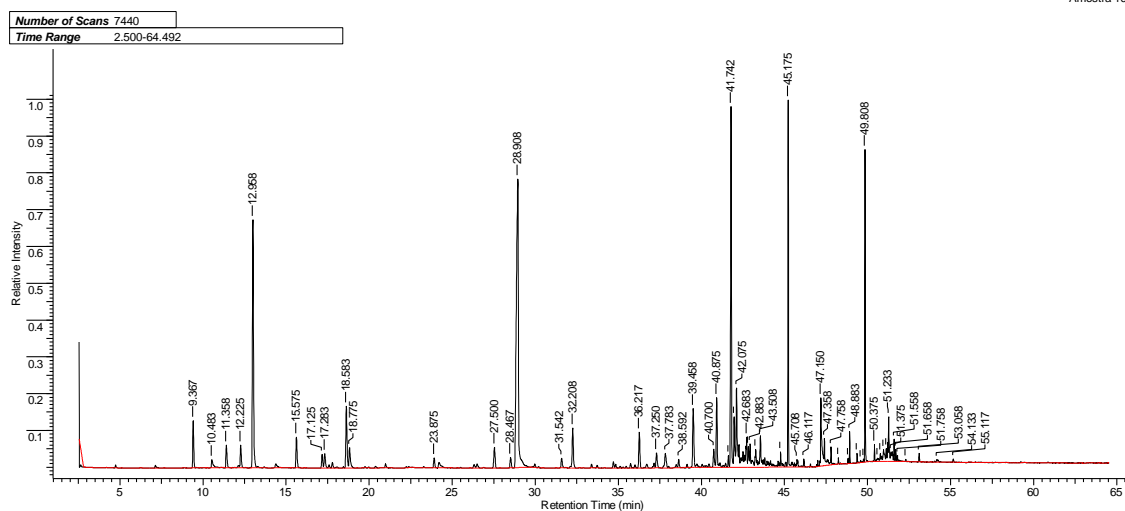
Anexo 8. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento sem nitrogênio



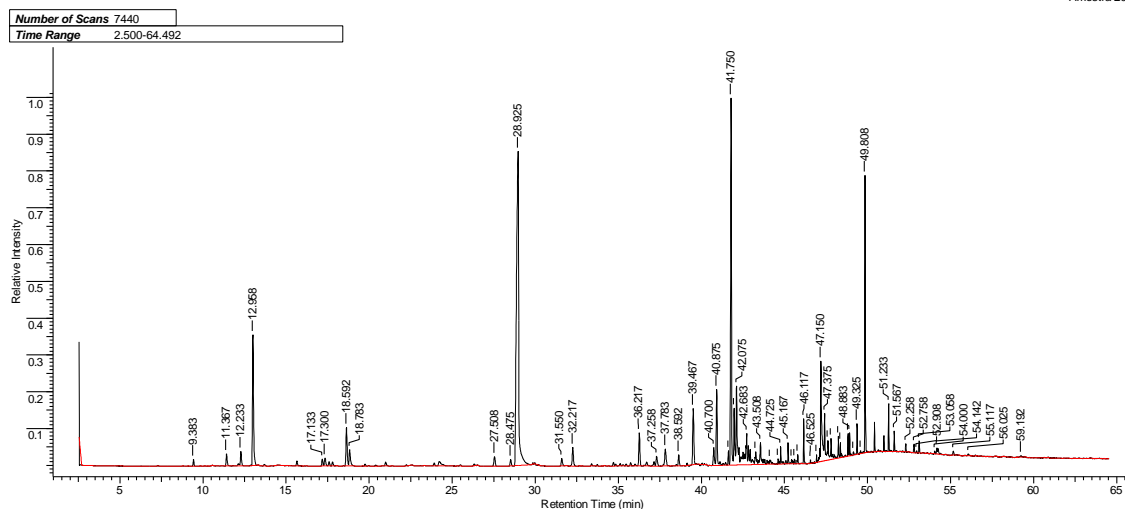
Anexo 9. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NO}_3^- \text{ha}^{-1}$



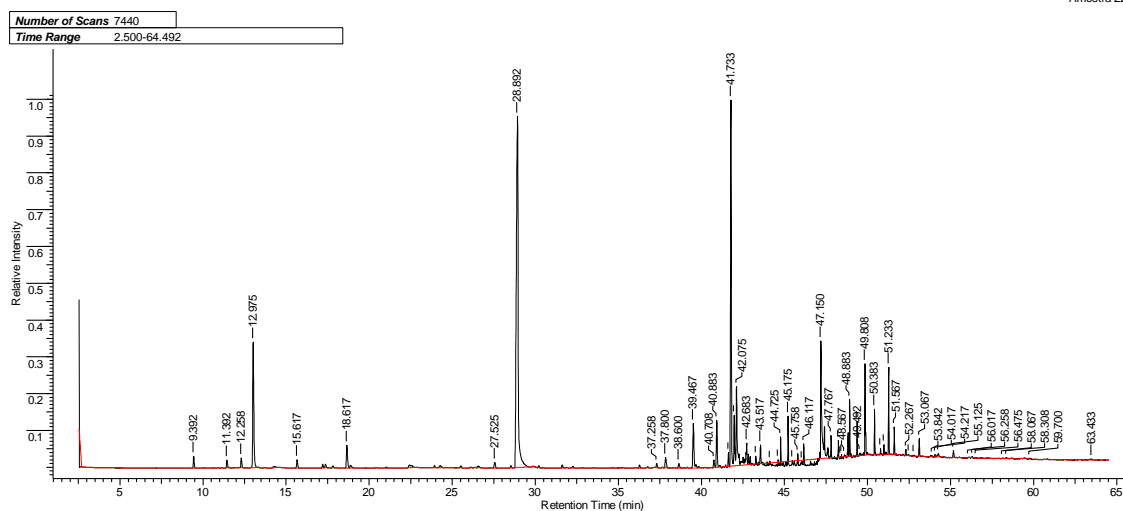
Anexo 10. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NO}_3^- \text{ha}^{-1}$



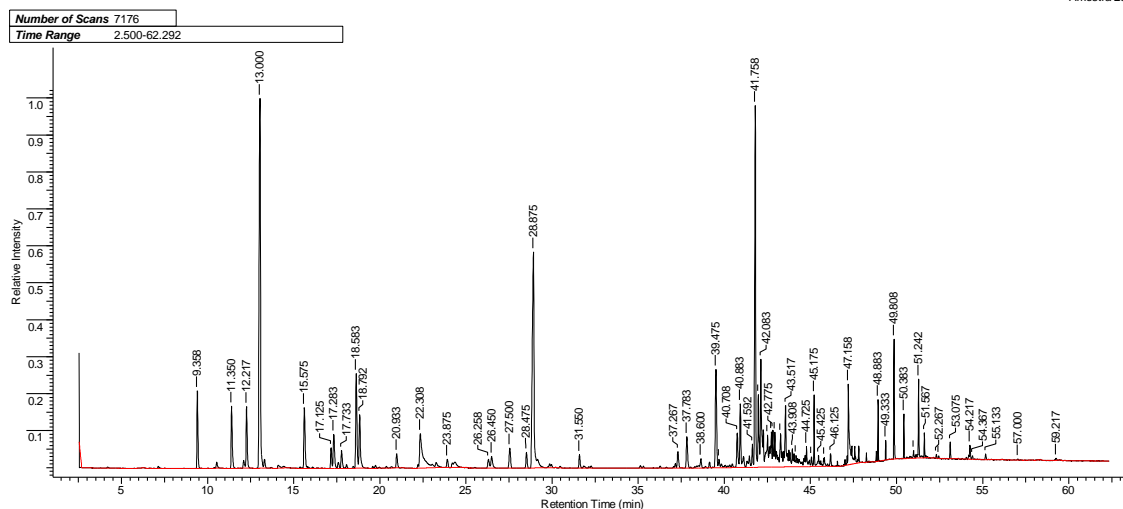
Anexo 11. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{ha}^{-1}$



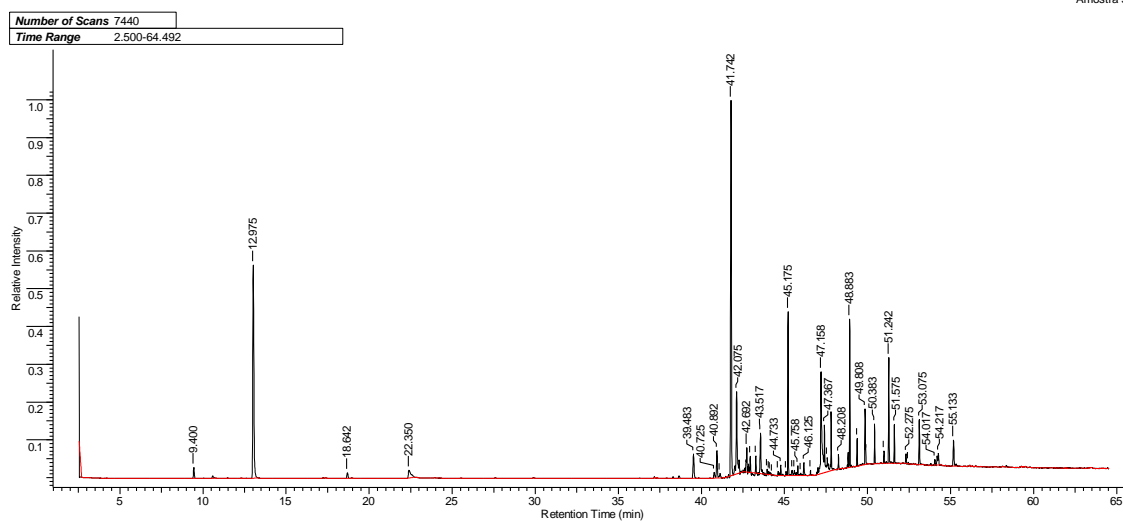
Anexo 12. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{ha}^{-1}$



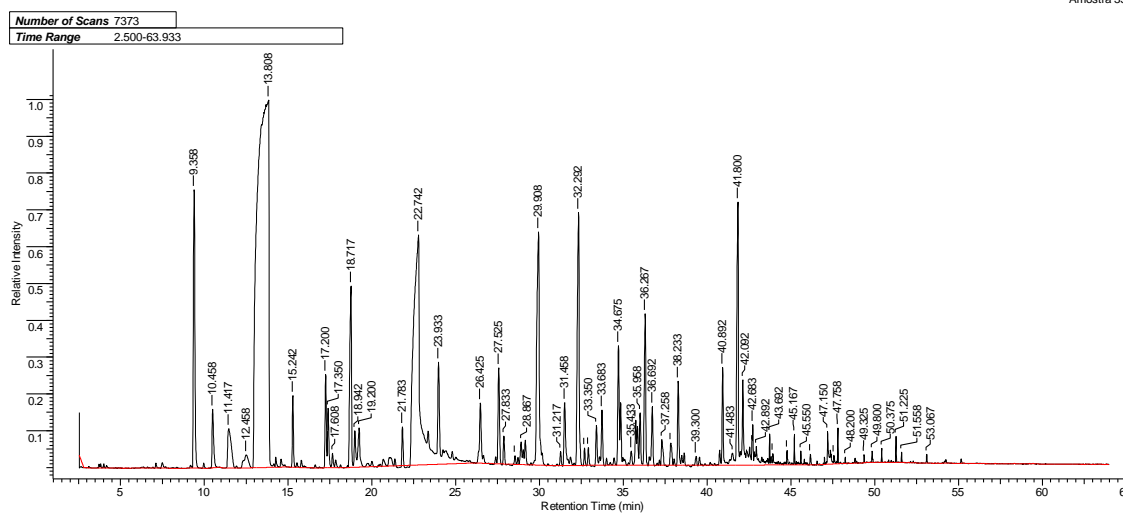
Anexo 13. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com 50Kg.NH₄ ha⁻¹



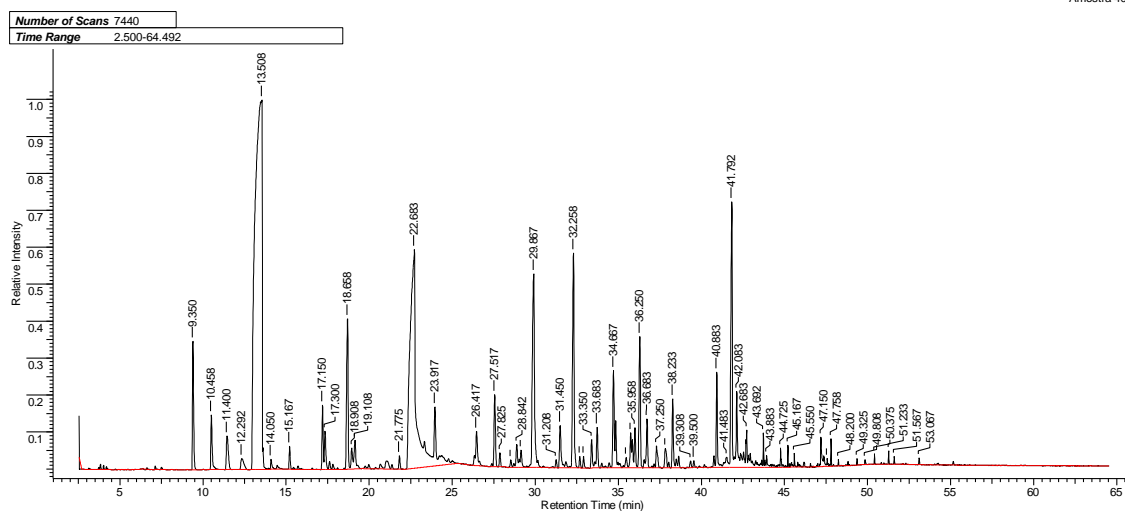
Anexo 14. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com 100Kg.NH₄ ha⁻¹



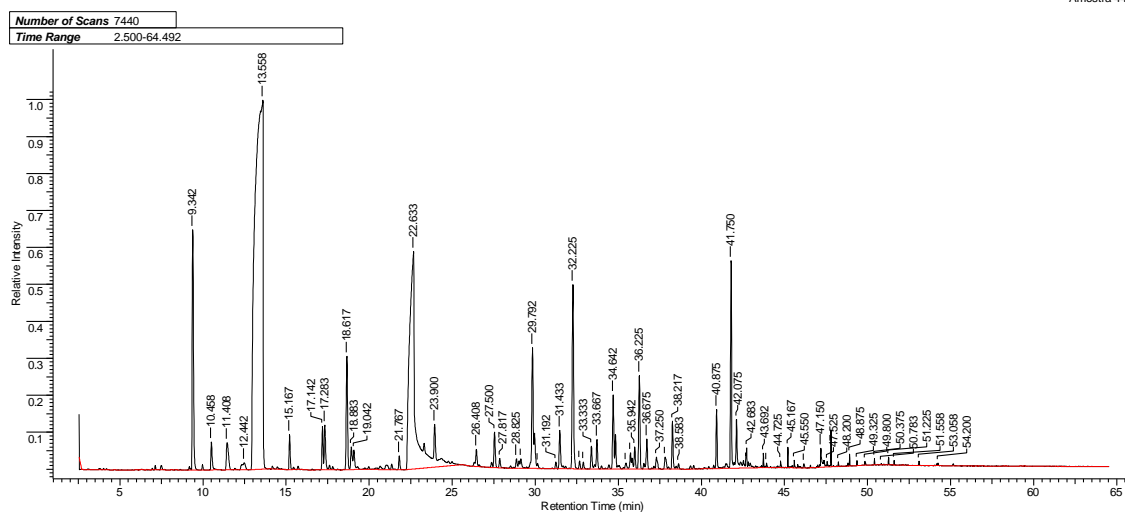
Anexo 15. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento sem N



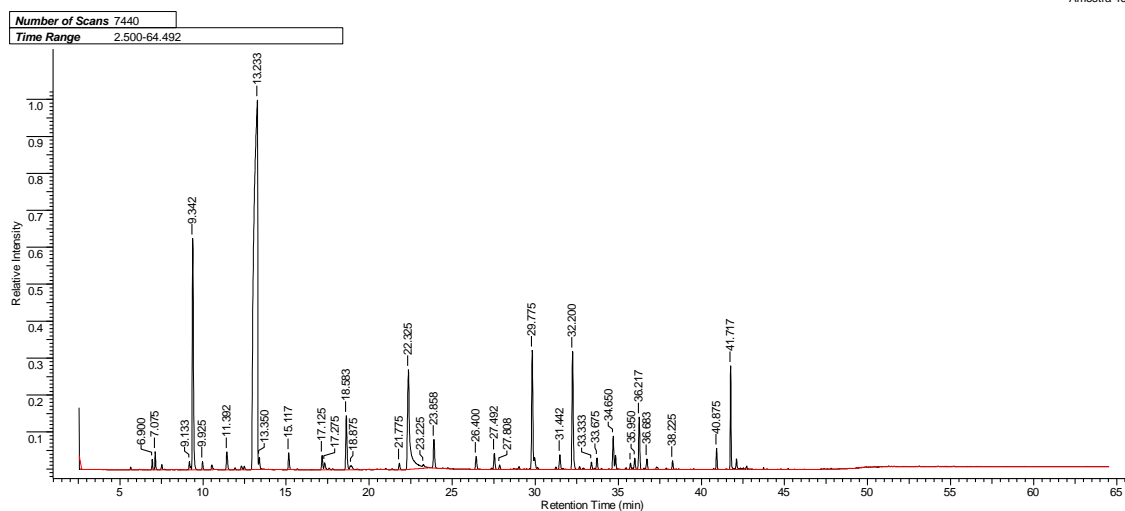
Anexo 16. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.N.O}_3^- \text{ha}^{-1}$



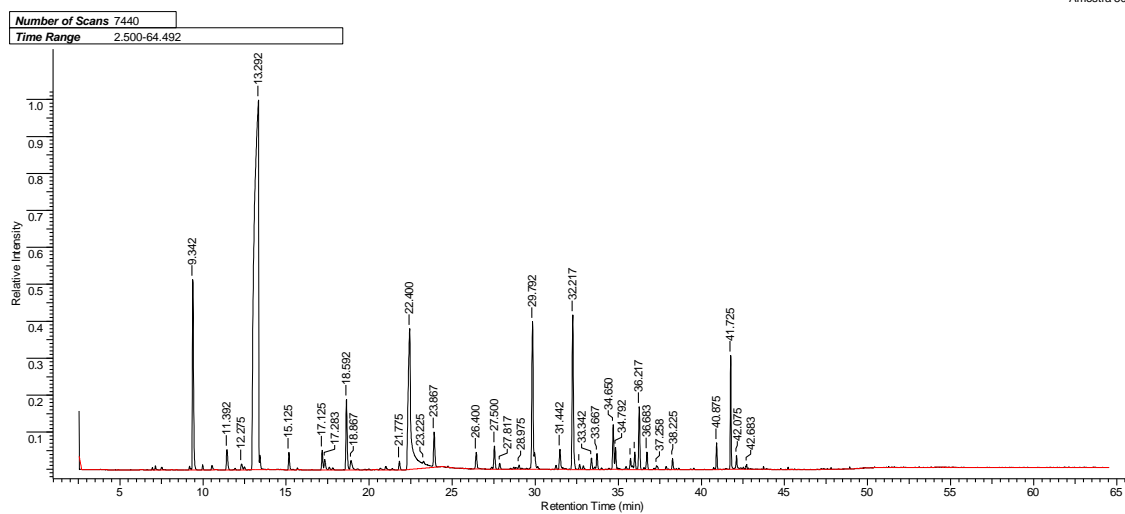
Anexo 17. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NO}_3^- \text{ha}^{-1}$



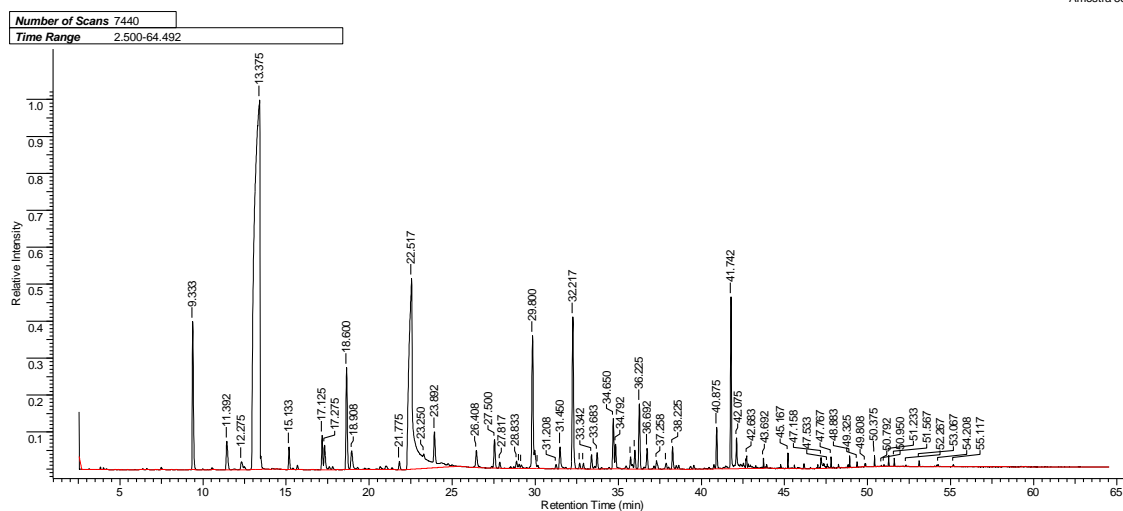
Anexo 18. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3 \text{ha}^{-1}$



Anexo 19. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3 \text{ ha}^{-1}$



Anexo 20. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NH}_4 \text{ ha}^{-1}$



Anexo 21. Análise cromatográfica por CG-MS dos componentes do óleo essencial com a co-injeção dos padrões de alcanos, da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NH}_4^- \text{ha}^{-1}$

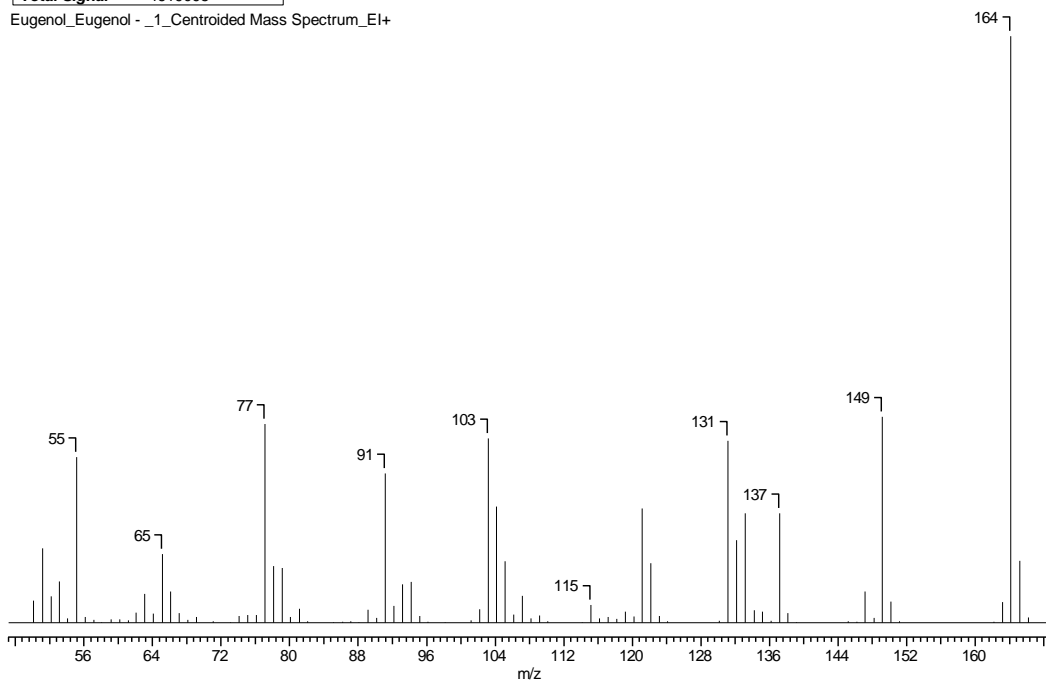
Anexo B- Espectros de massa dos padrões e das amostras de óleo essencial analisadas

Eugenol

19 Aug 2014

Count	87	Data Type	Centroided Mass Spectrum		
Date	25 May 2014 19:49:40	Date Stamp	07 May 2013 10:29:05		
Inlet Model	Other Probe	Instrument	Shimadzu Corporation / GCMS-QP5050 /		
Ion Mode	EI+	Operator	Admin	Plot Type	Stick
Retention Time	29.117	Sample	Eugenol /	Scan	3195
Separation Type	Gas-Solid Chromatography			TIC	560.08
Total Signal	4619095				

Eugenol_Eugenol - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



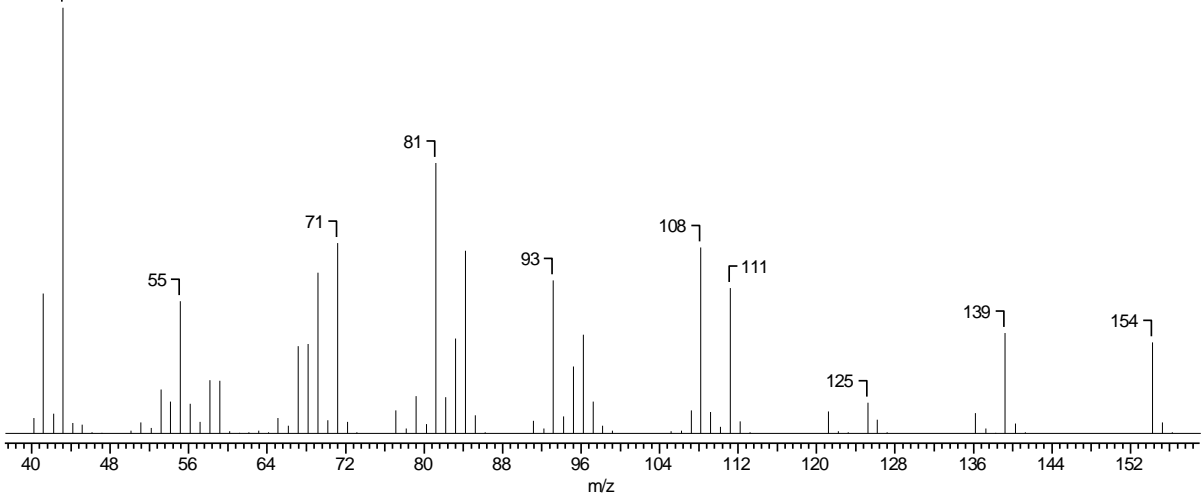
Anexo 22. Espectro de massa do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich)

Eucaliptol

19 Aug 2014

Count	75	Data Type	Centroided Mass Spectrum		
Date	25 May 2014 20:02:06	Date Stamp	07 May 2013 09:05:10		
Inlet Model	Other Probe	Instrument	Shimadzu Corporation / GCMS-QP5050 /		
Ion Mode	EI+	Operator	Admin	Plot Type	Stick
Retention Time	9.508	Sample	Eucaliptol /	Scan	842
Separation Type	Gas-Solid Chromatography		TIC	787.19	
Total Signal	10313592				

Eucaliptol_Eucaliptol - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



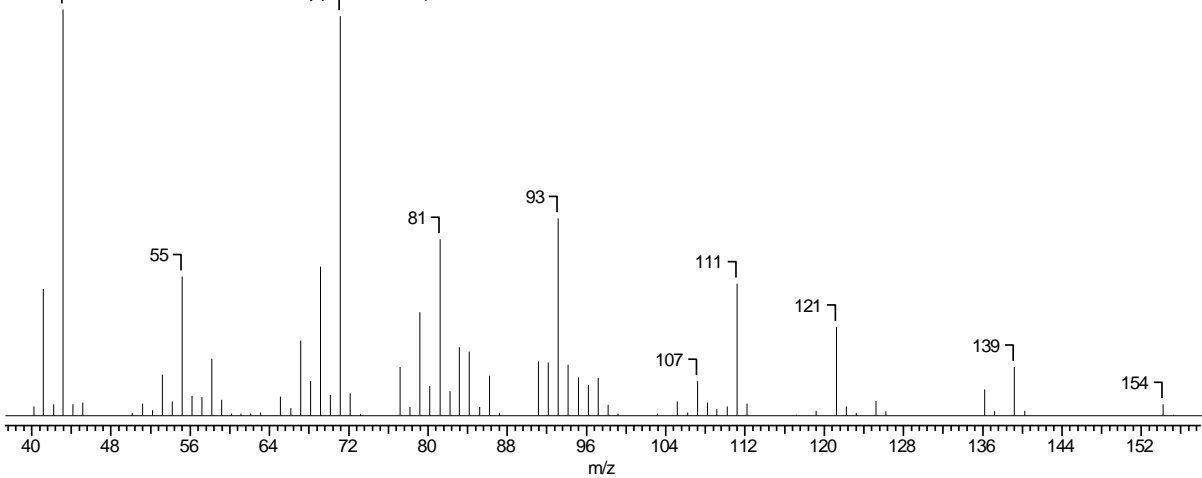
Anexo 23. Espectro de massa do padrão de eucaliptol (Sigma-Aldrich)

Sabineno

19 Aug 2014

Count	71	Data Type	Centroided Mass Spectrum		
Date	25 May 2014 15:37:32	Date Stamp	10 May 2013 14:55:31		
Inlet Model	Other Probe	Instrument	Shimadzu Corporation / GCMS-QP5050 /		
Ion Mode	EI+	Operator	Admin	Plot Type	Stick
Retention Time	11.350	Sample	Hid.Sabineno /	Scan	1063
Separation Type	Gas-Solid Chromatography		TIC	778.65	
Total Signal	2602295				

Hid.Sabineno_Hid.Sabineno - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



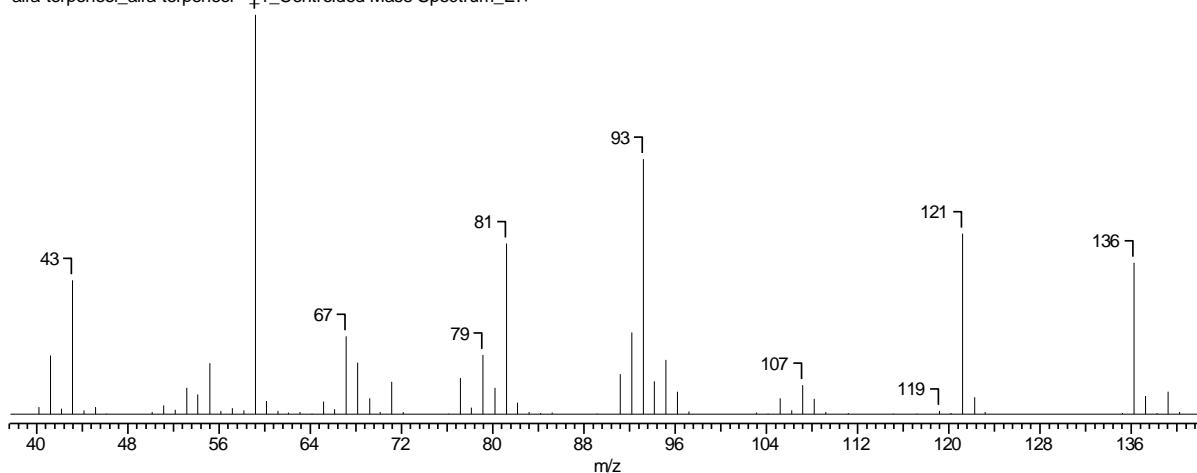
Anexo 24. Espectro de massa do padrão de sabineno (Sigma-Aldrich)

α -terpineol

19 Aug 2014

Count	69	Data Type	Centroided Mass Spectrum	
Date	25 May 2014 13:44:41	Date Stamp	07 May 2013 09:32:31	
Inlet Model	Other Probe	Instrument	Shimadzu Corporation / GCMS-QP5050 /	
Ion Mode	EI+	Operator	Admin	Plot Type Stick
Retention Time	19.033	Sample	alfa-terpeneol /	Scan 1985
Separation Type	Gas-Solid Chromatography		TIC	558.65
Total Signal	8428626			

alfa-terpeneol_alfa-terpeneol_1_Centroided Mass Spectrum_EI+



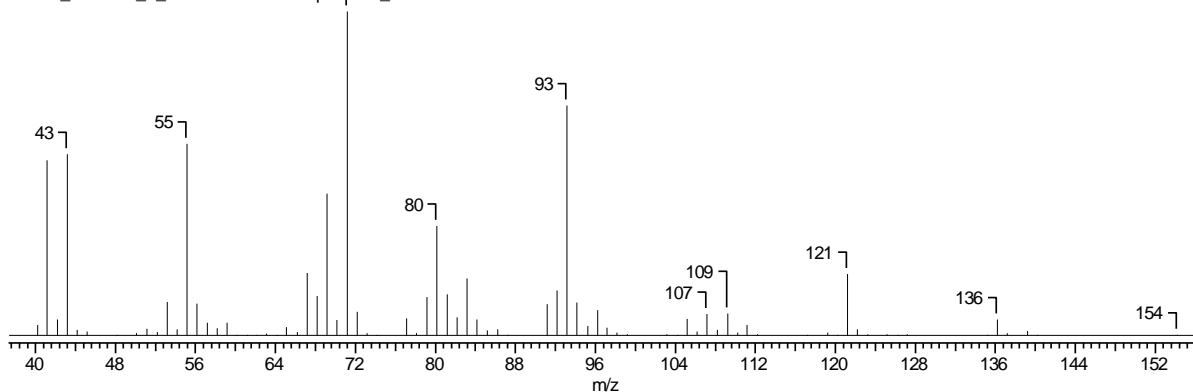
Anexo 25. Espectro de massa do padrão de α -terpineol (Sigma-Aldrich)

Linalol

19 Aug 2014

Count	77	Data Type	Centroided Mass Spectrum	
Date	25 May 2014 15:38:48	Date Stamp	07 May 2013 11:10:41	
Inlet Model	Other Probe	Instrument	Shimadzu Corporation / GCMS-QP5050 /	
Ion Mode	EI+	Operator	Admin	Plot Type Stick
Retention Time	13.317	Sample	Linalol /	Scan 1299
Separation Type	Gas-Solid Chromatography		TIC	680.92
Total Signal	9555634			

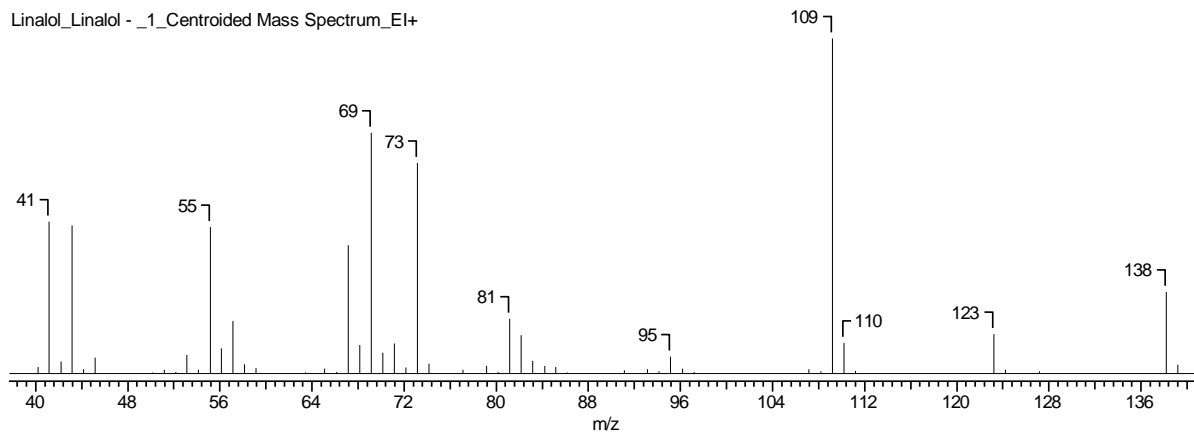
Linalol_Linalol - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



Anexo 26. Espectro de massa do padrão de linalol (Sigma-Aldrich)

Count	52	Data Type	Centroided Mass Spectrum		
Date	25 May 2014 15:38:48	Date Stamp	07 May 2013 11:10:41		
Inlet Model	Other Probe	Instrument	Shimadzu Corporation / GCMS-QP5050 /		
Ion Mode	EI+	Operator	Admin	Plot Type	Stick
Retention Time	14.900	Sample	Linalol /	Scan	1489
Separation Type	Gas-Solid Chromatography	TIC	586.24		
Total Signal	2379602				

Linalol_Linalol - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



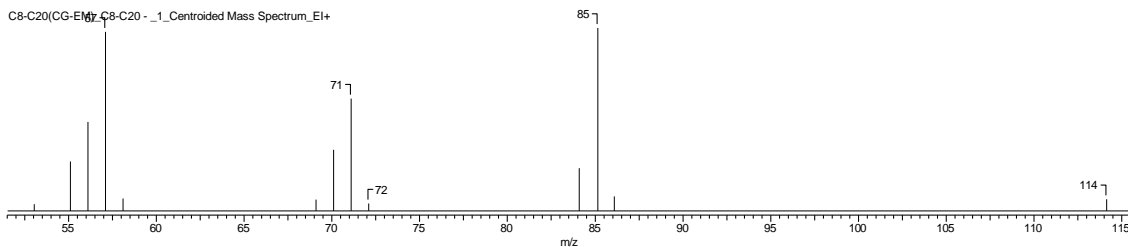
Anexo 27. Espectro de massa do padrão de linalol (Sigma-Aldrich)

Padrão C₈-C₂₀

22 Aug 2014

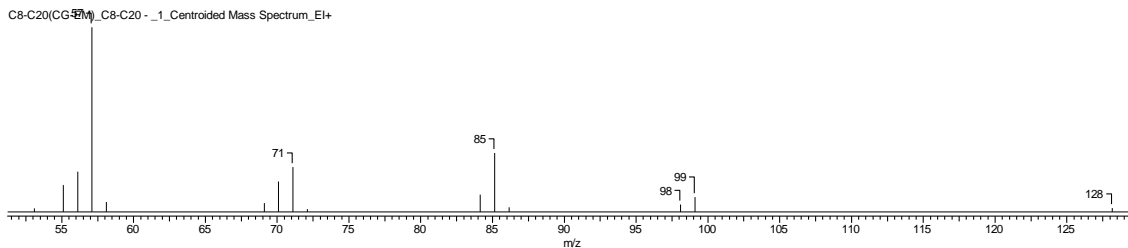
Count	13	Data Type	Centroided Mass Spectrum		Date	25 May 2014 20:13:16		
Date Stamp	17 May 2013 16:00:38	Inlet Model	Other Probe		Instrument	Shimadzu Corporation / GCMS-QP5050 /		
Ion Mode	EI+	Operator	Admin	Plot Type	Stick	Sample	C8-C20 /	
Scan	34	Separation Type	Gas-Solid Chromatography		Retention Time	2.775	Total Signal	144185
					TIC	426.61		

C8-C20(CG-EI+) - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



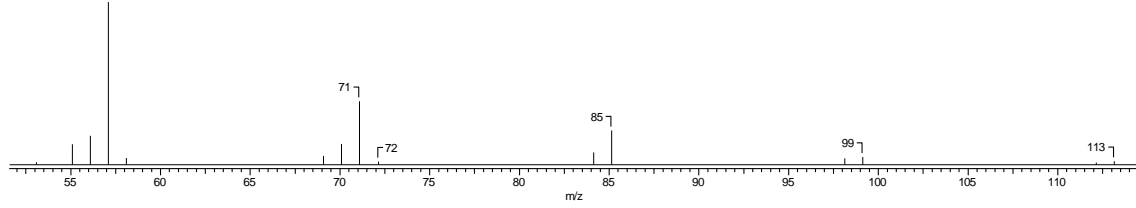
Retention Time 4.475

C8-C20(CG-EI+) - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



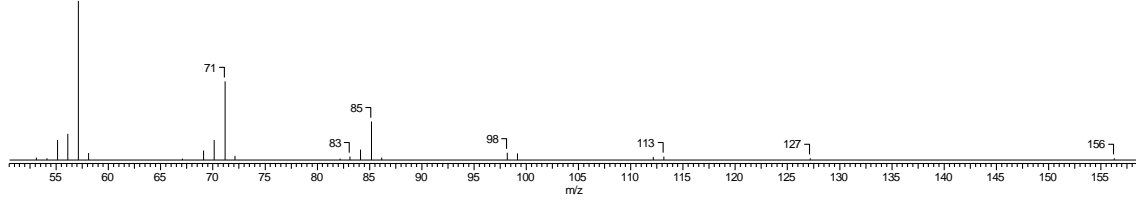
Retention Time 7.617

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



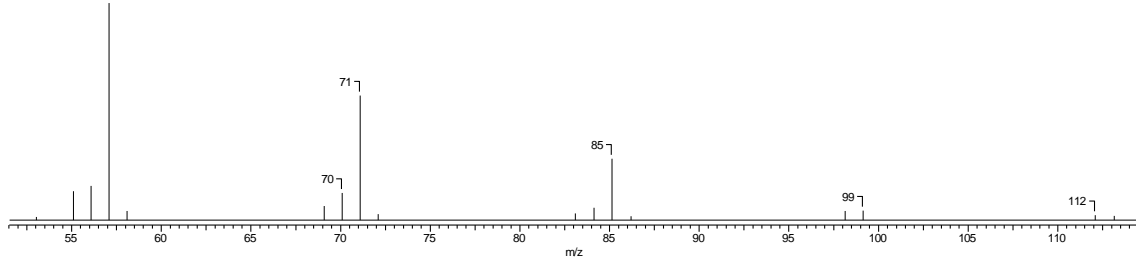
Retention Time 12.208

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



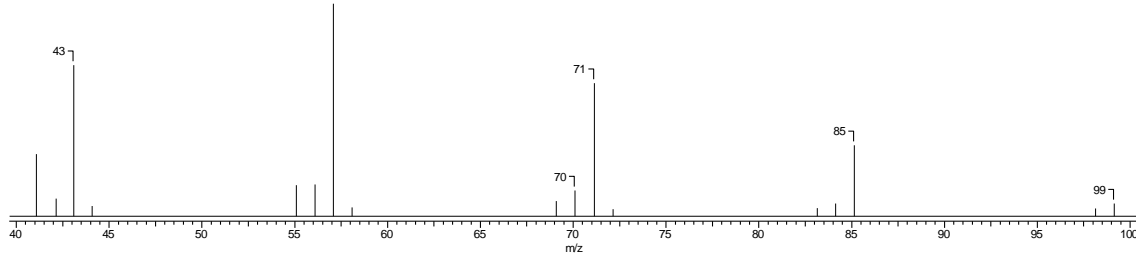
Retention Time 17.933

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



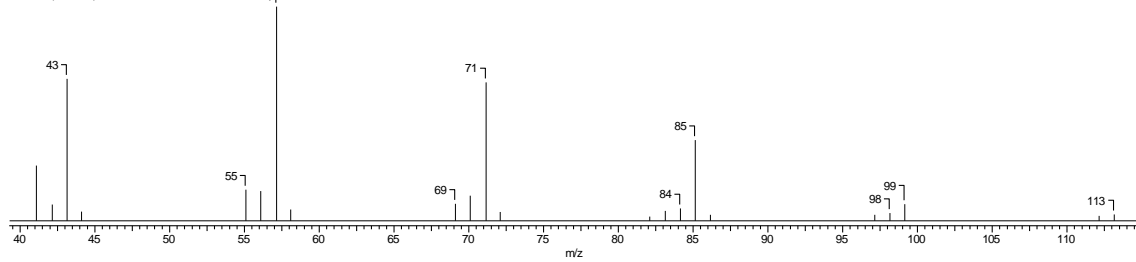
Retention Time 24.125

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



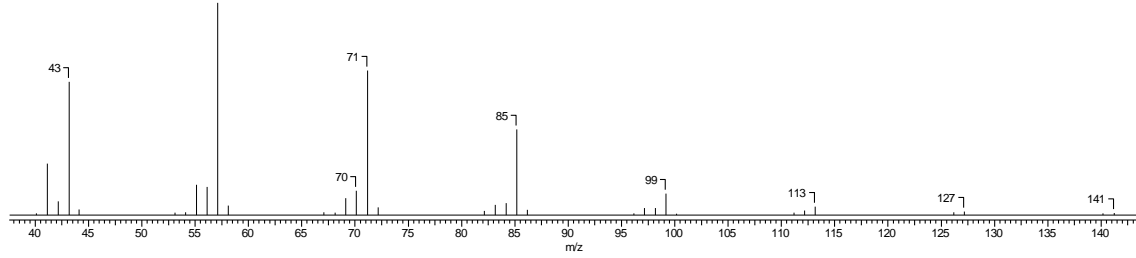
Retention Time 30.058

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



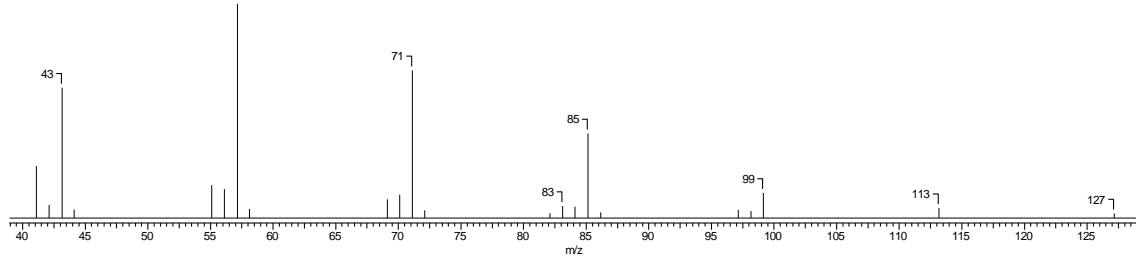
Retention Time 35.167

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



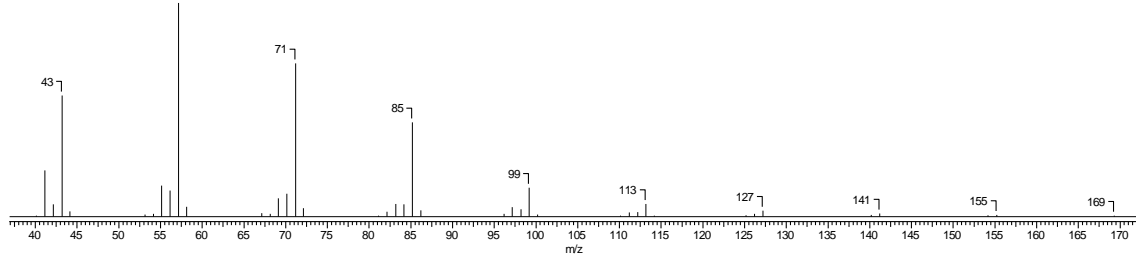
Retention Time 39.600

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



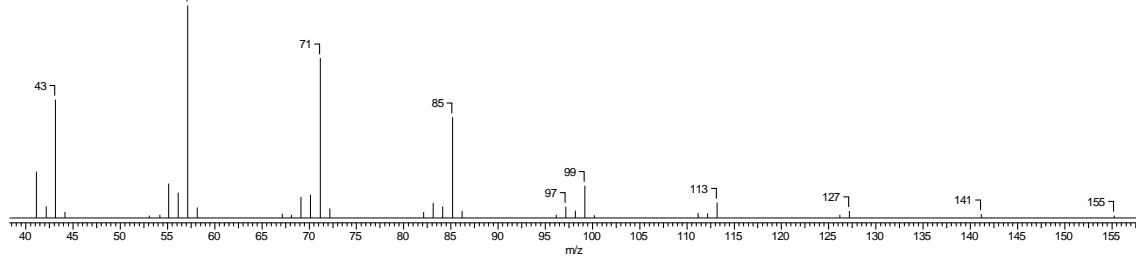
Retention Time 42.483

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _57_Centroided Mass Spectrum_EI+



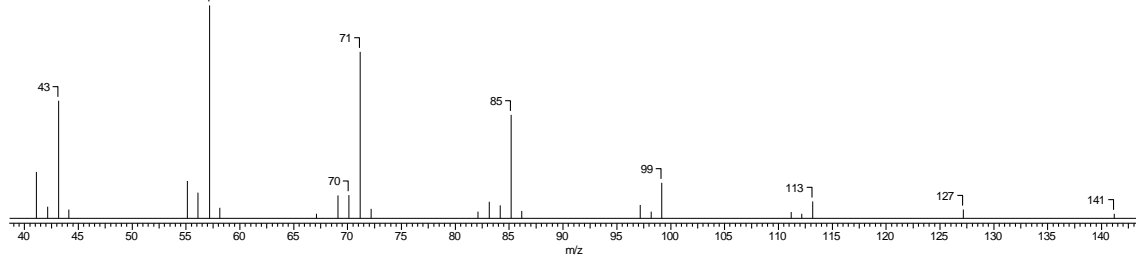
Retention Time 44.033

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _150_Centroided Mass Spectrum_EI+



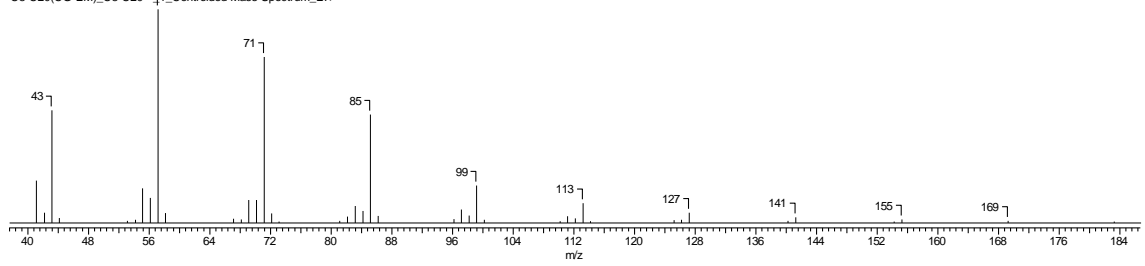
Retention Time 45.167

C8-C20(CG-EM)_C8-C20 - _1_Centroided Mass Spectrum_EI+



Retention Time 46.100

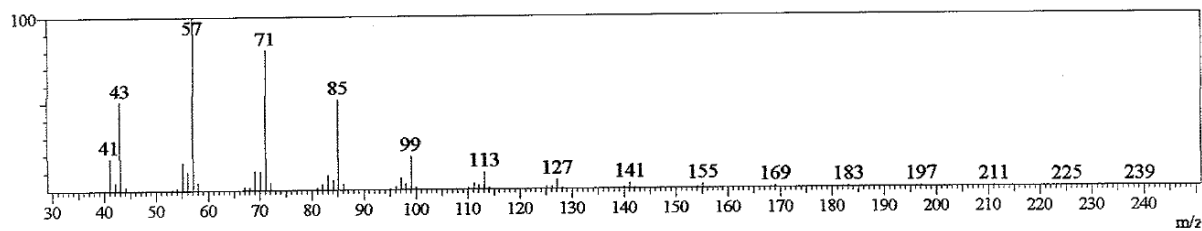
C8-C20(CG-EM)_C8-C207_1_Centroided Mass Spectrum_EI+



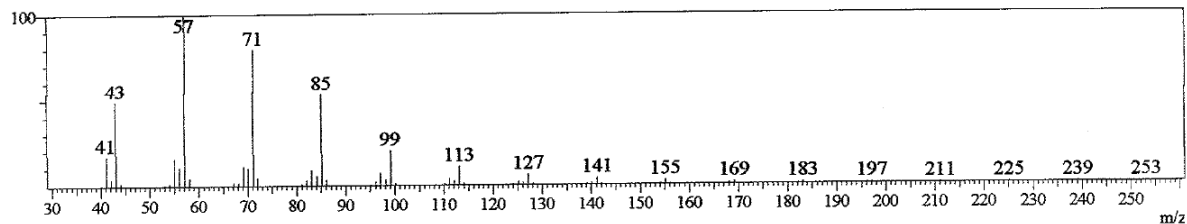
Anexo 28. Espectro de massa do padrão C₈-C₂₀ (Sigma-Aldrich)

Padrão C₂₁-C₄₀

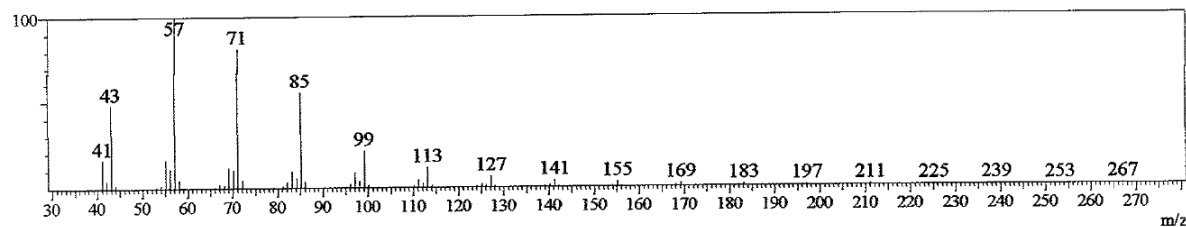
Line#:1 R.Time:46.9(Scan#:3226)



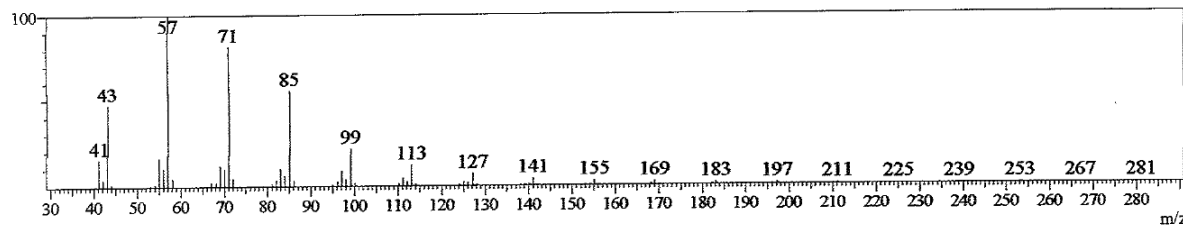
Line#:2 R.Time:47.6(Scan#:3308)



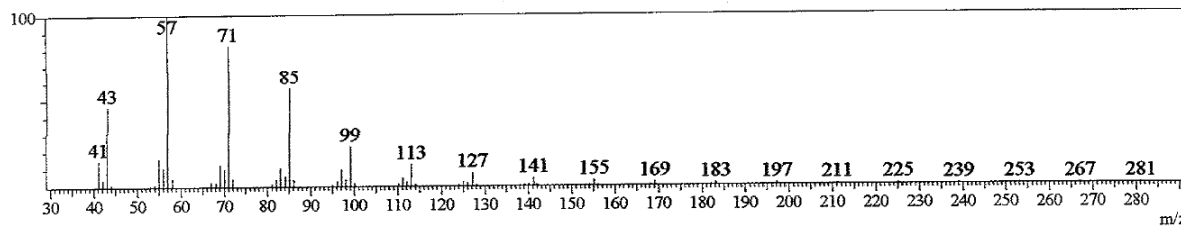
Line#:3 R.Time:48.2(Scan#:3383)



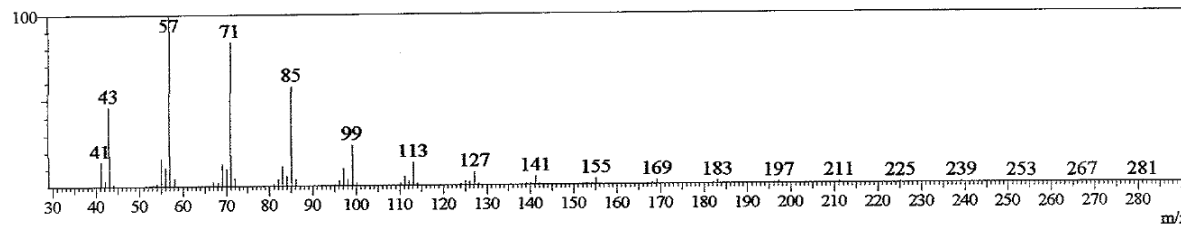
Line#:4 R.Time:48.8(Scan#:3453)



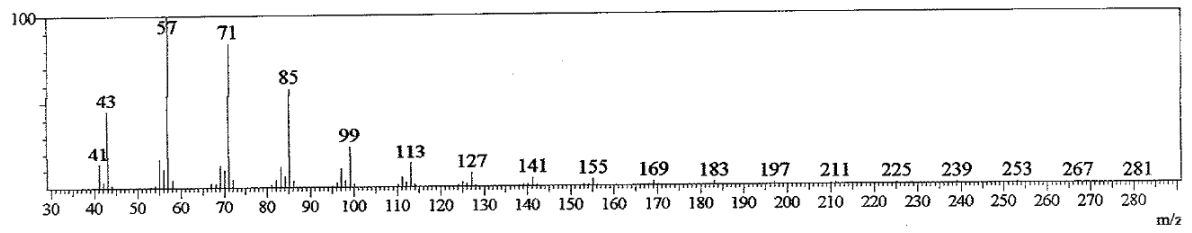
Line#:5 R.Time:49.3(Scan#:3518)



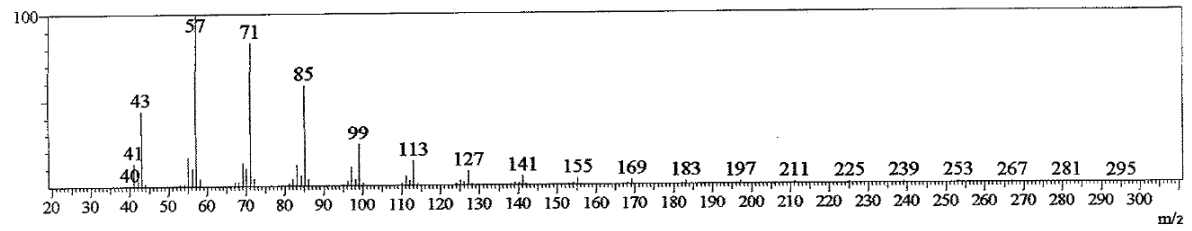
Line#:6 R.Time:49.8(Scan#:3580)



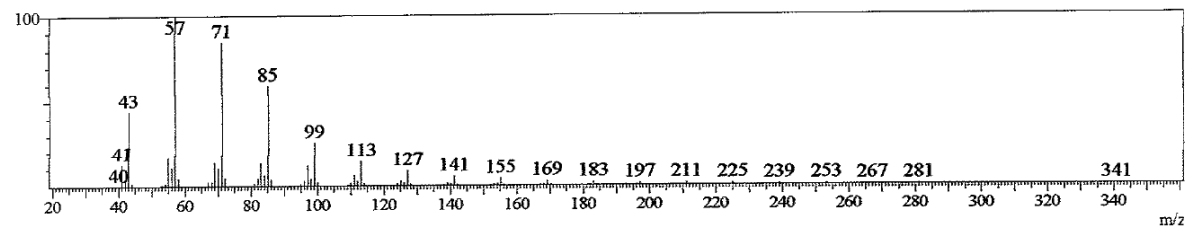
Line#:7 R.Time:50.4(Scan#:3644)



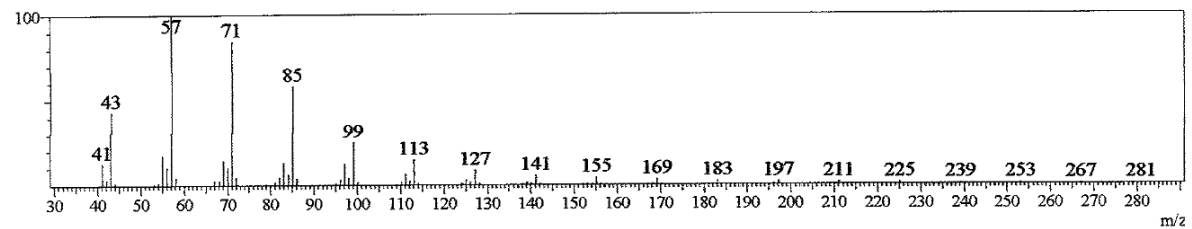
Line#:8 R.Time:50.9(Scan#:3711)



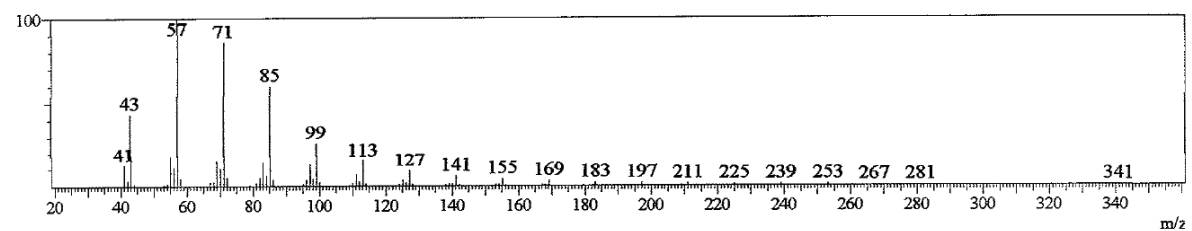
Line#:9 R.Time:51.5(Scan#:3785)



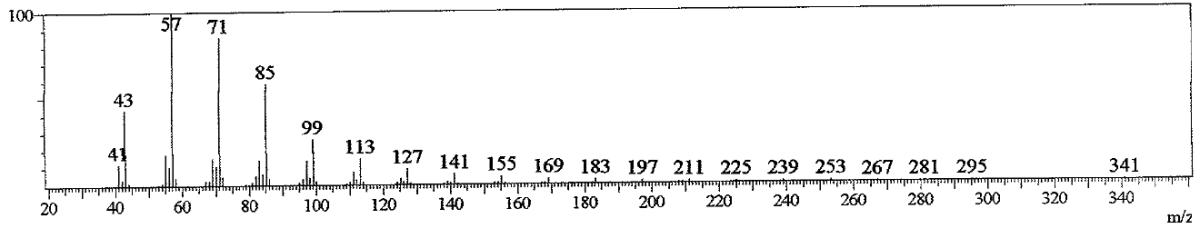
Line#:10 R.Time:52.2(Scan#:3869)



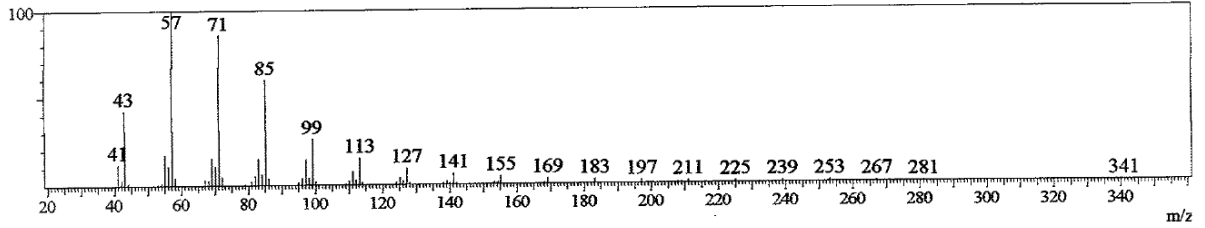
Line#:11 R.Time:53.0(Scan#:3964)



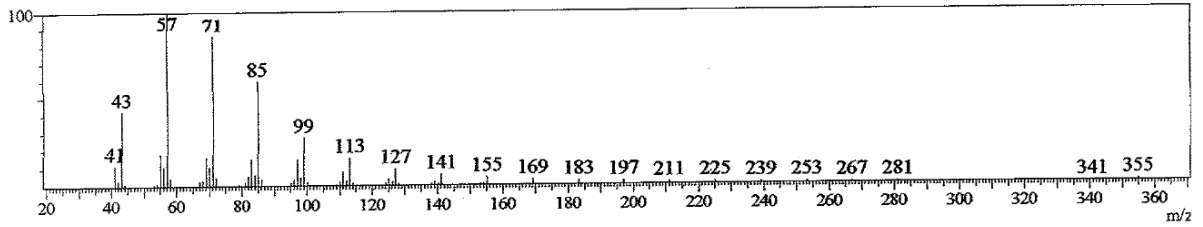
Line# 12 R.Time:54.0(Scan# 4076)



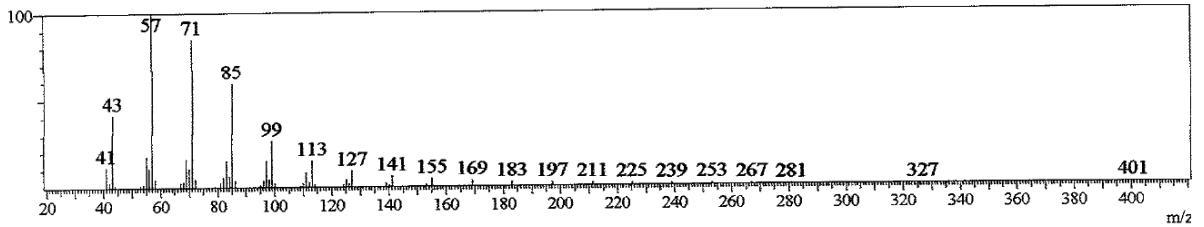
Line# 13 R.Time:55.1(Scan# 4208)



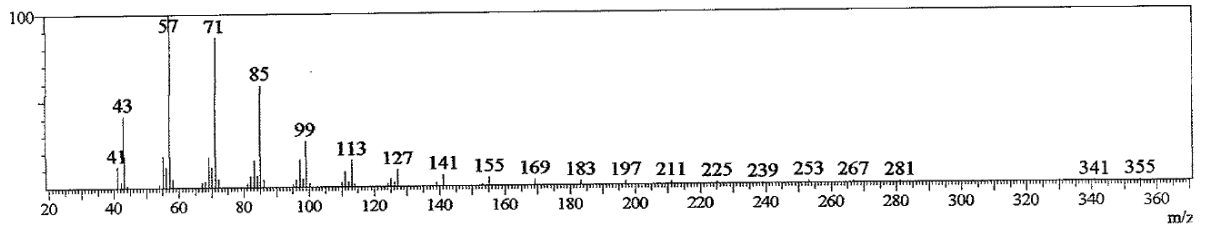
Line# 14 R.Time:56.4(Scan# 4367)



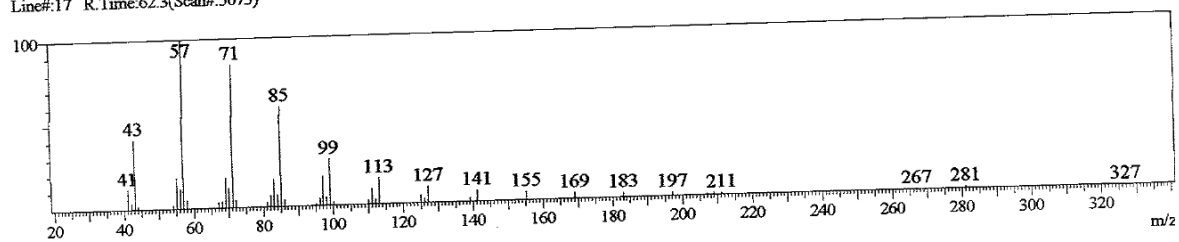
Line# 15 R.Time:58.0(Scan# 4559)



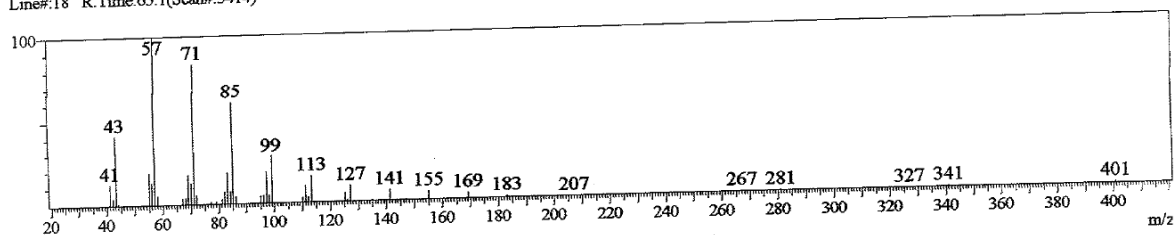
Line# 16 R.Time:59.9(Scan# 4791)



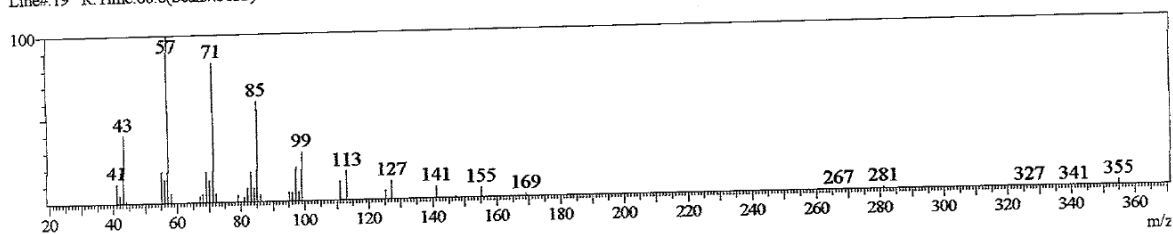
Line#:17 R.Time:62.3(Scan#:5073)



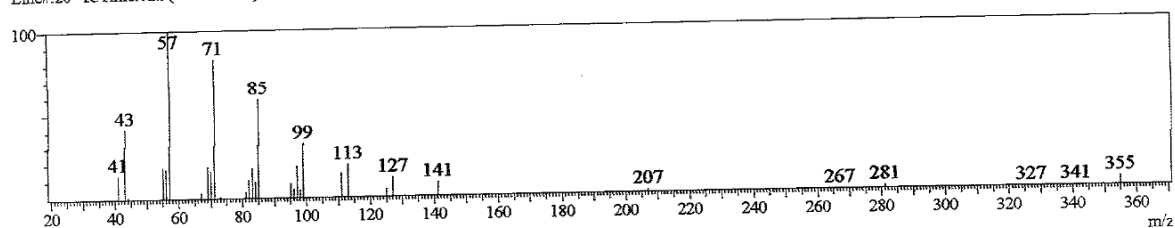
Line#:18 R.Time:65.1(Scan#:5414)



Line#:19 R.Time:68.6(Scan#:5833)



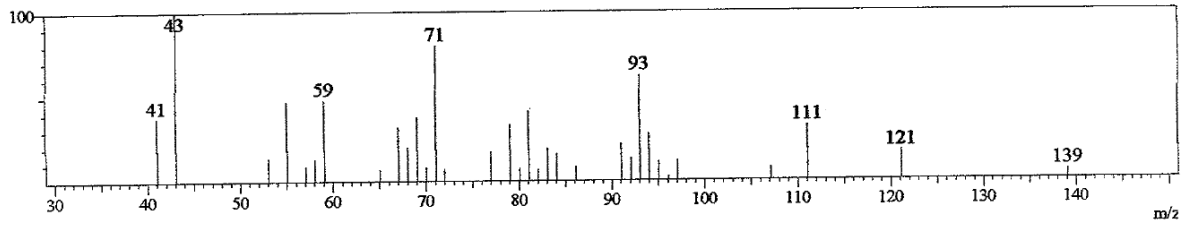
Line#:20 R.Time:72.9(Scan#:6347)



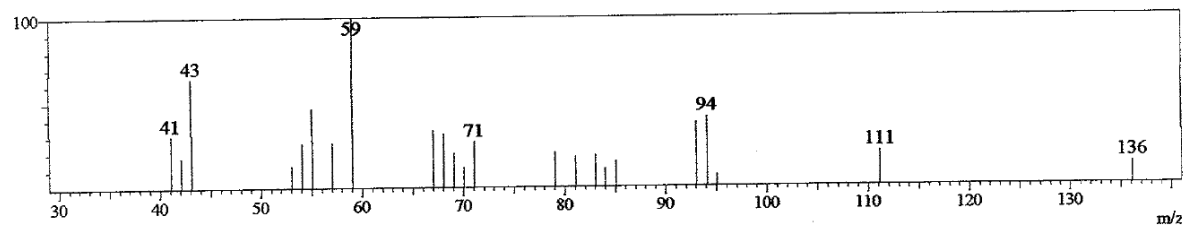
Anexo 29. Espectro de massa do padrão C₂₁-C₄₀ (Sigma-Aldrich)

Espectro de massa das amostras de óleo essencial de manjeriçã variedade *Sweet Italian Large Leaf*

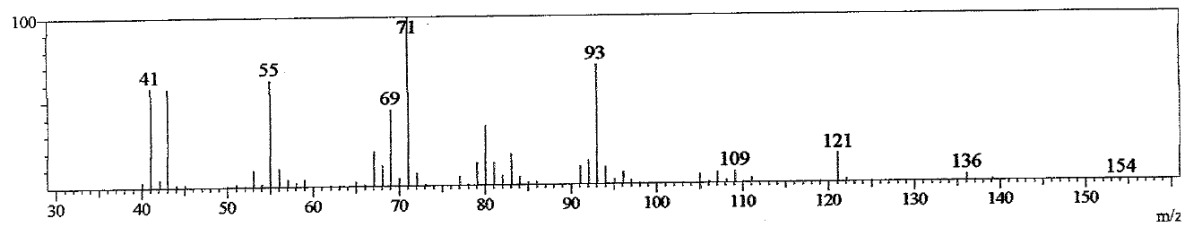
Line#2 R.Time:11.4(Scan#:1070)



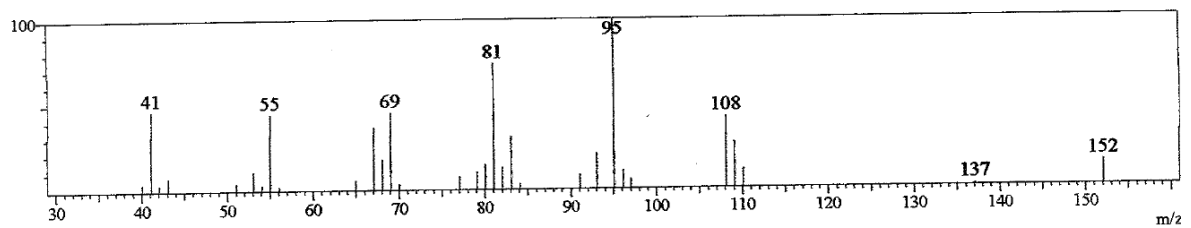
Line#3 R.Time:12.3(Scan#:1173)



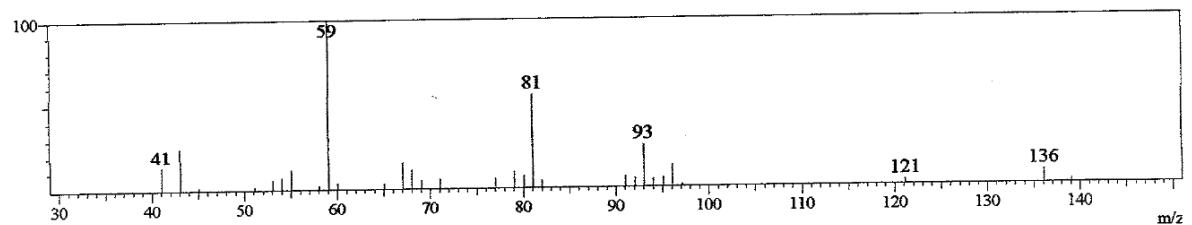
Line#4 R.Time:13.0(Scan#:1262)



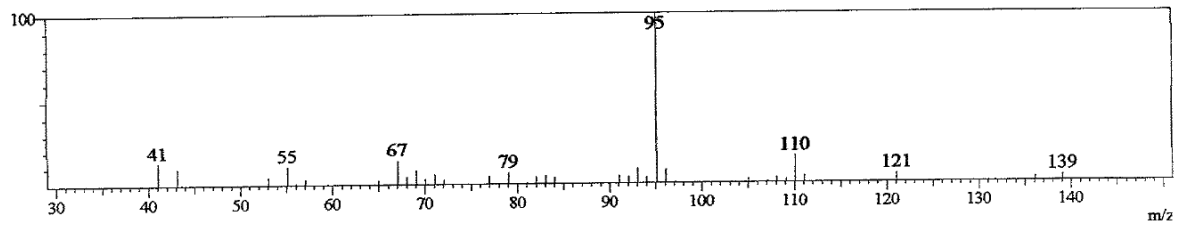
Line#5 R.Time:15.6(Scan#:1574)



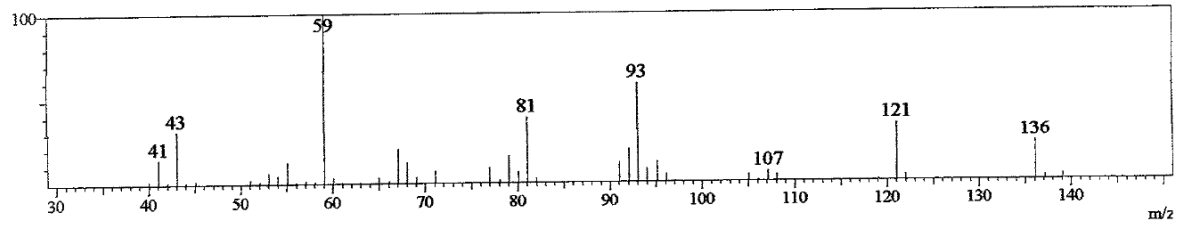
Line#6 R.Time:17.1(Scan#:1758)



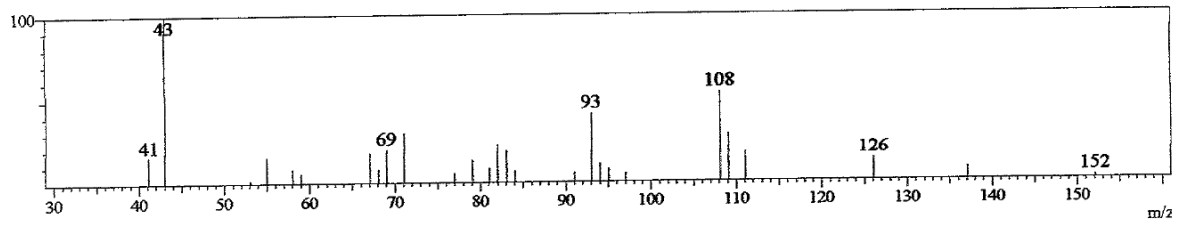
Line#7 R.Time:17.3(Scan#:1776)



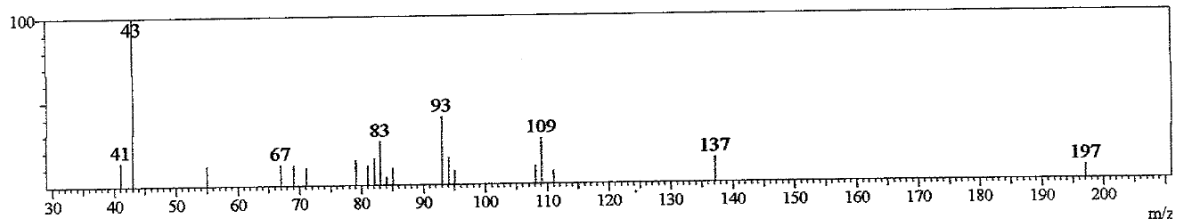
Line#8 R.Time:18.6(Scan#:1934)



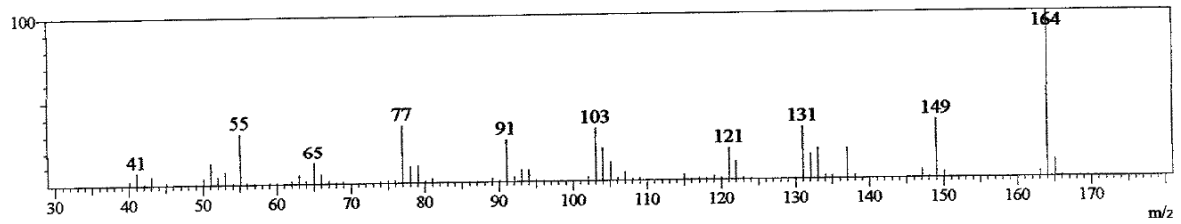
Line#9 R.Time:27.5(Scan#:3006)



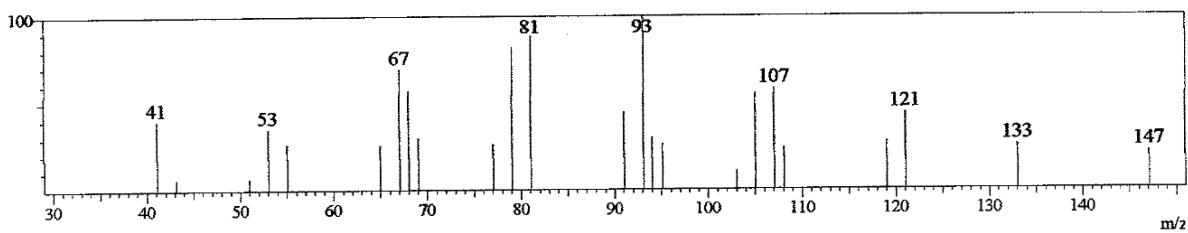
Line#10 R.Time:28.5(Scan#:3122)



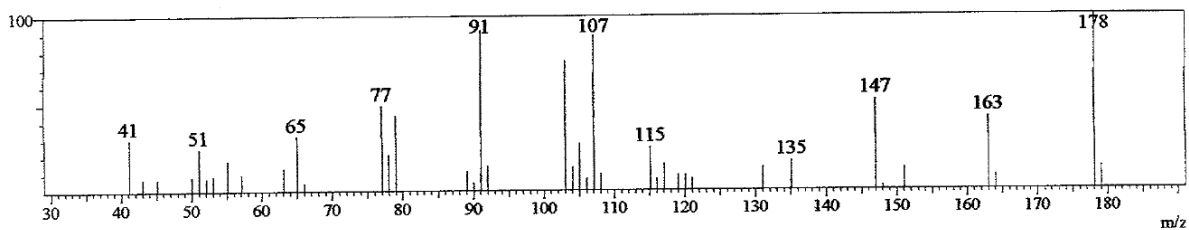
Line#11 R.Time:29.0(Scan#:3178)



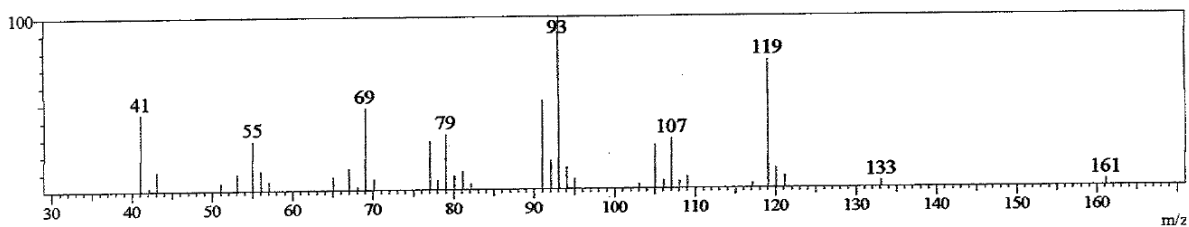
Line#:12 R.Time:30.0(Scan#:3297)



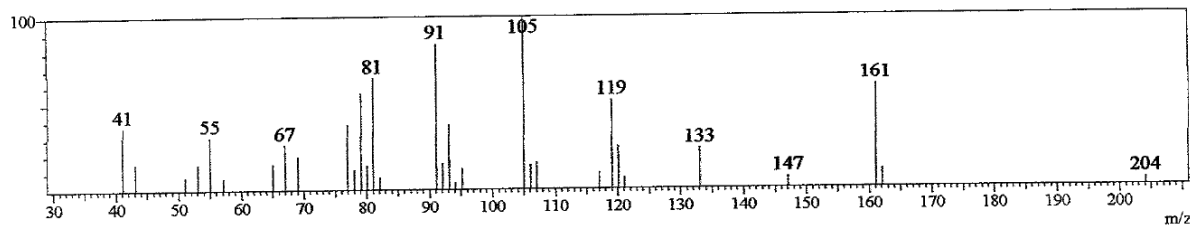
Line#:13 R.Time:31.6(Scan#:3490)



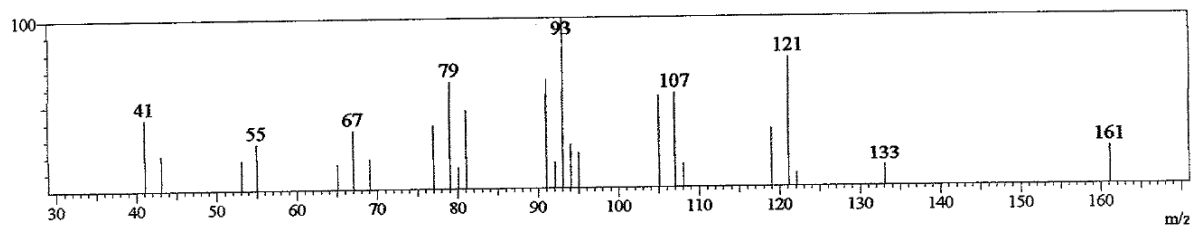
Line#:14 R.Time:32.2(Scan#:3570)



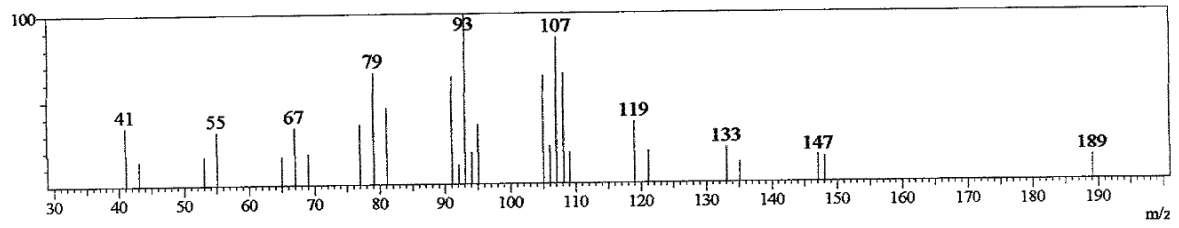
Line#:15 R.Time:34.7(Scan#:3864)



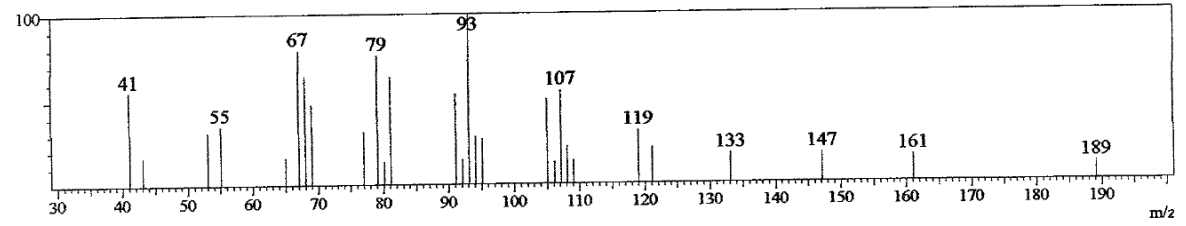
Line#:16 R.Time:35.5(Scan#:3956)



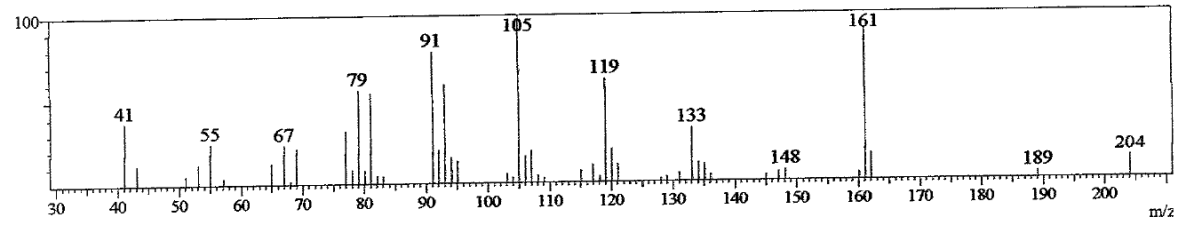
Line#:17 R.Time:35.7(Scan#:3988)



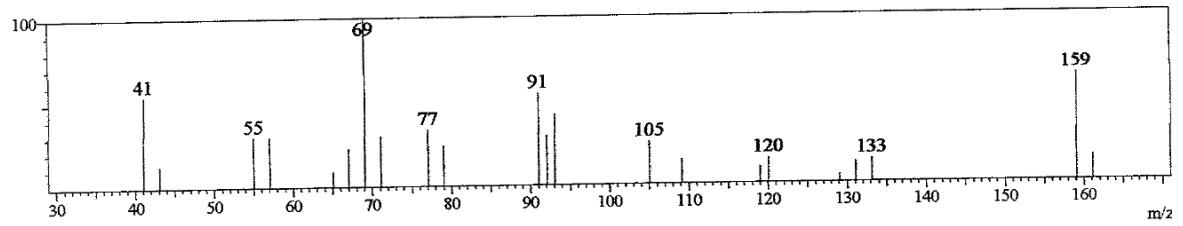
Line#:18 R.Time:36.0(Scan#:4019)



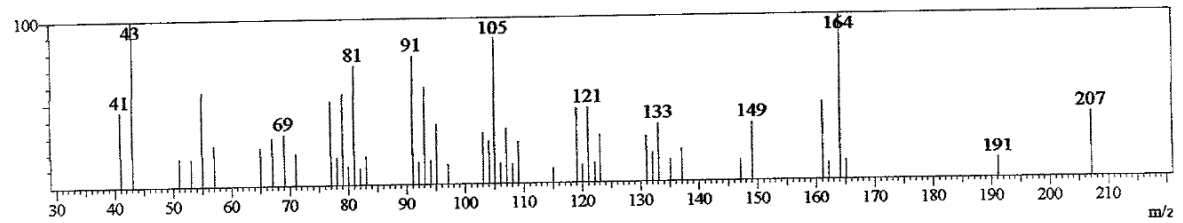
Line#:19 R.Time:36.3(Scan#:4051)



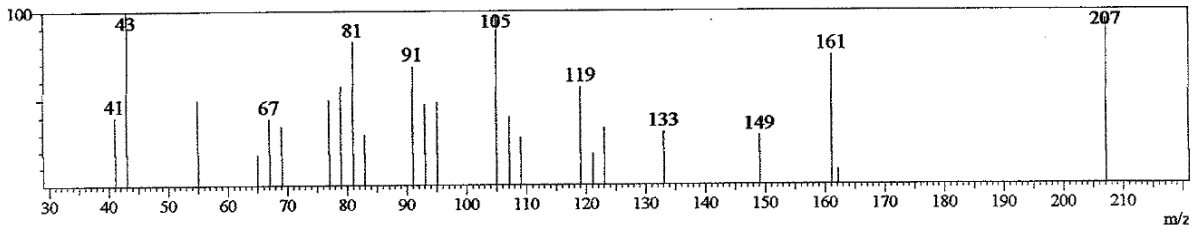
Line#:20 R.Time:36.7(Scan#:4107)



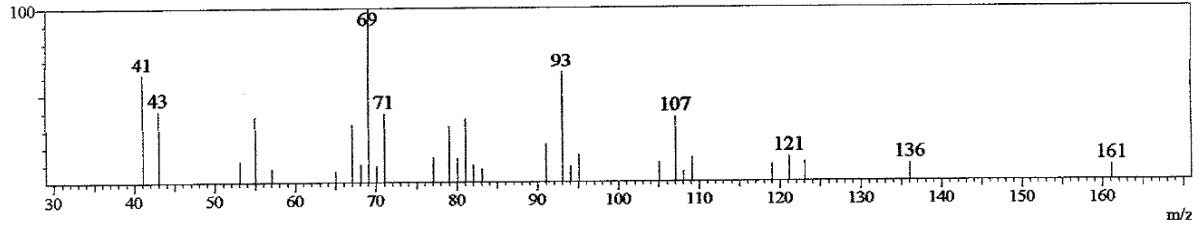
Line#:21 R.Time:37.3(Scan#:4175)



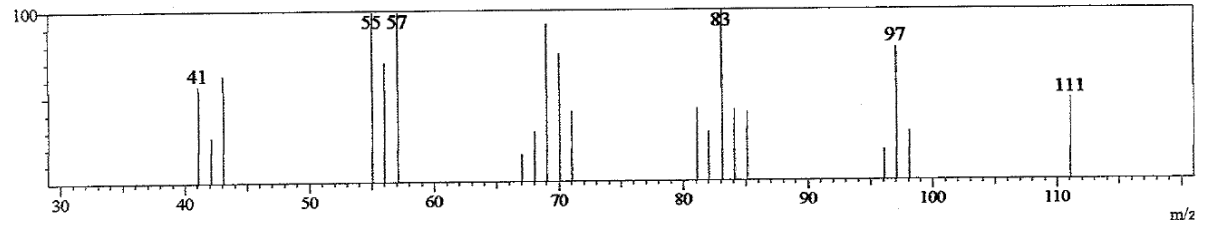
Line#:22 R.Time:38.5(Scan#:4318)



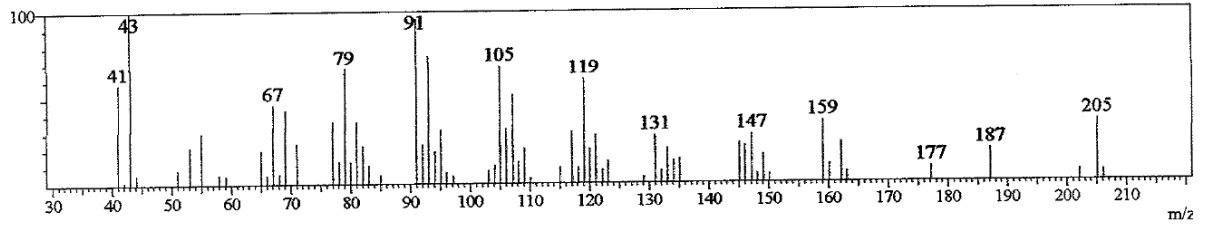
Line#:23 R.Time:38.6(Scan#:4336)



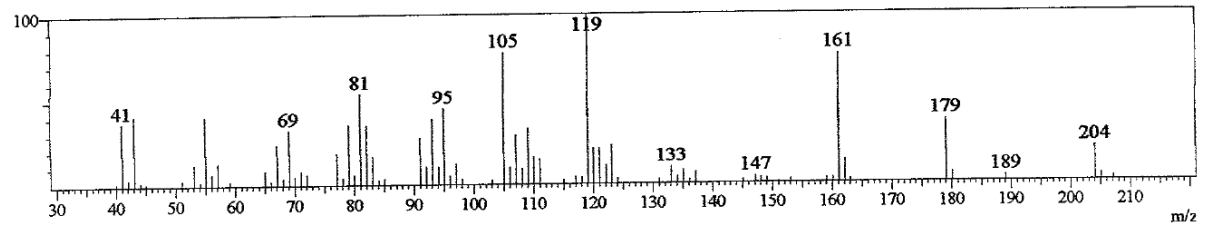
Line#:24 R.Time:39.4(Scan#:4428)



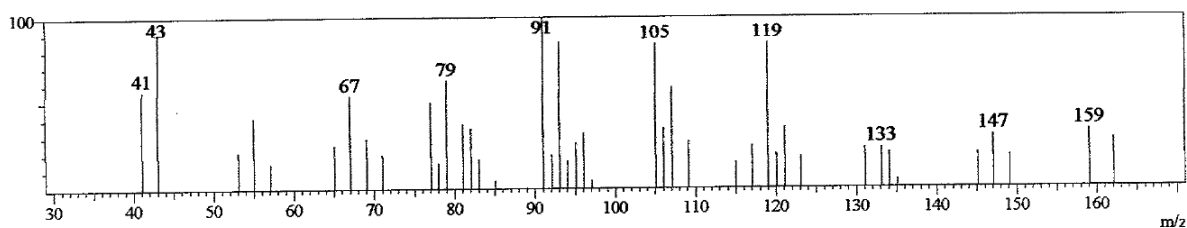
Line#:25 R.Time:39.5(Scan#:4440)



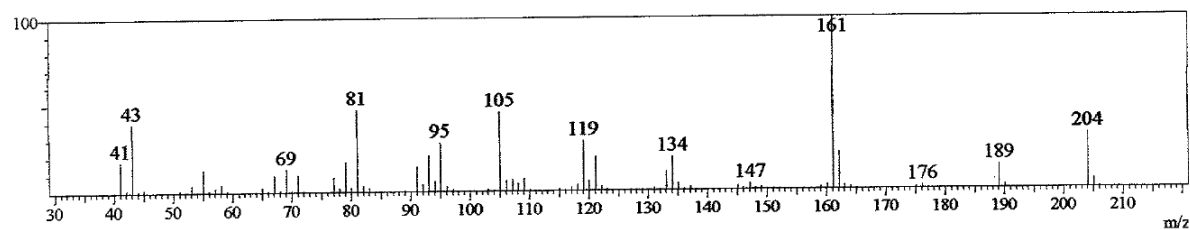
Line#:26 R.Time:40.9(Scan#:4609)



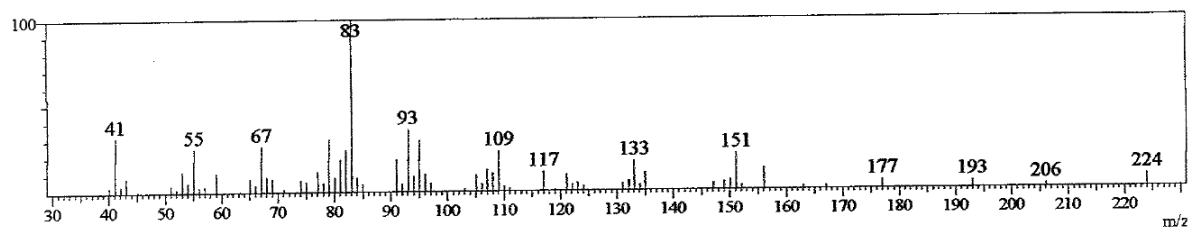
Line#:27 R.Time:41.6(Scan#:4693)



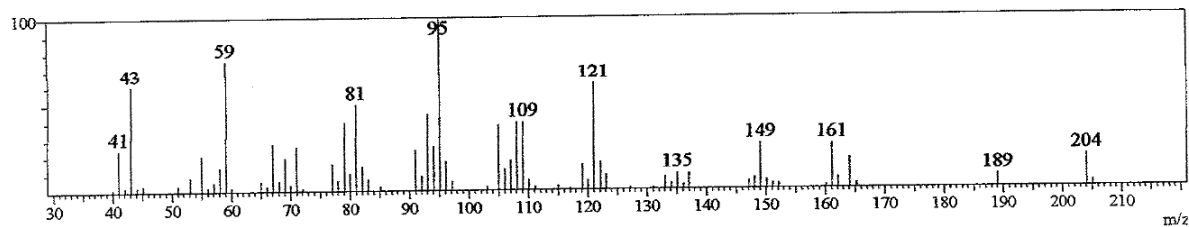
Line#:28 R.Time:41.8(Scan#:4712)



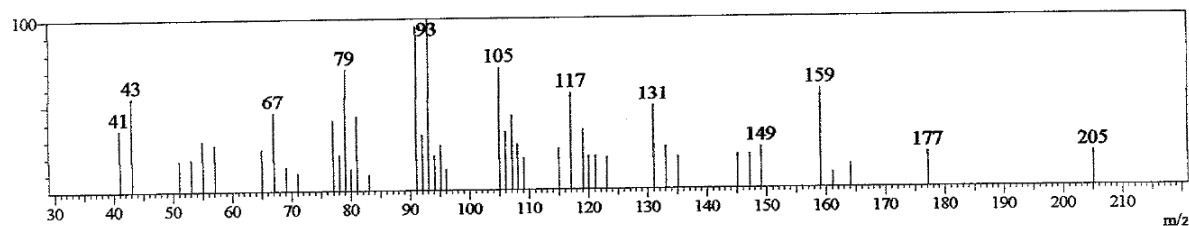
Line#:29 R.Time:42.0(Scan#:4735)



Line#:30 R.Time:42.1(Scan#:4752)

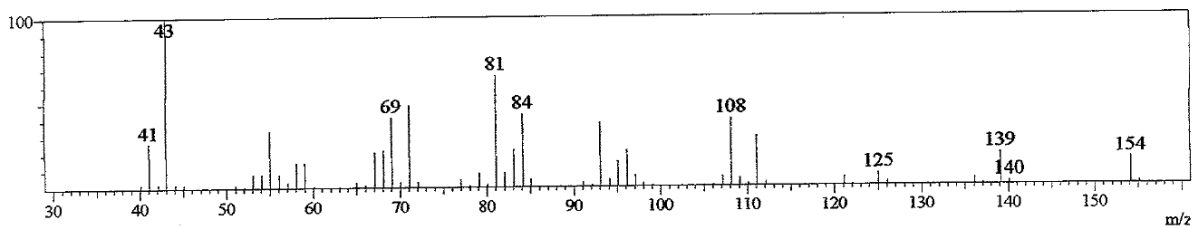


Line#:31 R.Time:42.2(Scan#:4770)

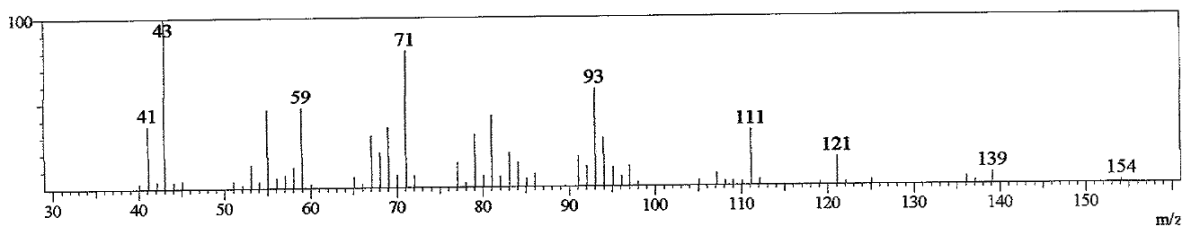


Anexo 30. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento sem nitrogênio

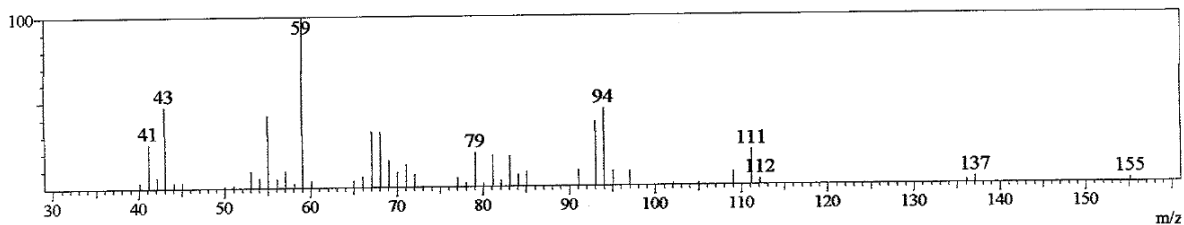
Line#:1 R.Time:9.4(Scan#:826)



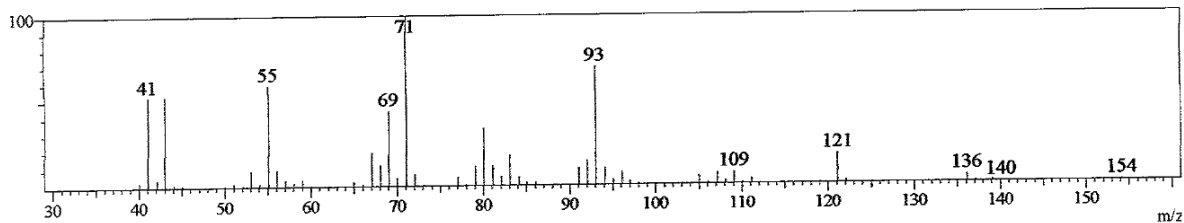
Line#:2 R.Time:11.4(Scan#:1070)



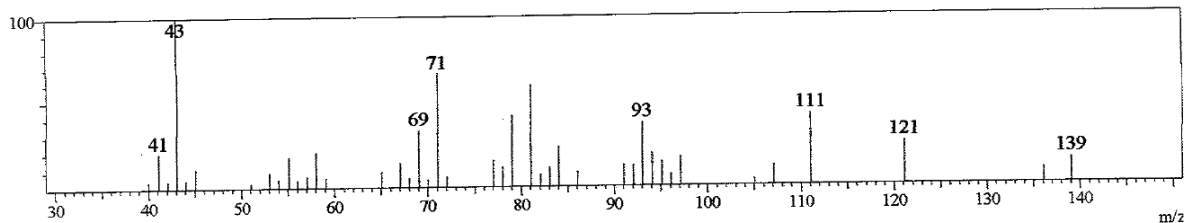
Line#:3 R.Time:12.3(Scan#:1173)



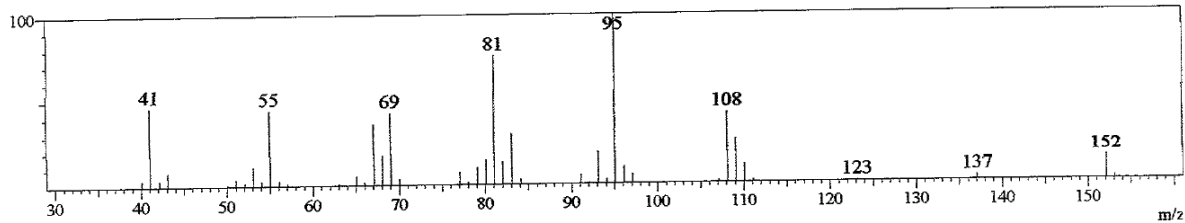
Line#:4 R.Time:13.1(Scan#:1274)



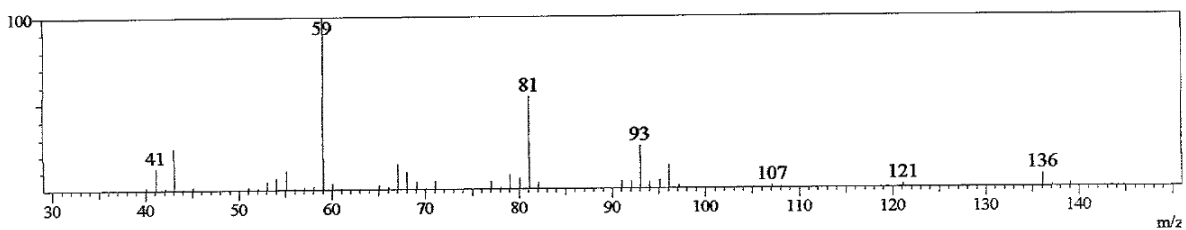
Line#:5 R.Time:13.2(Scan#:1286)



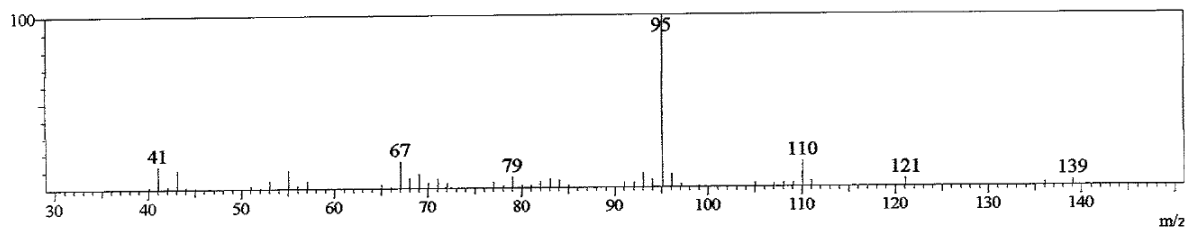
Line#:6 R.Time:15.6(Scan#:1575)



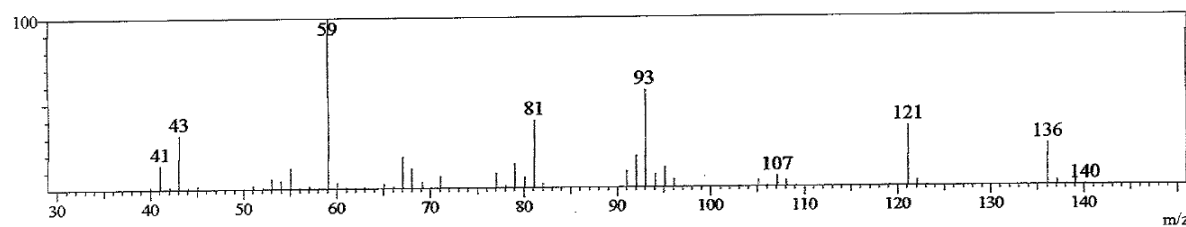
Line#:7 R.Time:17.2(Scan#:1760)



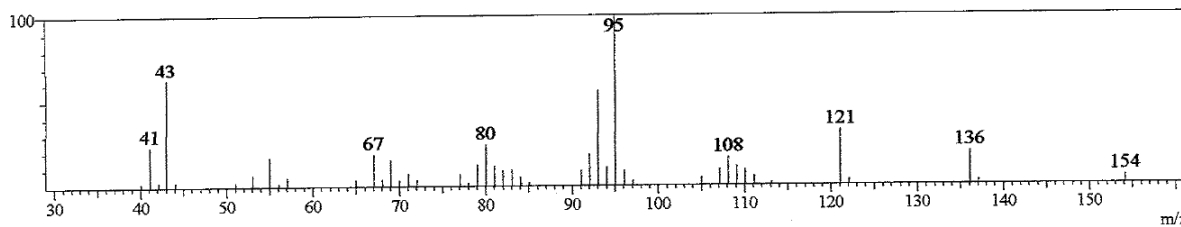
Line#:8 R.Time:17.3(Scan#:1779)



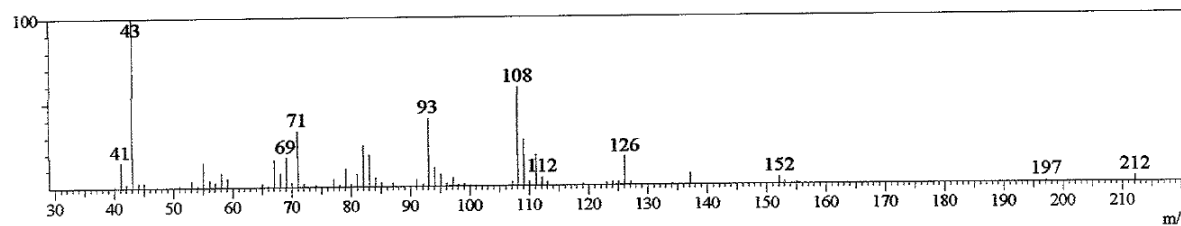
Line#:9 R.Time:18.7(Scan#:1939)



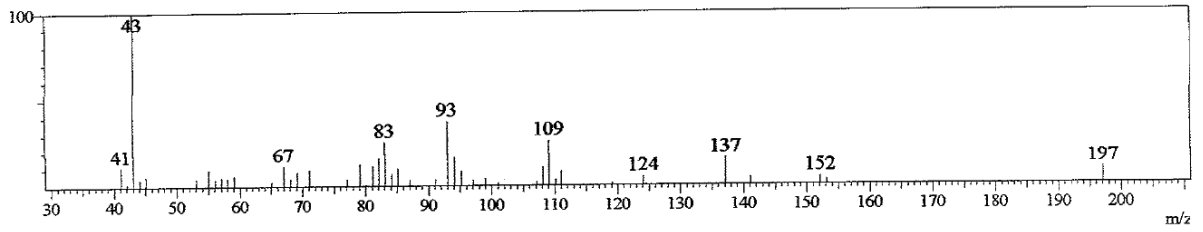
Line#:10 R.Time:23.9(Scan#:2571)



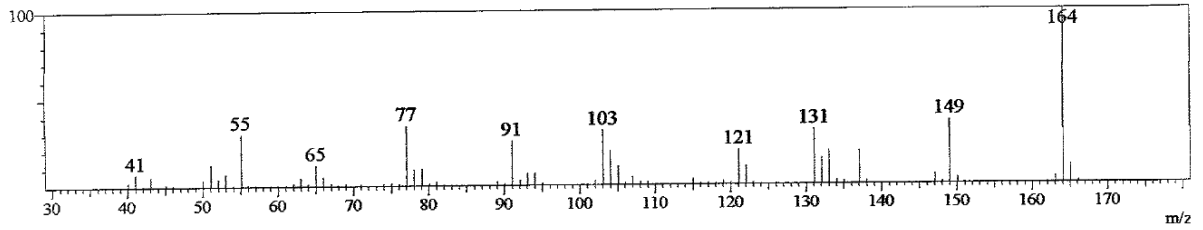
Line#:11 R.Time:27.6(Scan#:3007)



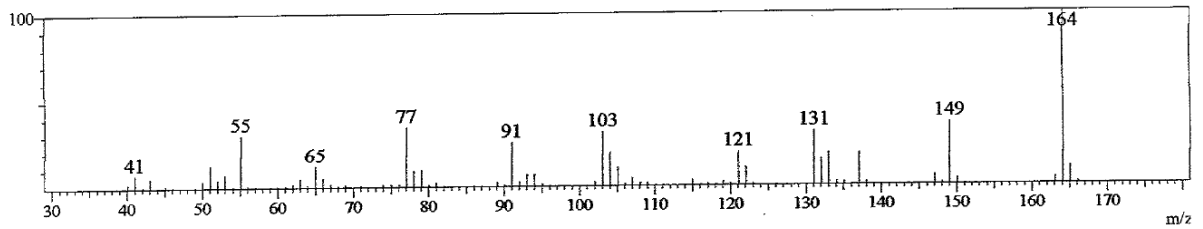
Line#12 R.Time:28.5(Scan#3124)



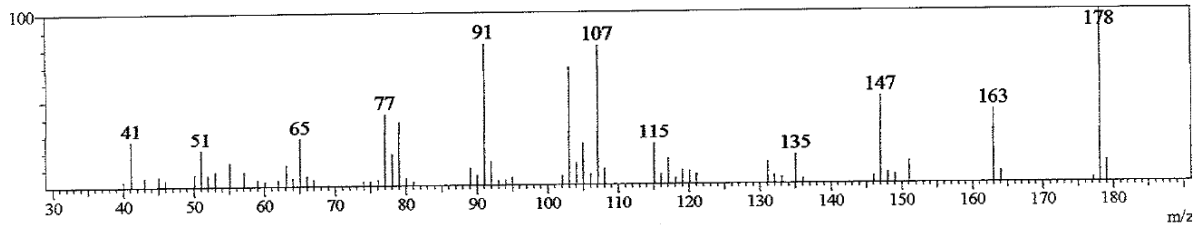
Line#13 R.Time:29.1(Scan#3190)



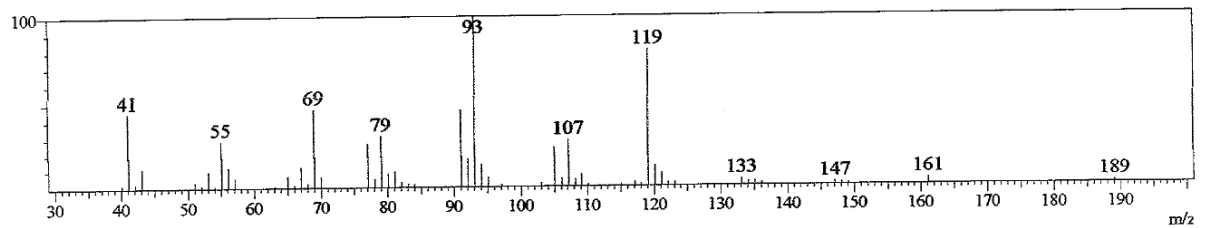
Line#14 R.Time:29.1(Scan#3190)



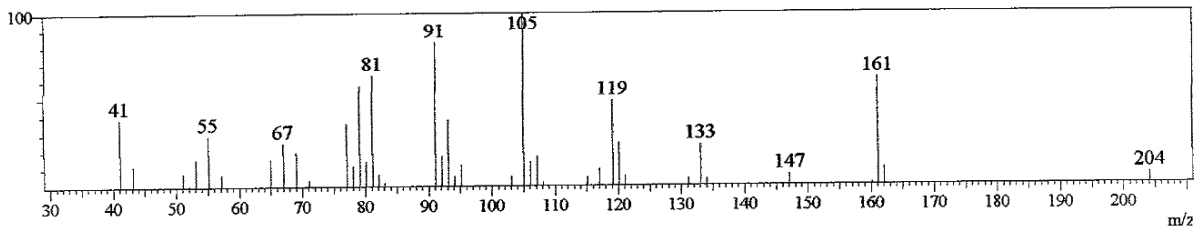
Line#15 R.Time:31.6(Scan#3491)



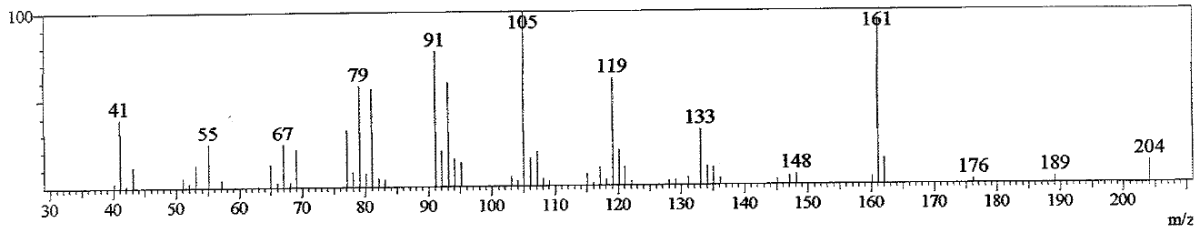
Line#16 R.Time:32.3(Scan#3573)



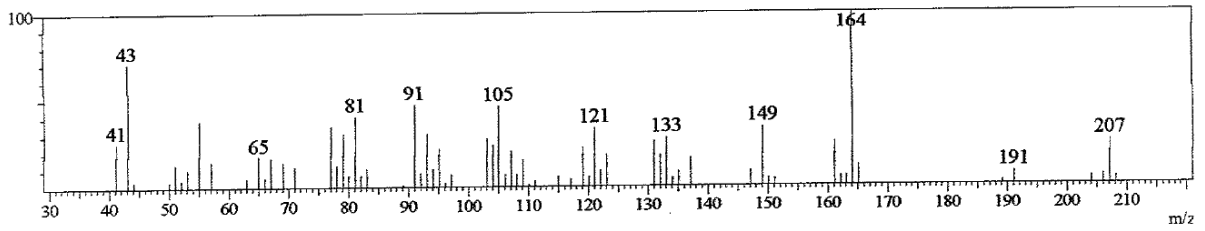
Line#:17 R.Time:34.7(Scan#:3866)



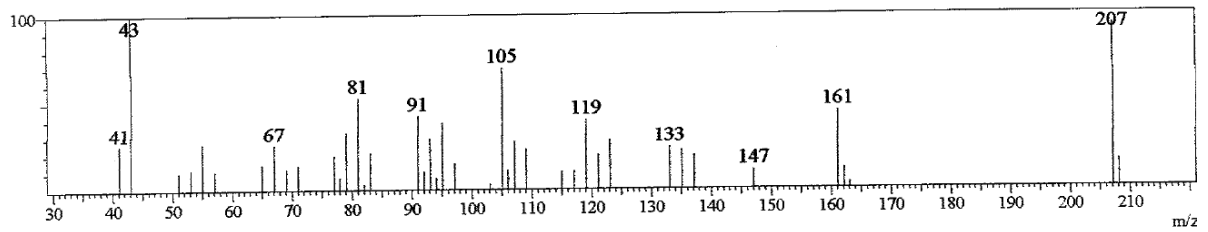
Line#:18 R.Time:36.3(Scan#:4053)



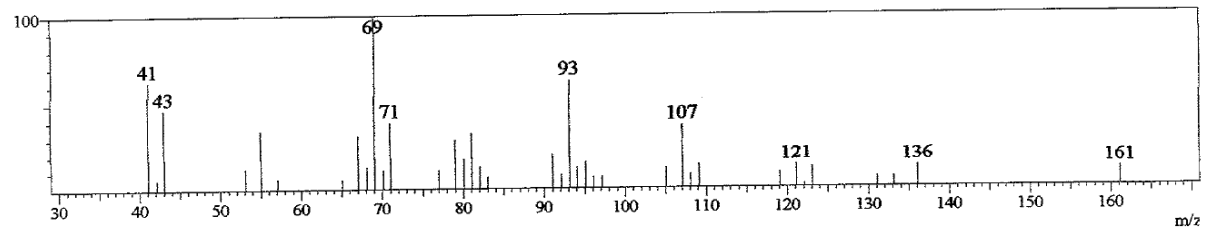
Line#:19 R.Time:37.3(Scan#:4176)



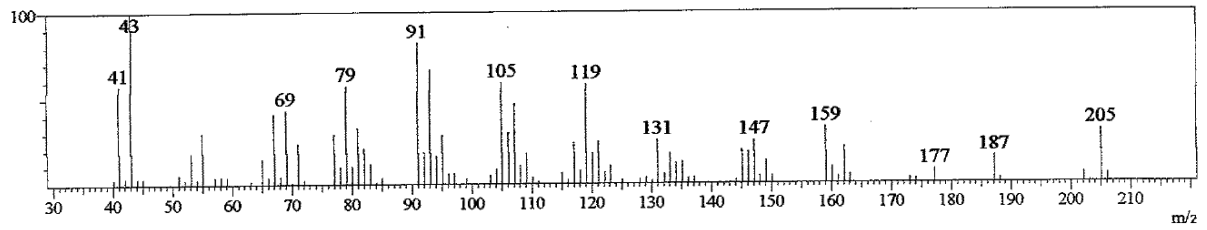
Line#:20 R.Time:38.5(Scan#:4318)



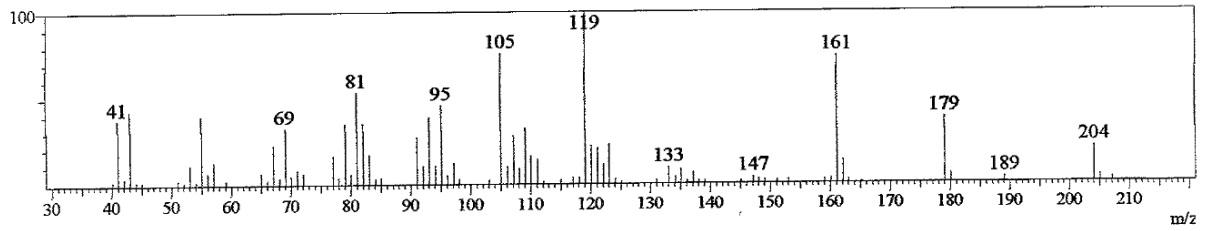
Line#:21 R.Time:38.6(Scan#:4338)



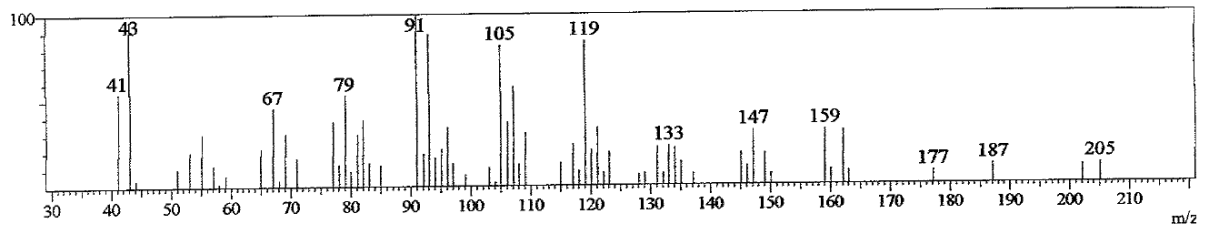
Line#:22 R.Time:39.5(Scan#:4443)



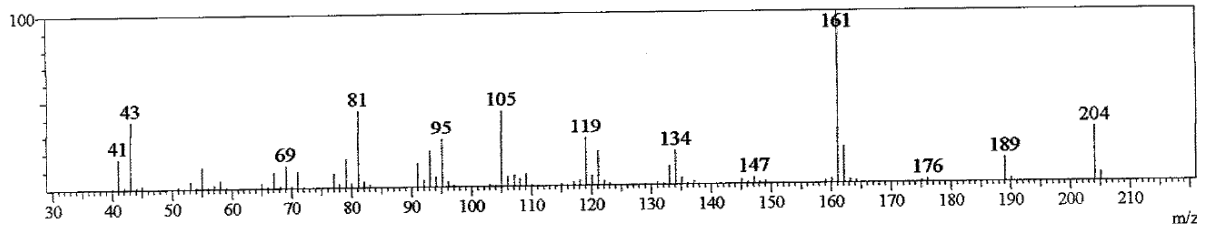
Line#:23 R.Time:40.9(Scan#:4611)



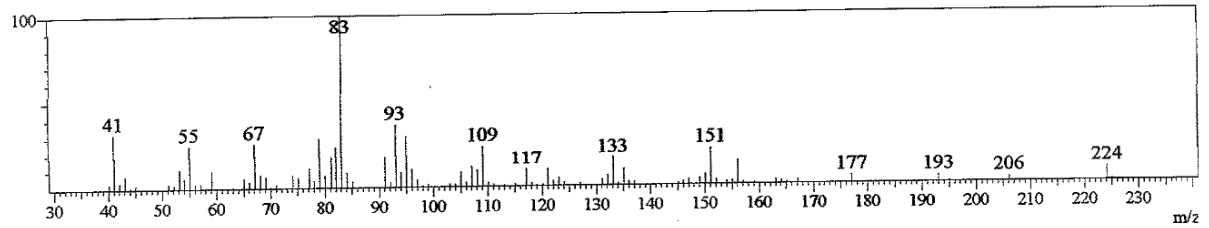
Line#:24 R.Time:41.6(Scan#:4695)



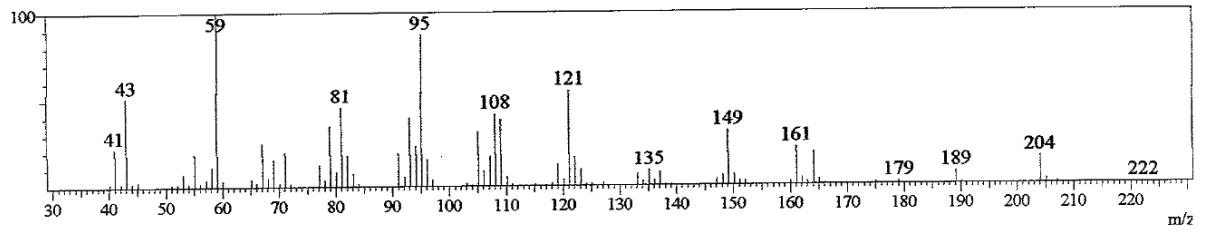
Line#:25 R.Time:41.8(Scan#:4715)



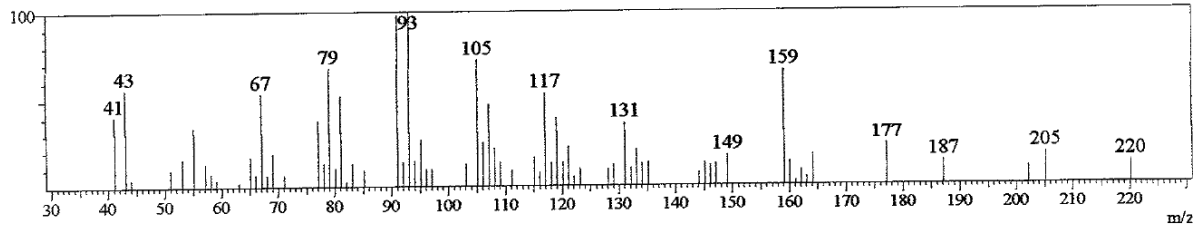
Line#:26 R.Time:42.0(Scan#:4736)



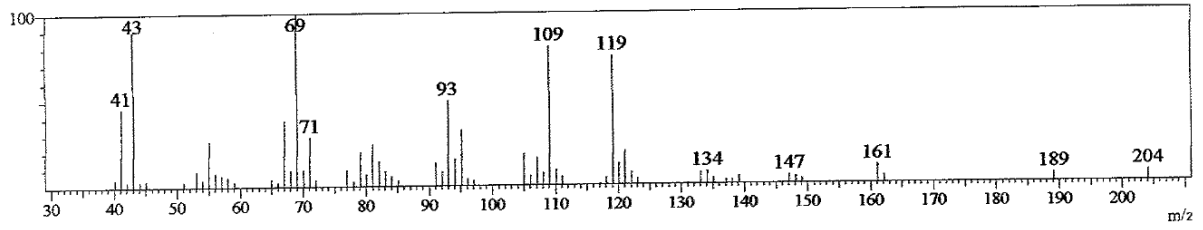
Line#:27 R.Time:42.1(Scan#:4153)



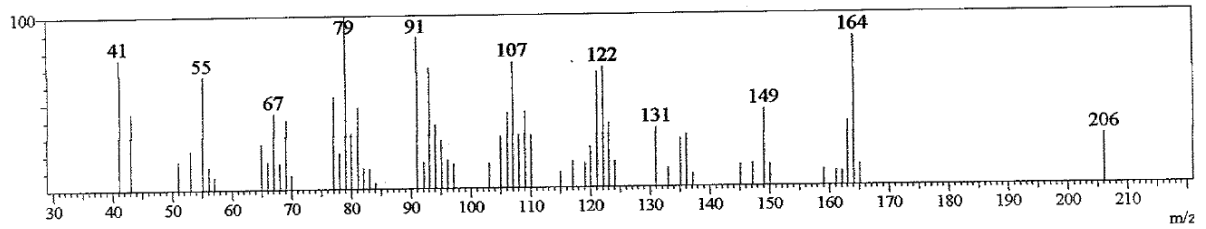
Line#:28 R.Time:42.3(Scan#:4771)



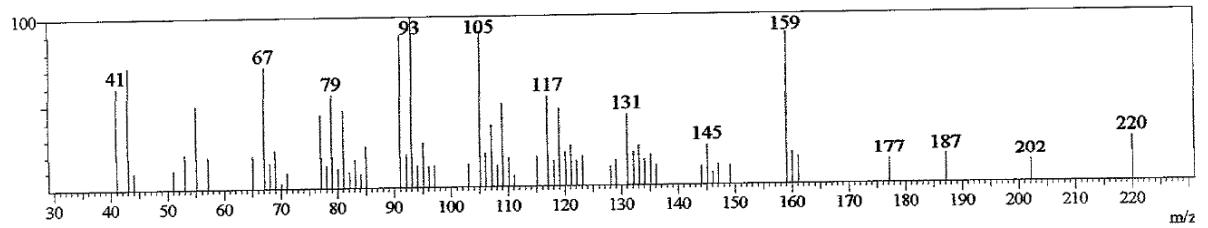
Line#:29 R.Time:42.7(Scan#:4826)



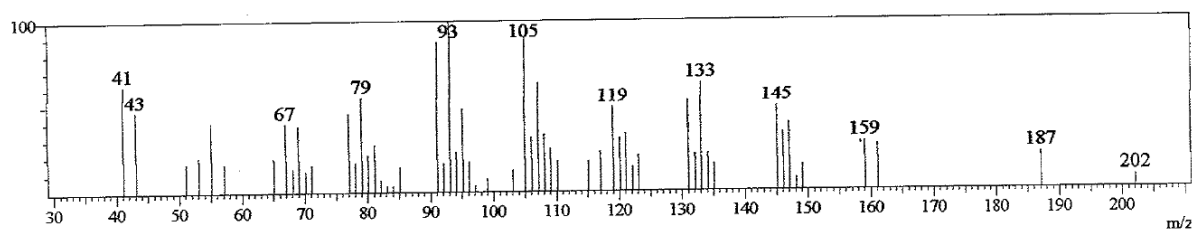
Line#:30 R.Time:42.8(Scan#:4837)



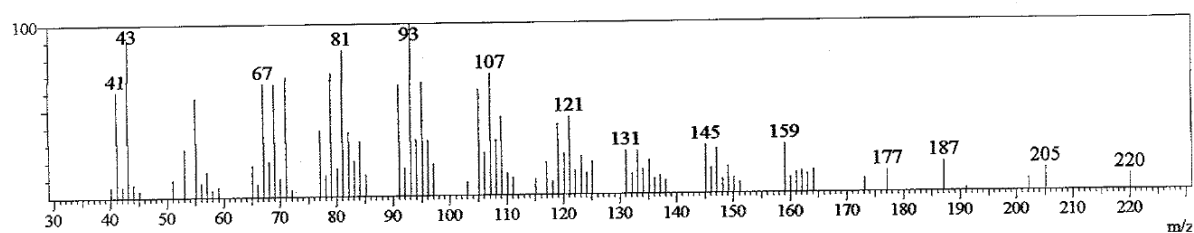
Line#:31 R.Time:42.9(Scan#:4851)



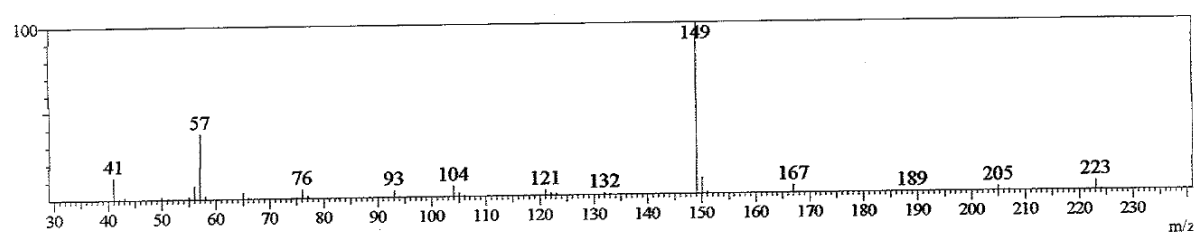
Line#:32 R.Time:43.3(Scan#:4891)



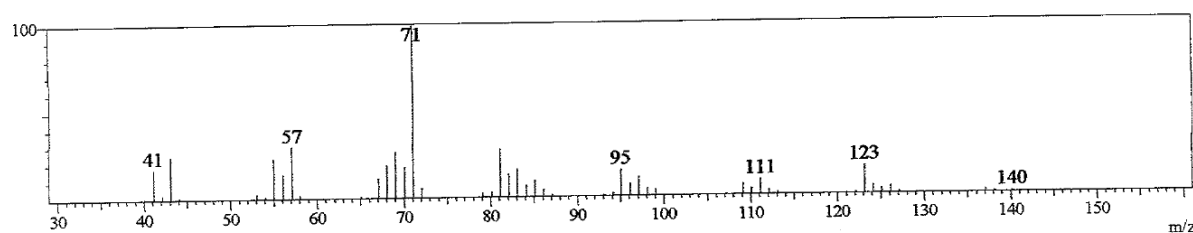
Line#:33 R.Time:43.5(Scan#:4925)



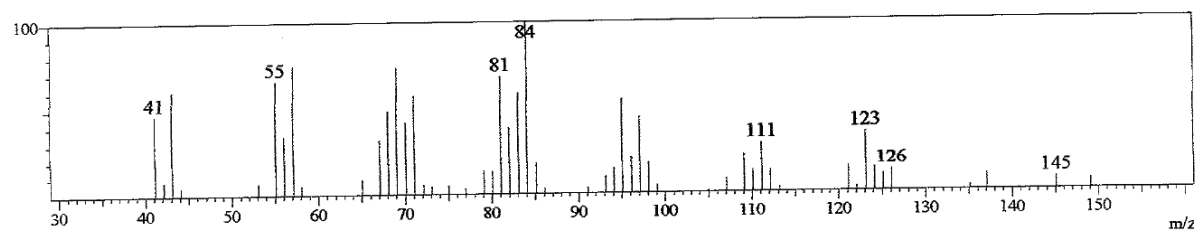
Line#:34 R.Time:45.2(Scan#:5124)



Line#:35 R.Time:47.2(Scan#:5361)

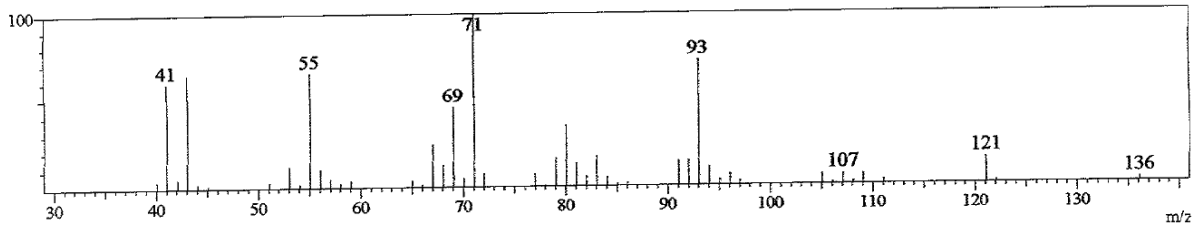


Line#:36 R.Time:47.4(Scan#:5386)

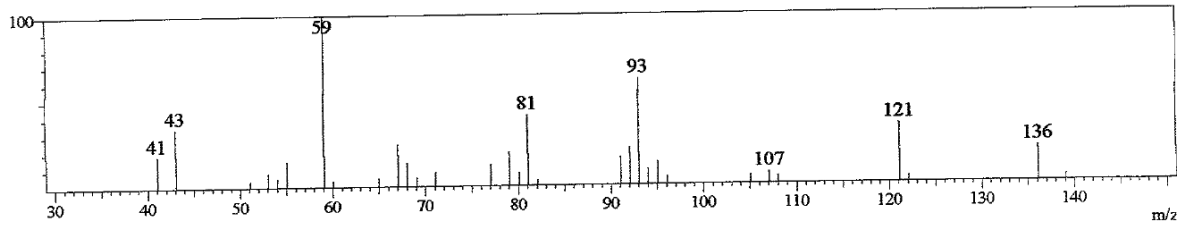


Anexo 31. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NO}_3^- \text{ha}^{-1}$

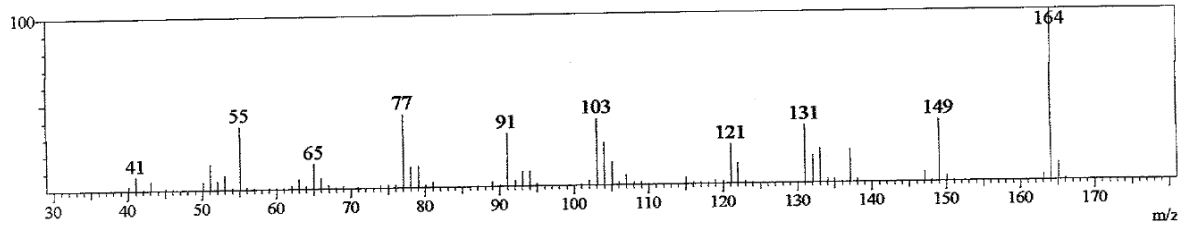
Line#1 R.Time:13.0(Scan#:1264)



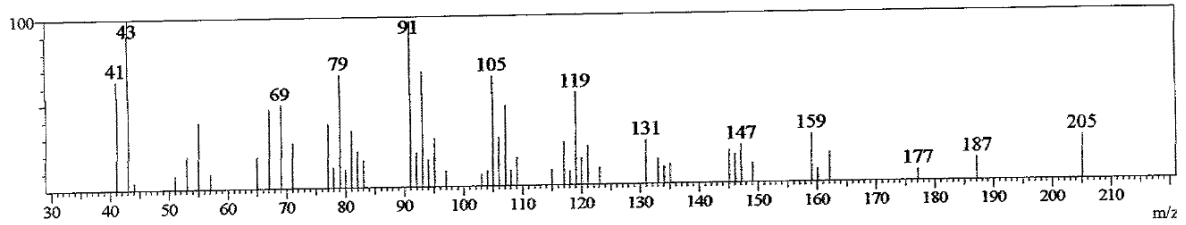
Line#2 R.Time:18.7(Scan#:1941)



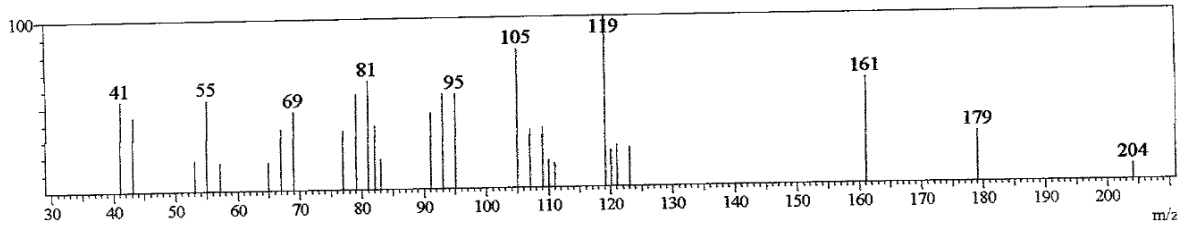
Line#3 R.Time:28.9(Scan#:3171)



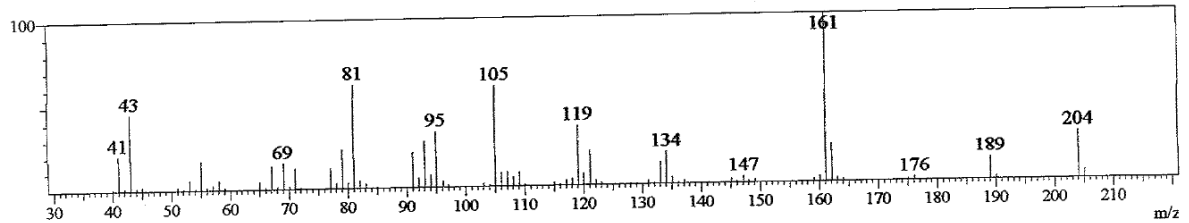
Line#4 R.Time:39.5(Scan#:4444)



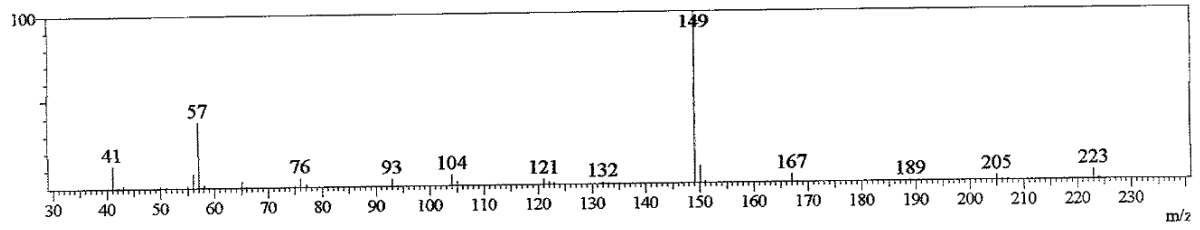
Line#5 R.Time:40.9(Scan#:4612)



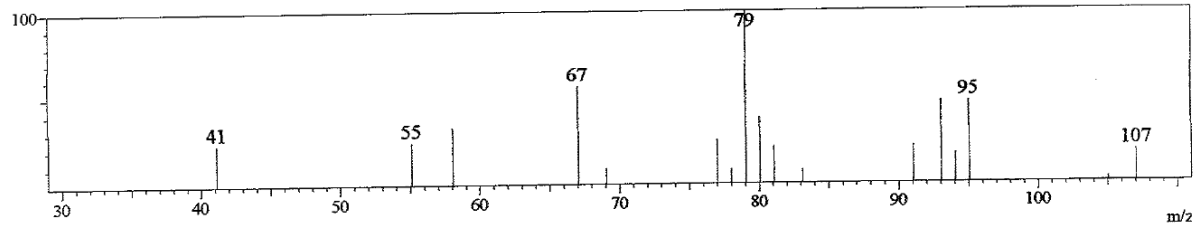
Line#6 R.Time:41.8(Scan#:4712)



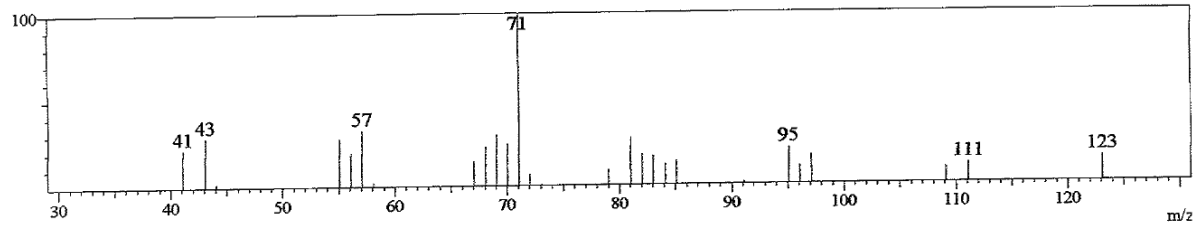
Line#:12 R.Time:45.2(Scan#:5124)



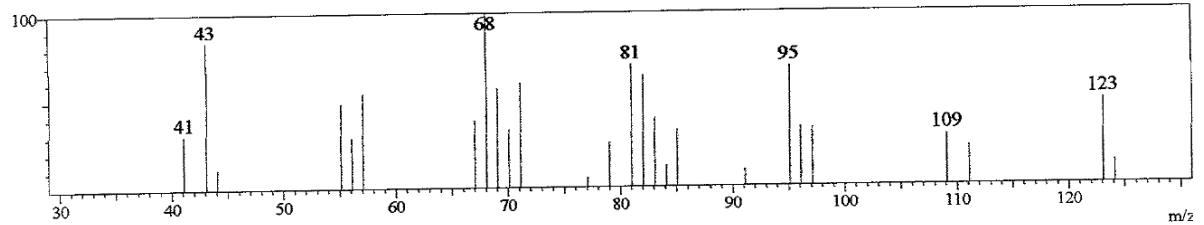
Line#:13 R.Time:47.1(Scan#:5353)



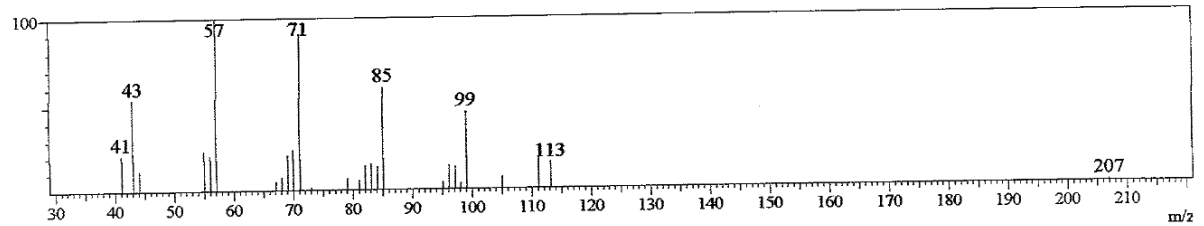
Line#:14 R.Time:47.2(Scan#:5362)



Line#:15 R.Time:47.8(Scan#:5435)

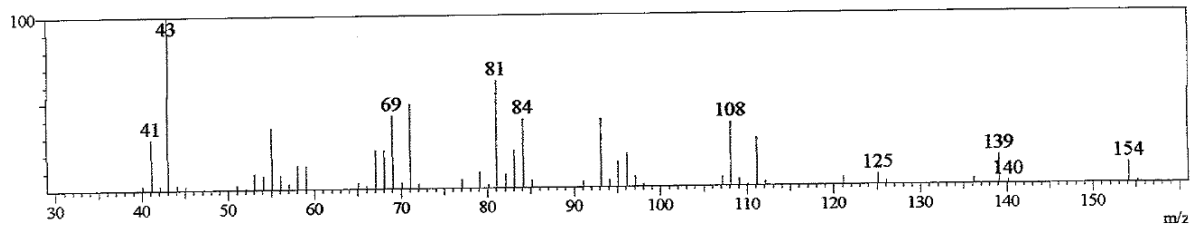


Line#:16 R.Time:48.8(Scan#:5557)

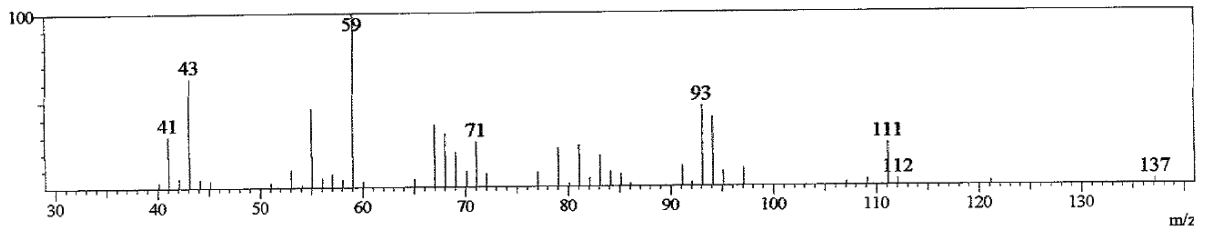


Anexo 32. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NO}_3^- \text{ha}^{-1}$

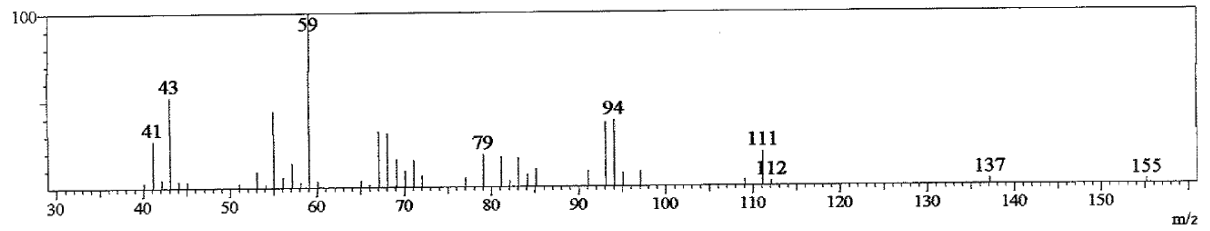
Line#1 R.Time:9.4(Scan#:825)



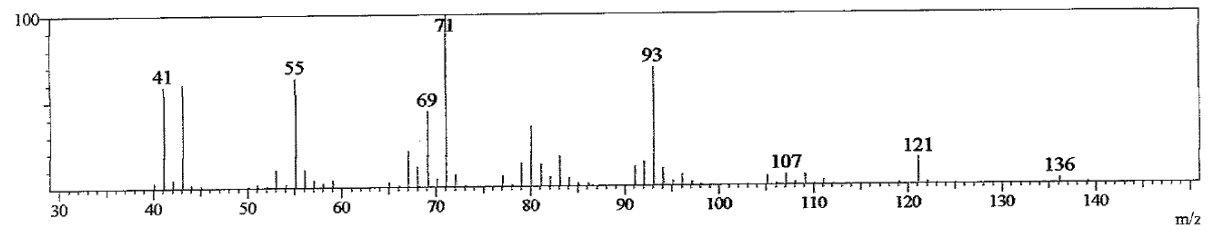
Line#2 R.Time:11.4(Scan#:1064)



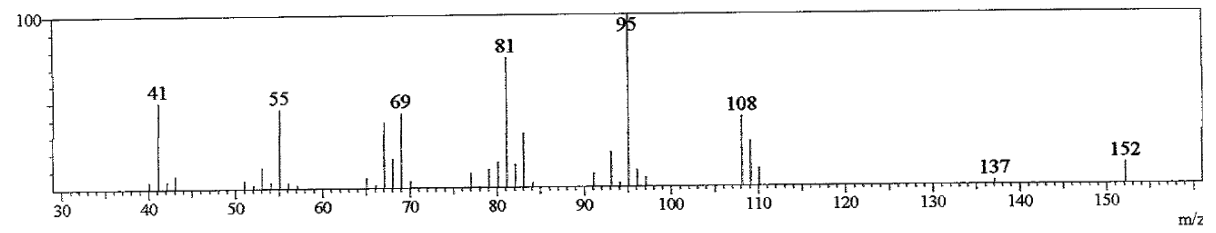
Line#3 R.Time:12.2(Scan#:1168)



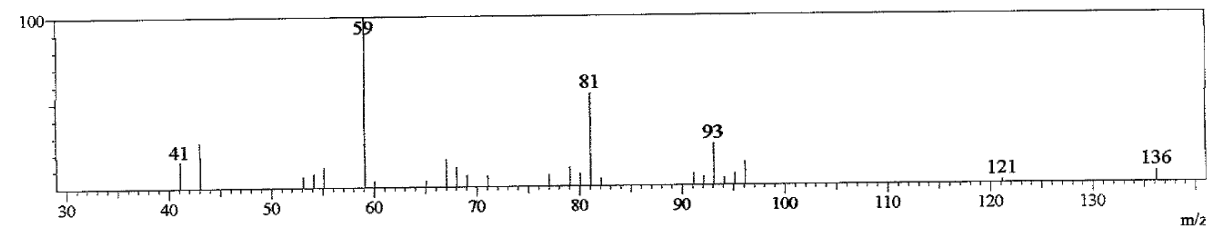
Line#4 R.Time:13.0(Scan#:1256)



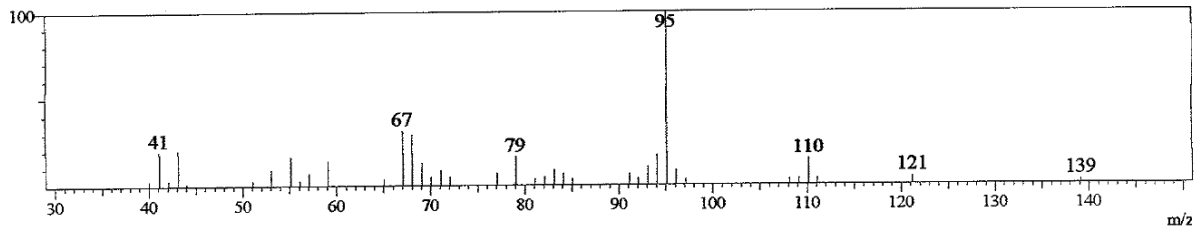
Line#5 R.Time:15.6(Scan#:1570)



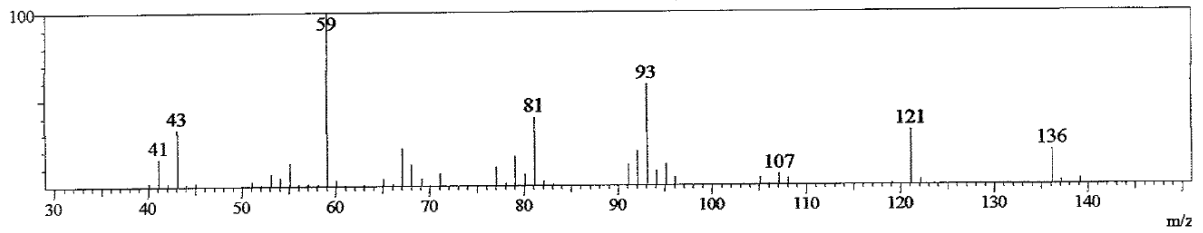
Line#6 R.Time:17.1(Scan#:1756)



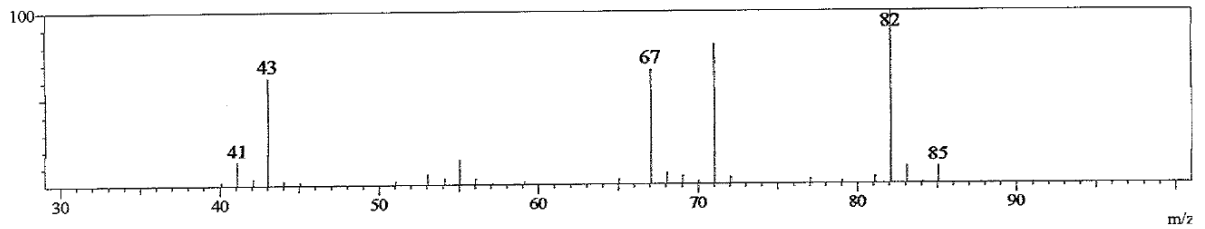
Line#:7 R.Time:17.3(Scan#:1775)



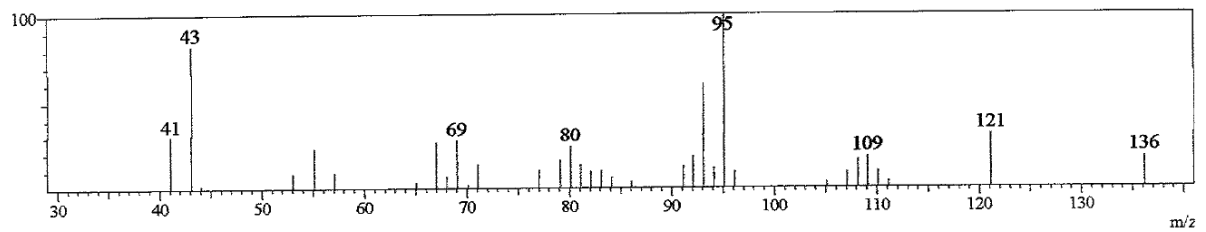
Line#:8 R.Time:18.6(Scan#:1931)



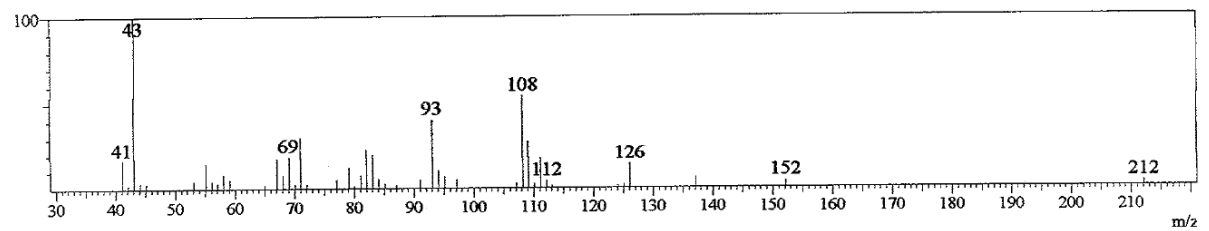
Line#:9 R.Time:18.8(Scan#:1954)



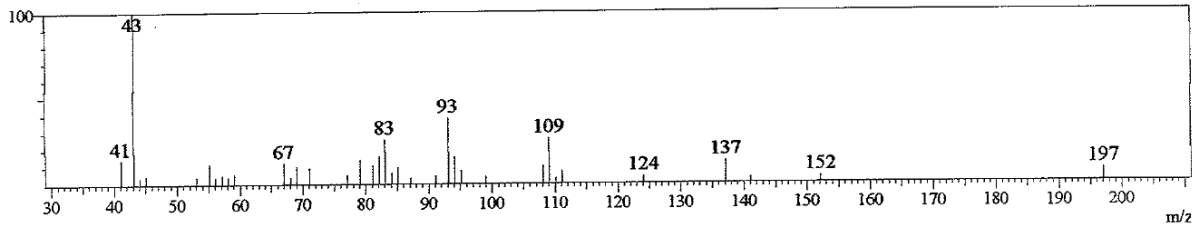
Line#:10 R.Time:23.9(Scan#:2566)



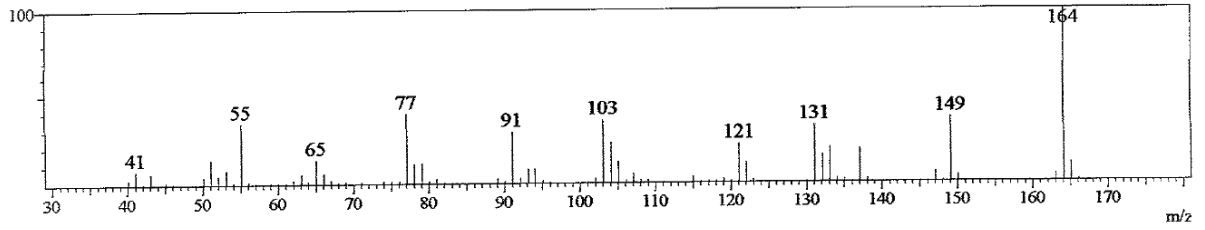
Line#:11 R.Time:27.5(Scan#:3001)



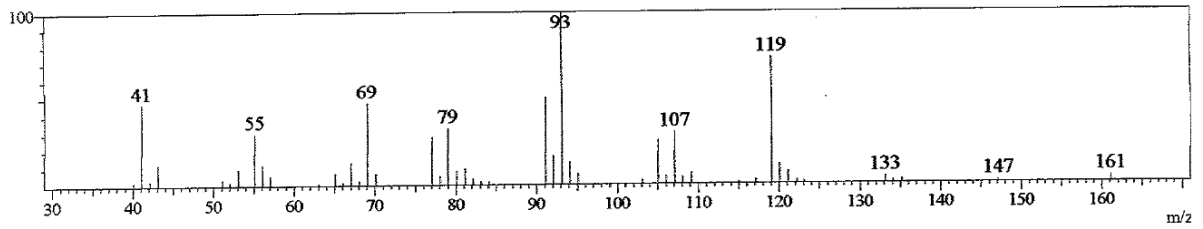
Line#:12 R.Time:28.5(Scan#:3117)



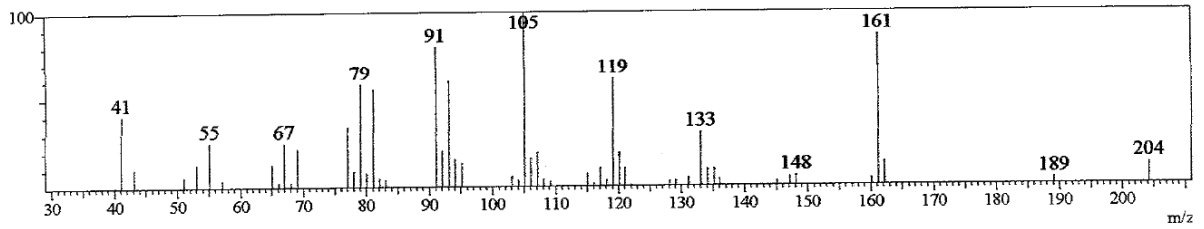
Line#:13 R.Time:28.9(Scan#:3170)



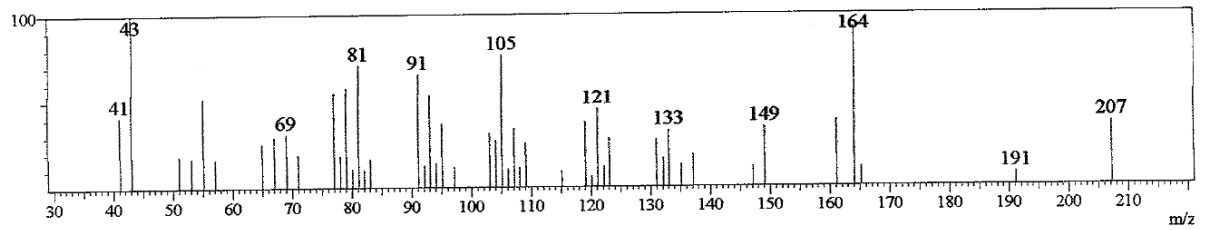
Line#:14 R.Time:32.2(Scan#:3566)



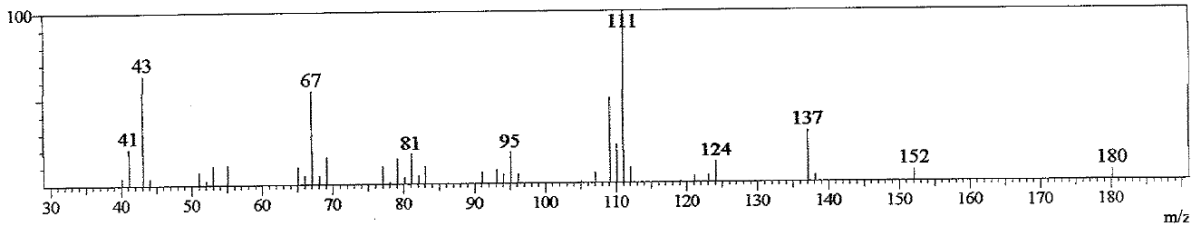
Line#:15 R.Time:36.2(Scan#:4047)



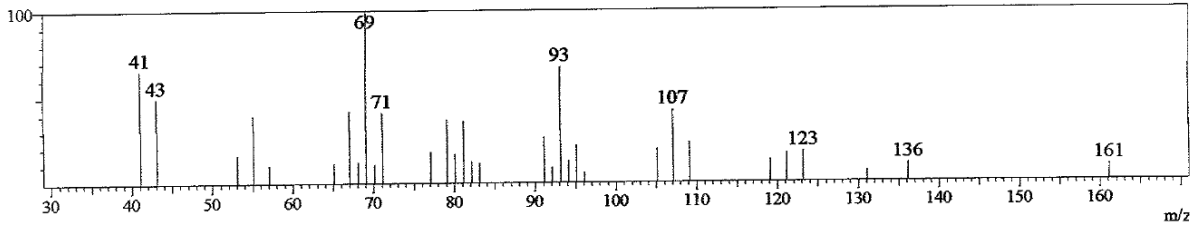
Line#:16 R.Time:37.3(Scan#:4171)



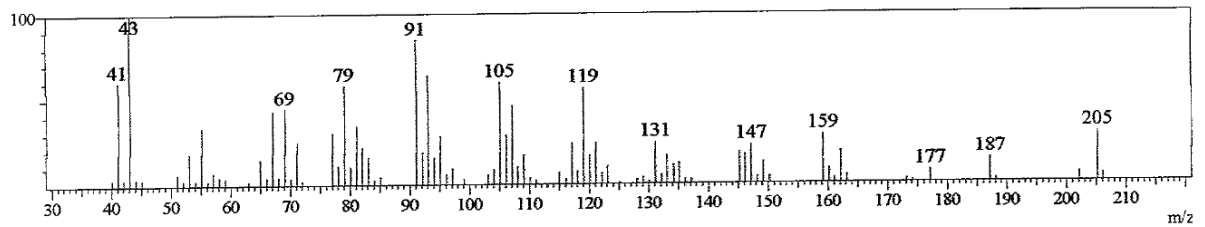
Line#:17 R.Time:37.8(Scan#:4235)



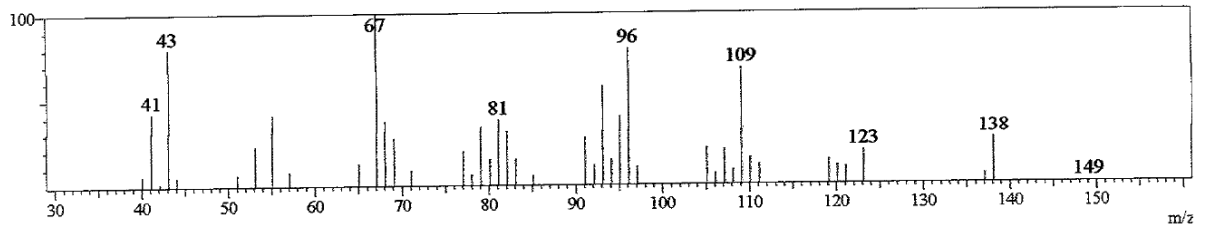
Line#:18 R.Time:38.6(Scan#:4332)



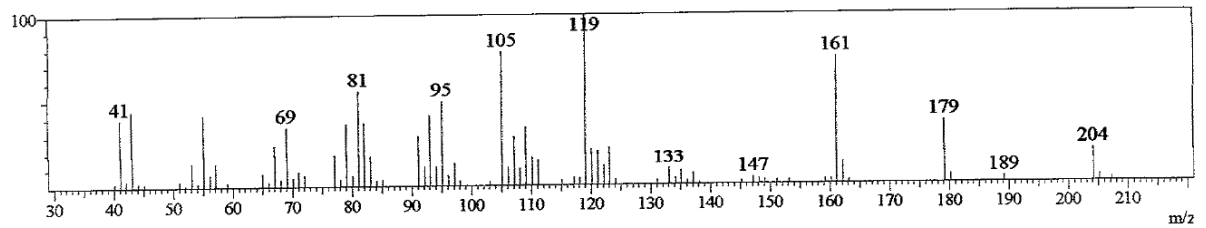
Line#:19 R.Time:39.5(Scan#:4436)



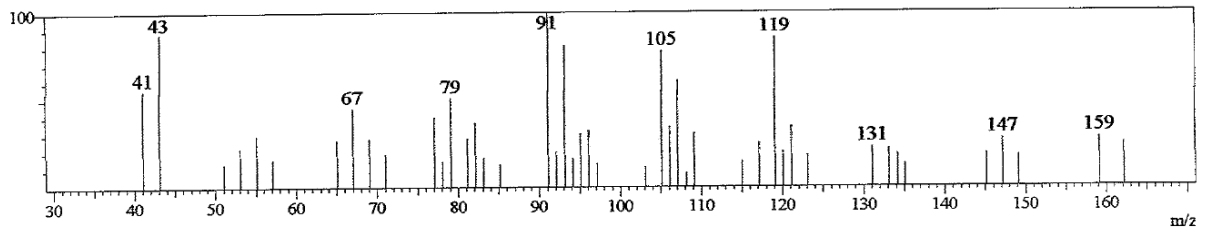
Line#:20 R.Time:40.7(Scan#:4585)



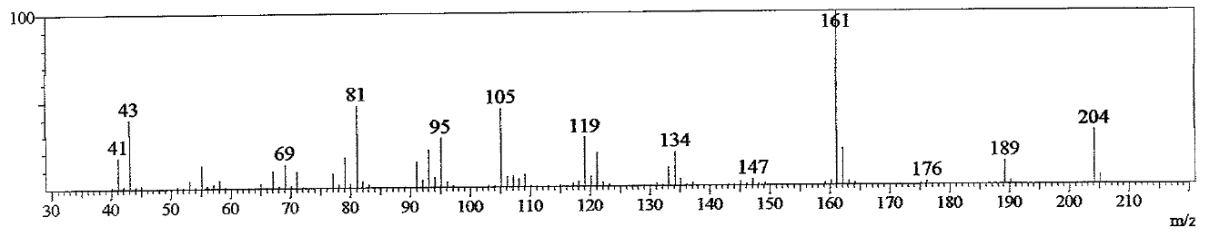
Line#:21 R.Time:40.9(Scan#:4606)



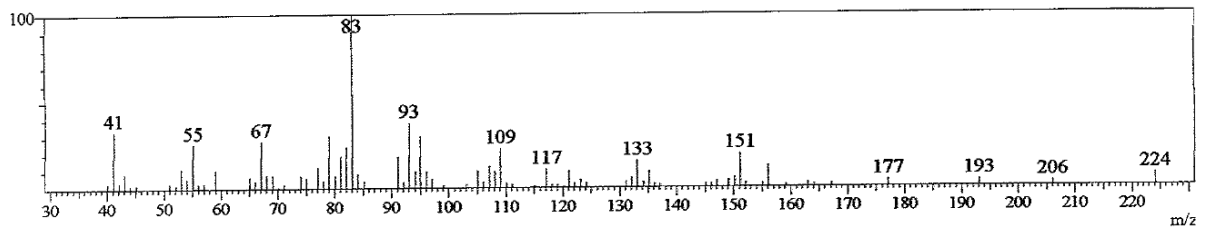
Line#:22 R.Time:41.6(Scan#:4691)



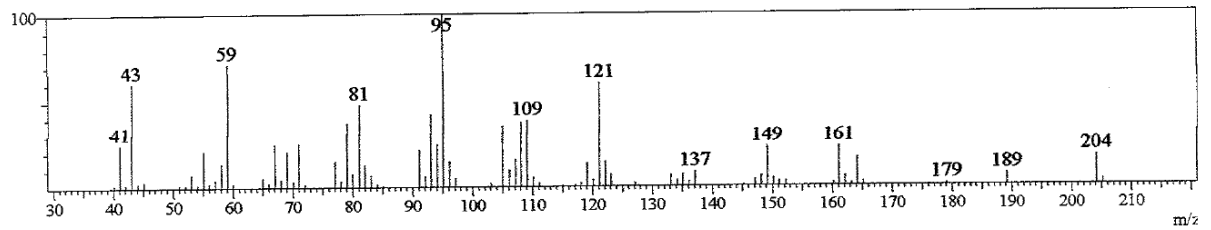
Line#:23 R.Time:41.7(Scan#:4710)



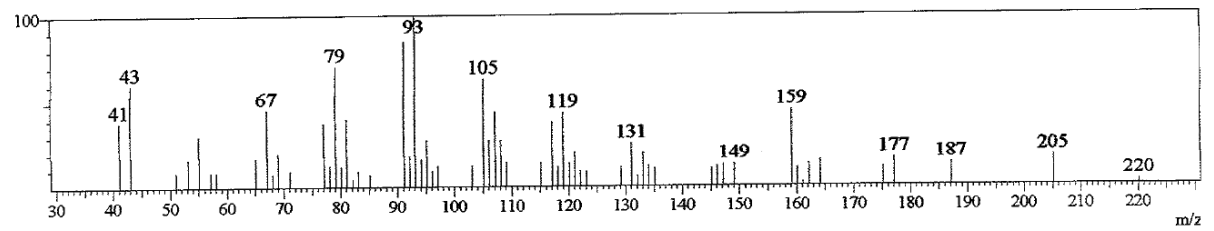
Line#:24 R.Time:41.9(Scan#:4732)



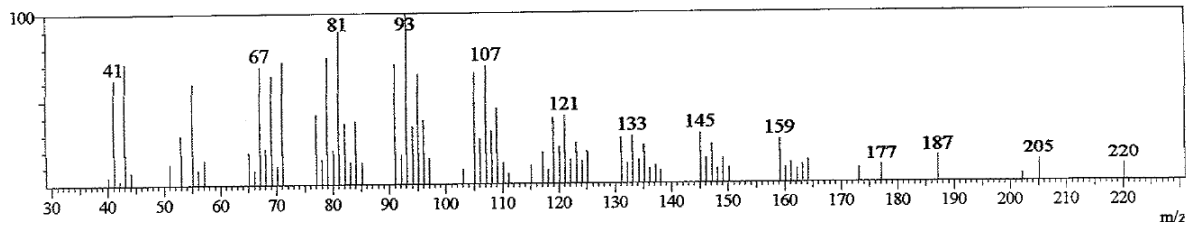
Line#:25 R.Time:42.1(Scan#:4750)



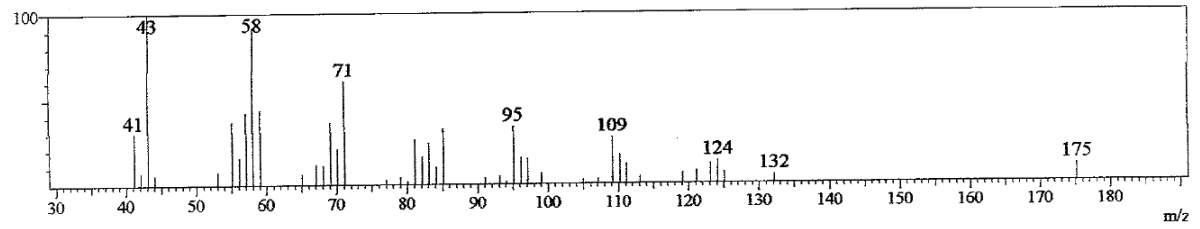
Line#:26 R.Time:42.2(Scan#:4767)



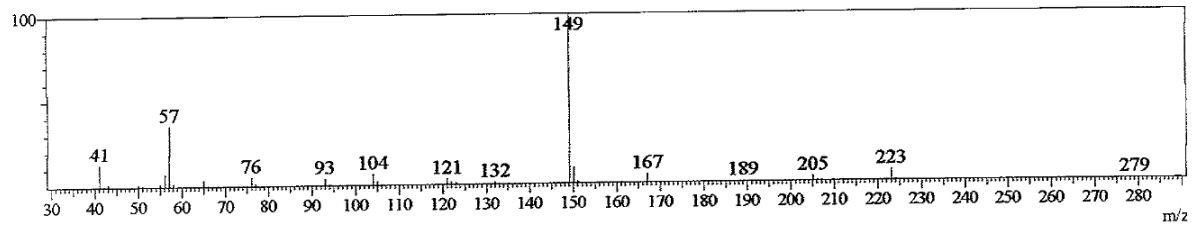
Line#:32 R.Time:43.5(Scan#:4922)



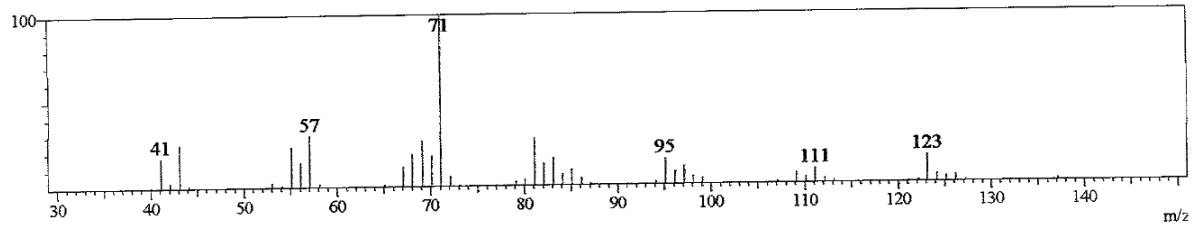
Line#:33 R.Time:44.7(Scan#:5068)



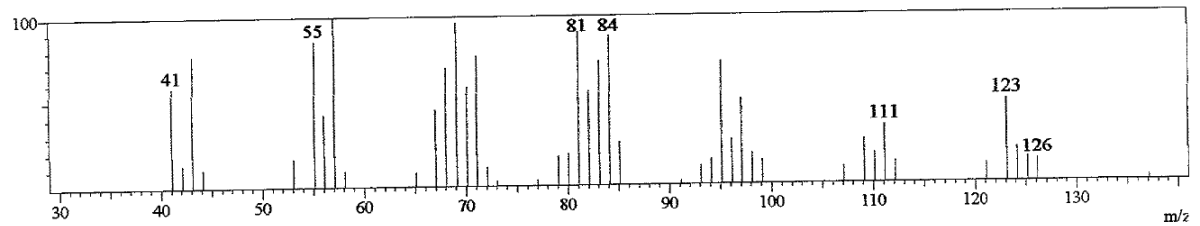
Line#:34 R.Time:45.2(Scan#:5122)



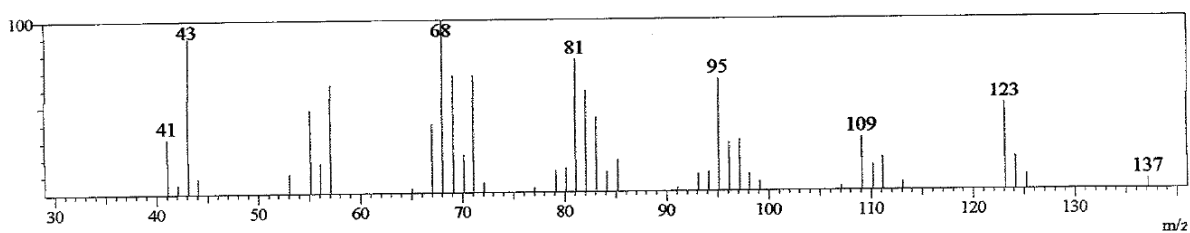
Line#:35 R.Time:47.2(Scan#:5359)



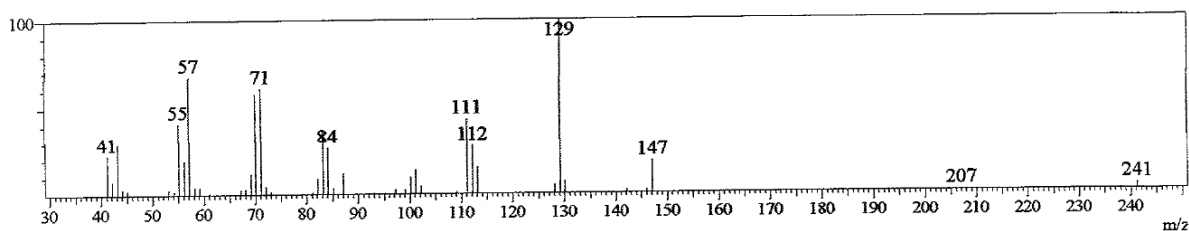
Line#:36 R.Time:47.4(Scan#:5384)



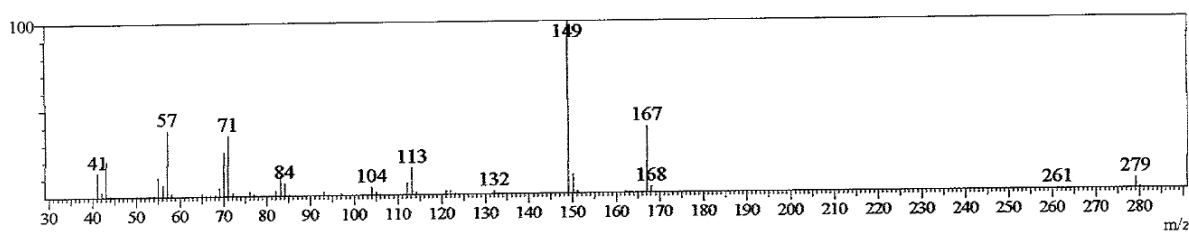
Line#:37 R.Time:47.8(Scan#:5432)



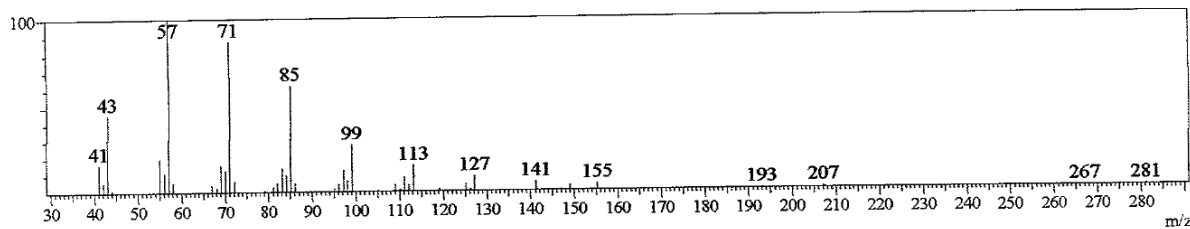
Line#:38 R.Time:48.9(Scan#:5567)



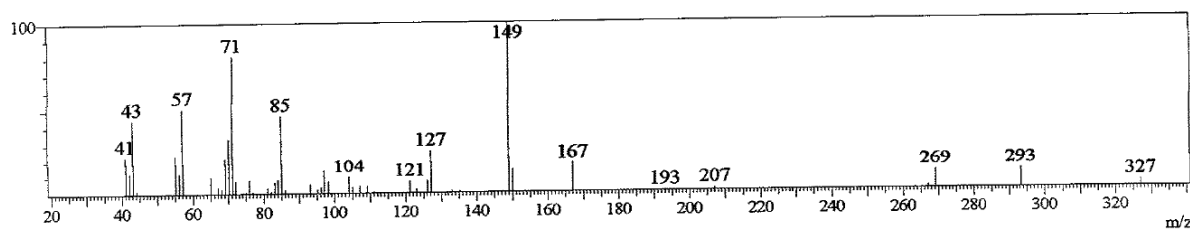
Line#:39 R.Time:49.8(Scan#:5678)



Line#:40 R.Time:50.4(Scan#:5746)

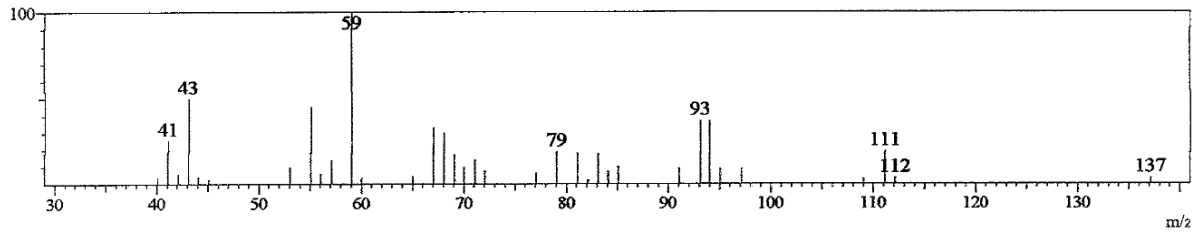


Line#:41 R.Time:51.1(Scan#:5831)

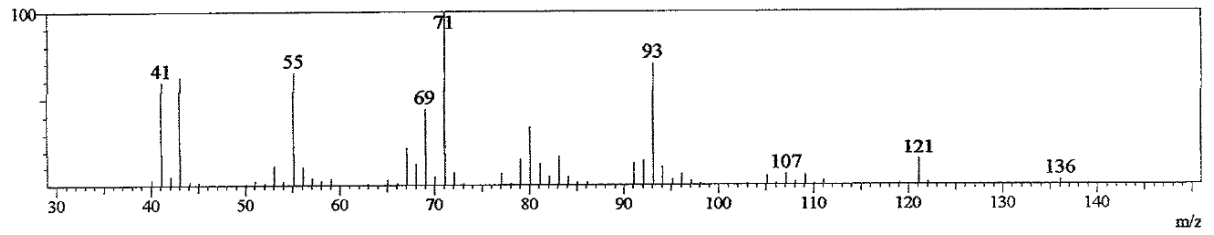


Anexo 33. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3\text{ ha}^{-1}$

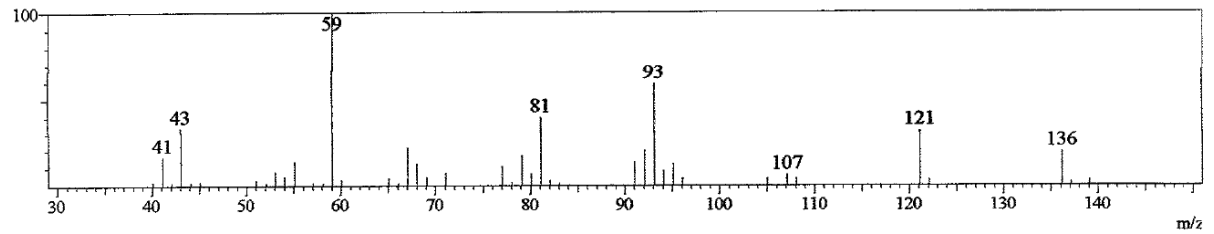
Line#1 R.Time:12.2(Scan#:1169)



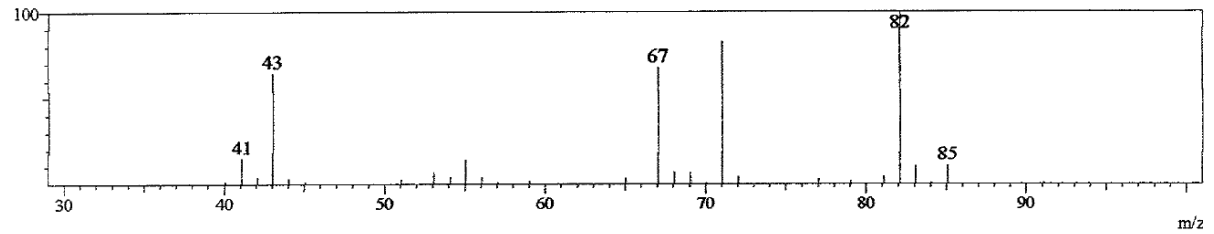
Line#2 R.Time:13.0(Scan#:1256)



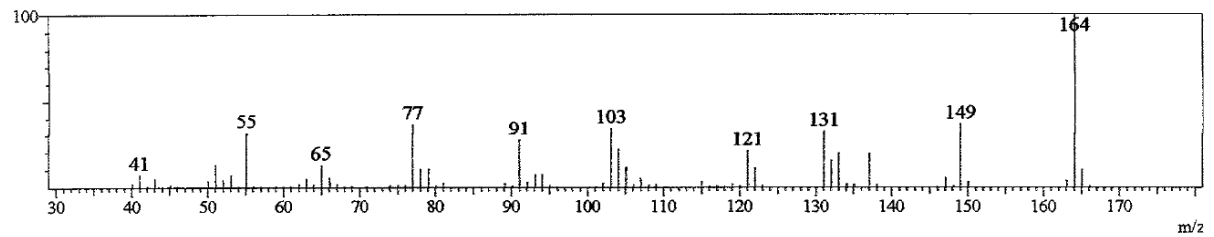
Line#3 R.Time:18.6(Scan#:1932)



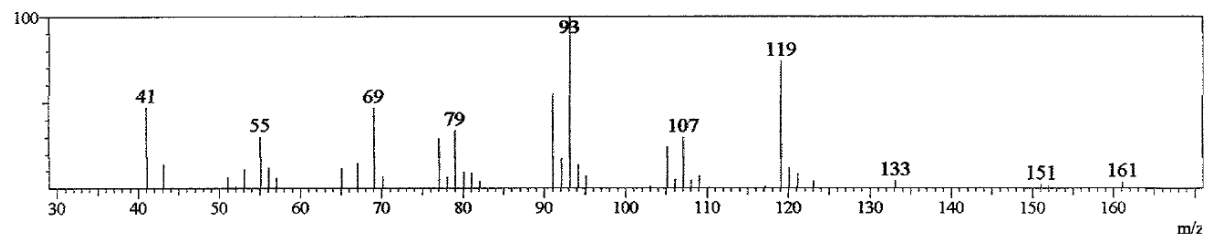
Line#4 R.Time:18.8(Scan#:1955)



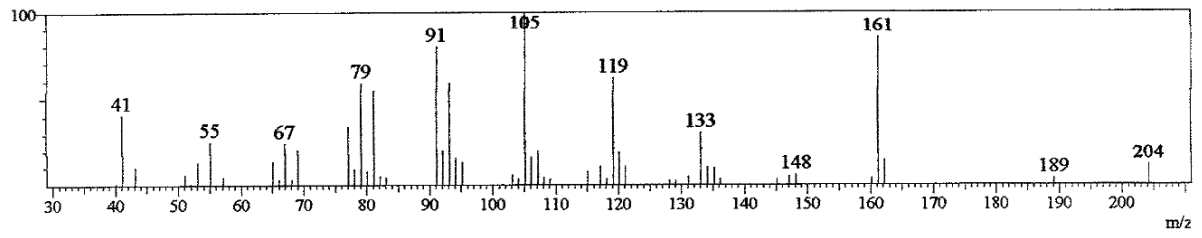
Line#5 R.Time:28.9(Scan#:3172)



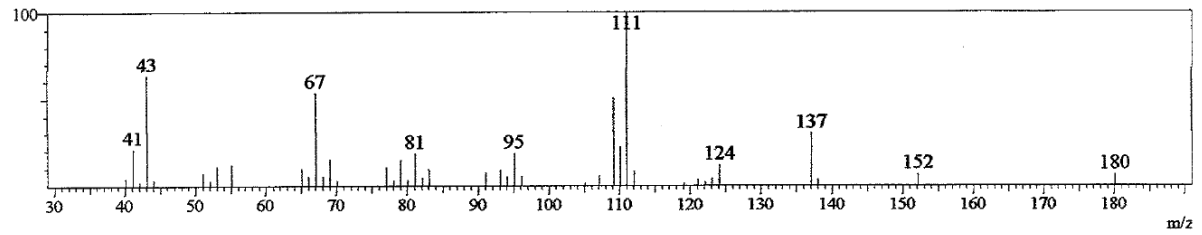
Line#6 R.Time:32.2(Scan#:3567)



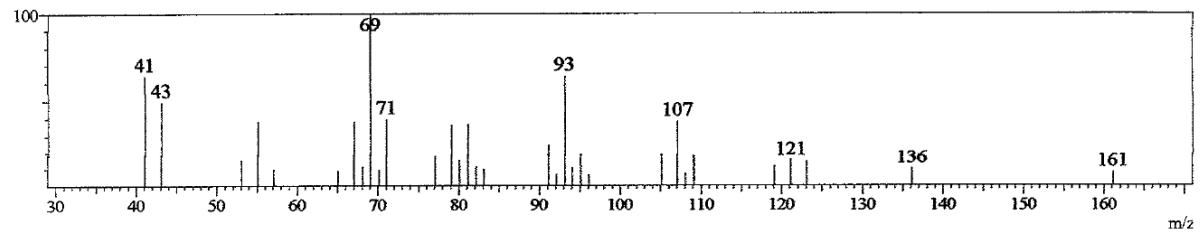
Line#7 R.Time:36.2(Scan#:4047)



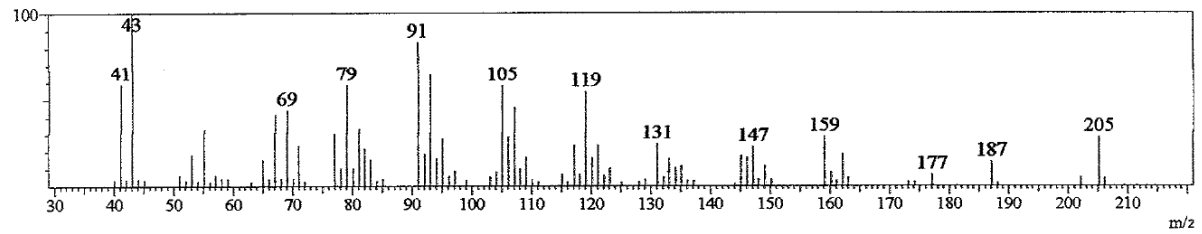
Line#8 R.Time:37.8(Scan#:4235)



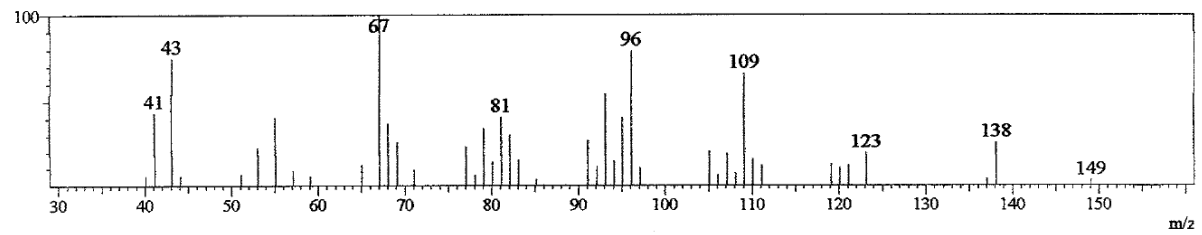
Line#9 R.Time:38.6(Scan#:4332)



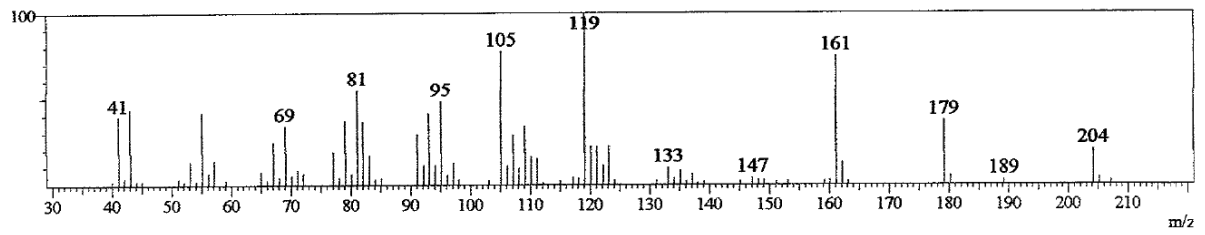
Line#10 R.Time:39.5(Scan#:4437)



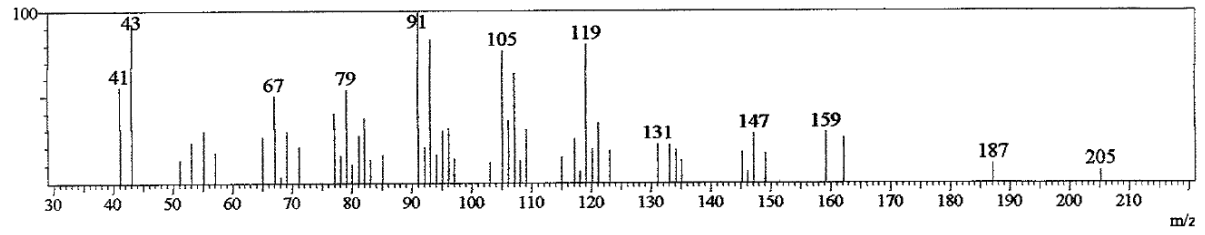
Line#11 R.Time:40.7(Scan#:4585)



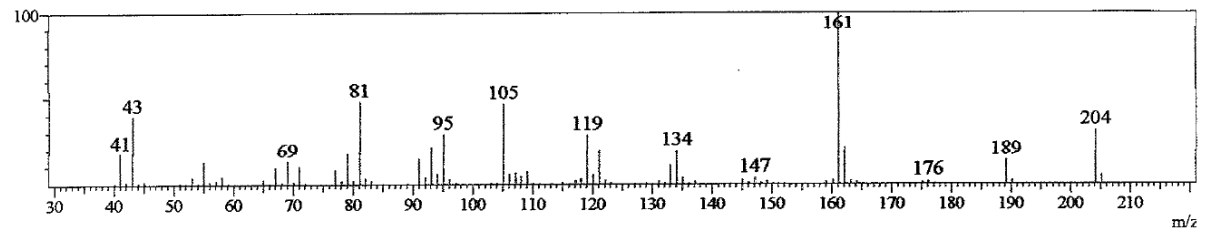
Line#:12 R.Time:40.9(Scan#:4606)



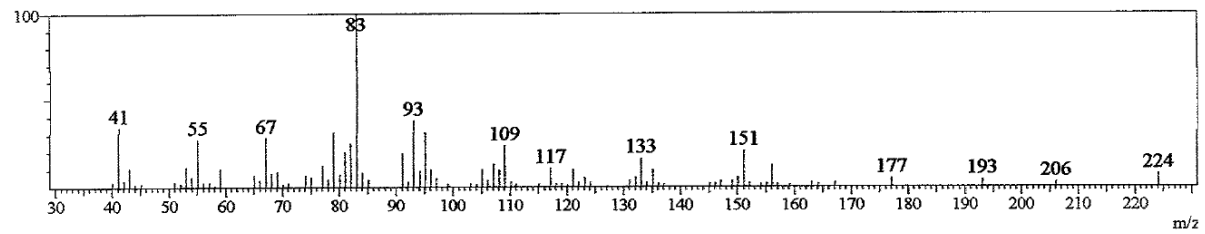
Line#:13 R.Time:41.6(Scan#:4691)



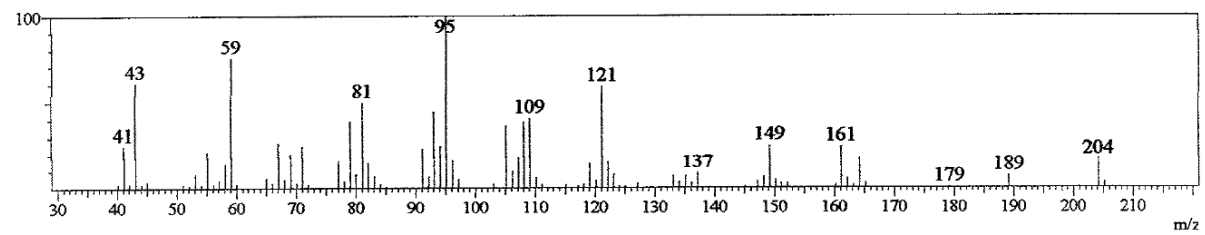
Line#:14 R.Time:41.8(Scan#:4711)



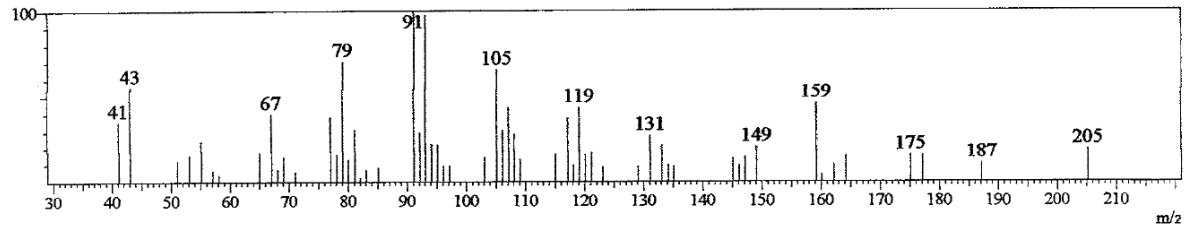
Line#:15 R.Time:41.9(Scan#:4732)



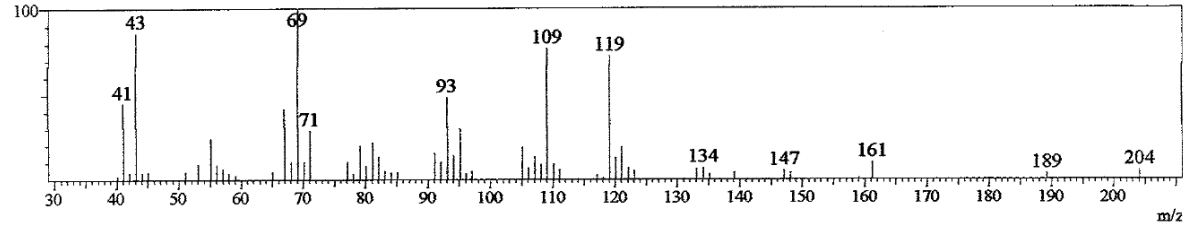
Line#:16 R.Time:42.1(Scan#:4750)



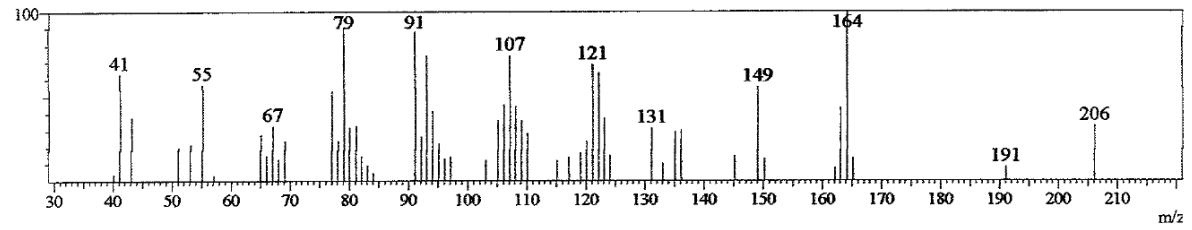
Line#:17 R.Time:42.2(Scan#:4768)



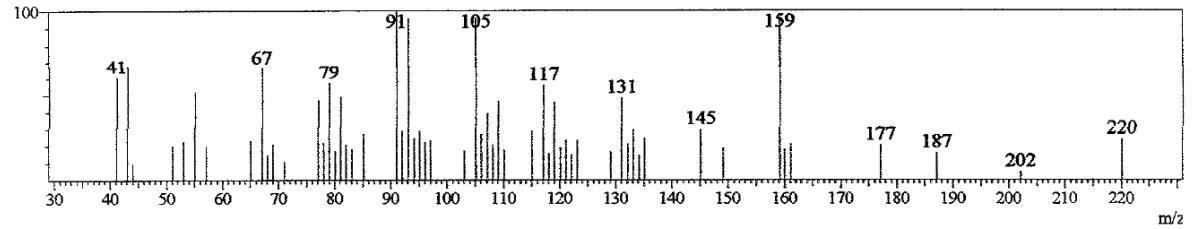
Line#:18 R.Time:42.7(Scan#:4823)



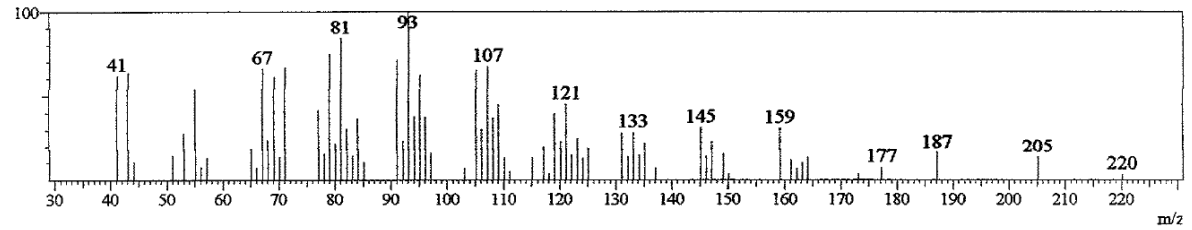
Line#:19 R.Time:42.8(Scan#:4834)



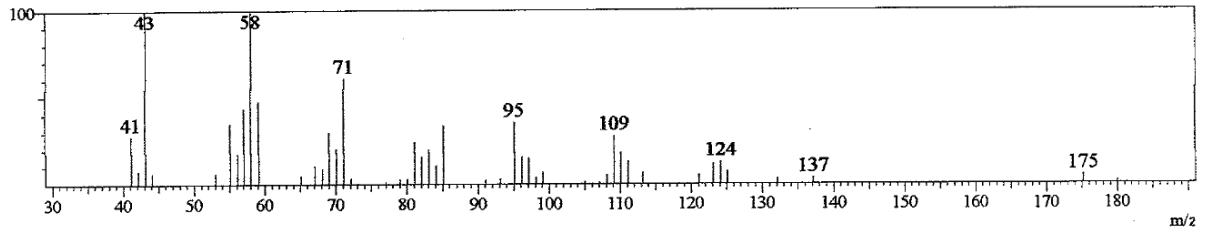
Line#:20 R.Time:42.9(Scan#:4848)



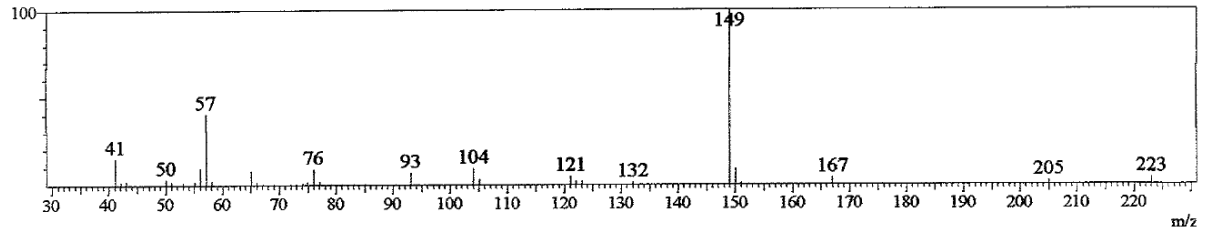
Line#:21 R.Time:43.5(Scan#:4922)



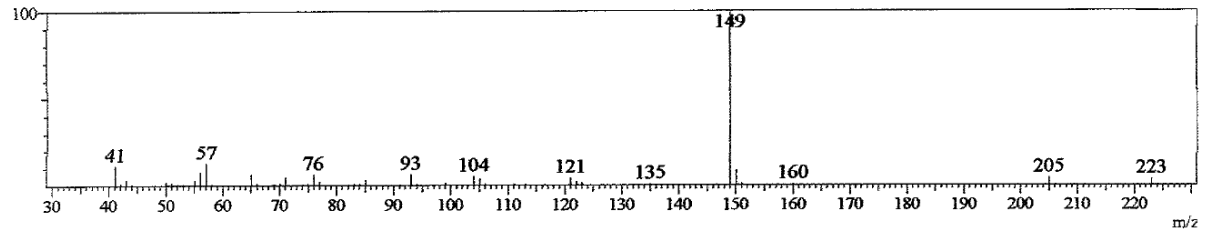
Line#:22 R.Time:44.7(Scan#:5068)



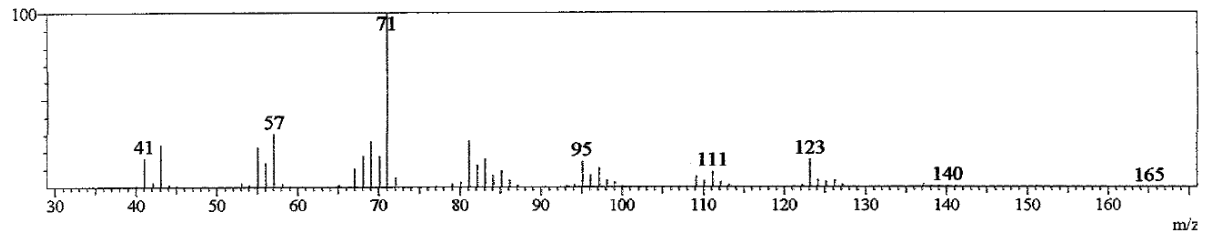
Line#:23 R.Time:45.2(Scan#:5121)



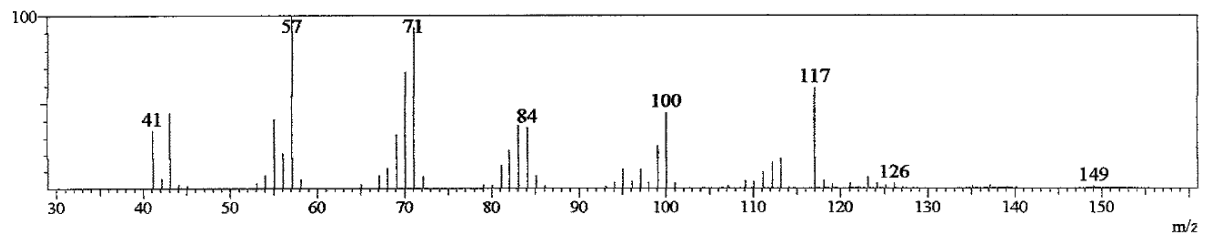
Line#:24 R.Time:46.1(Scan#:5235)



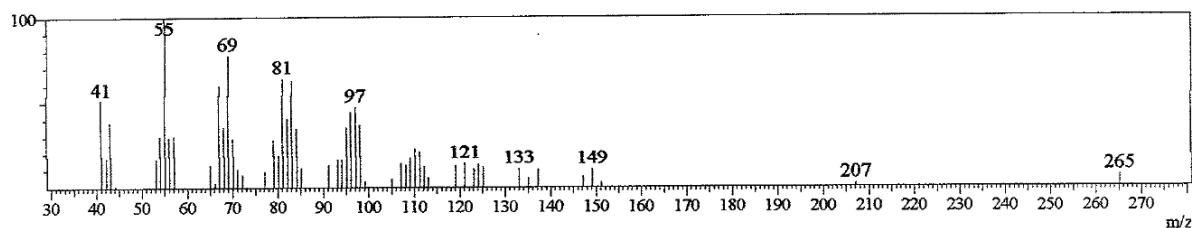
Line#:25 R.Time:47.2(Scan#:5359)



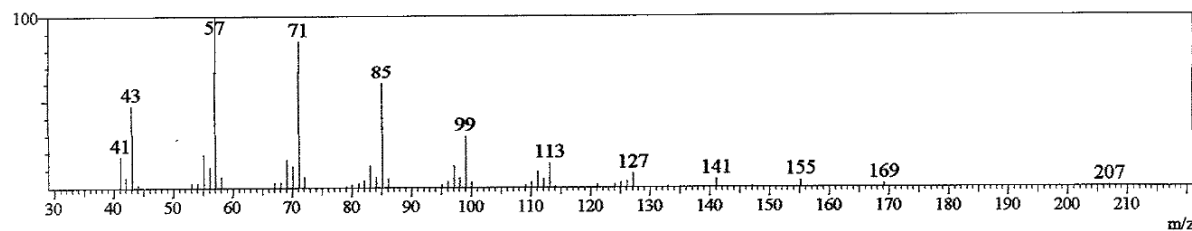
Line#:26 R.Time:47.4(Scan#:5386)



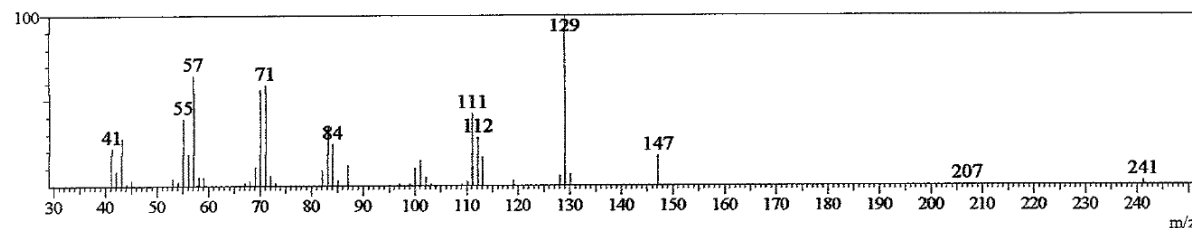
Line#:27 R.Time:48.3(Scan#:5499)



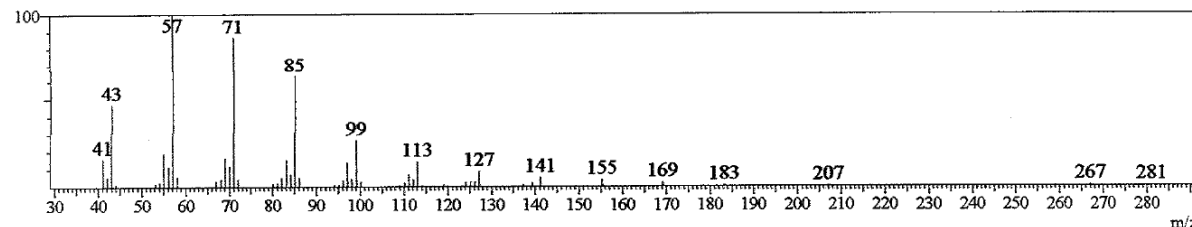
Line#:28 R.Time:48.8(Scan#:5555)



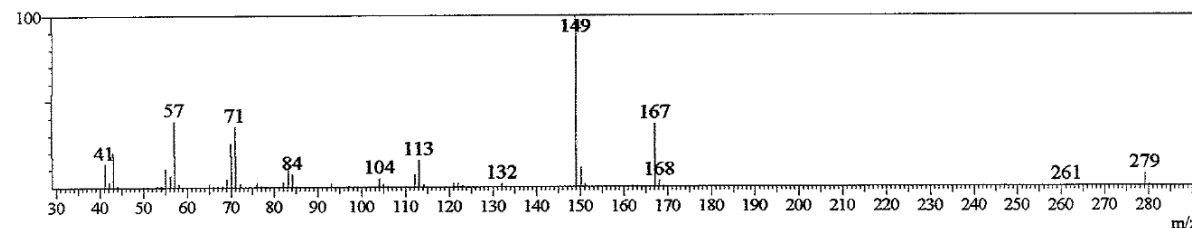
Line#:29 R.Time:48.9(Scan#:5567)



Line#:30 R.Time:49.3(Scan#:5620)

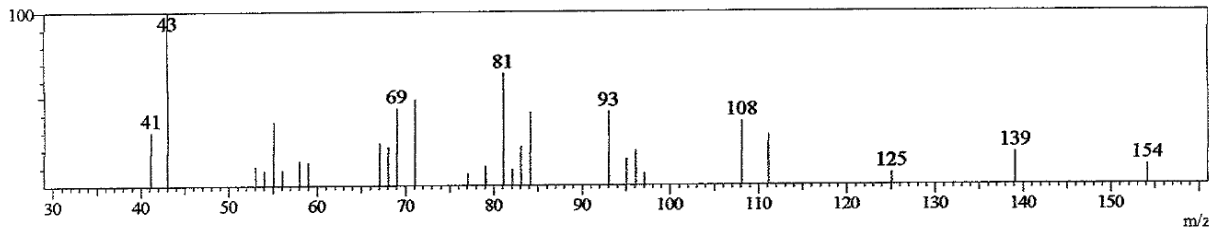


Line#:31 R.Time:49.8(Scan#:5678)

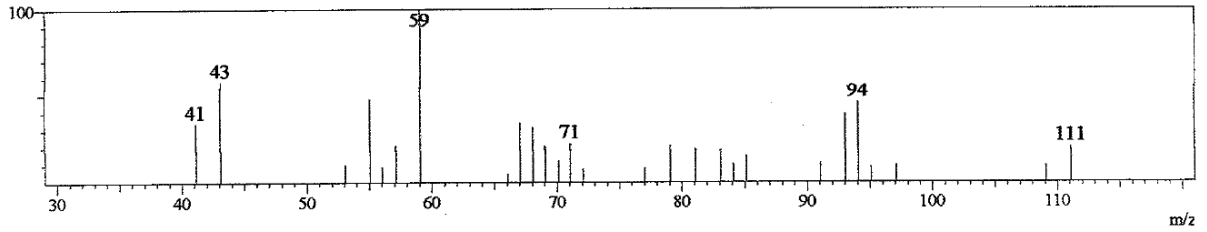


Anexo 34. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3\text{ ha}^{-1}$

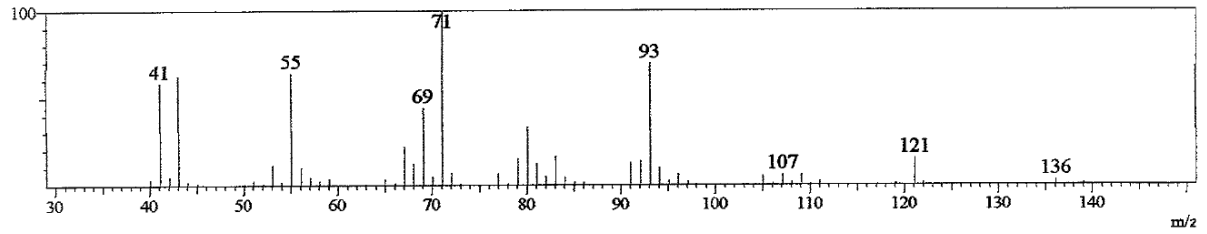
Line#1 R.Time:9.4(Scan#:828)



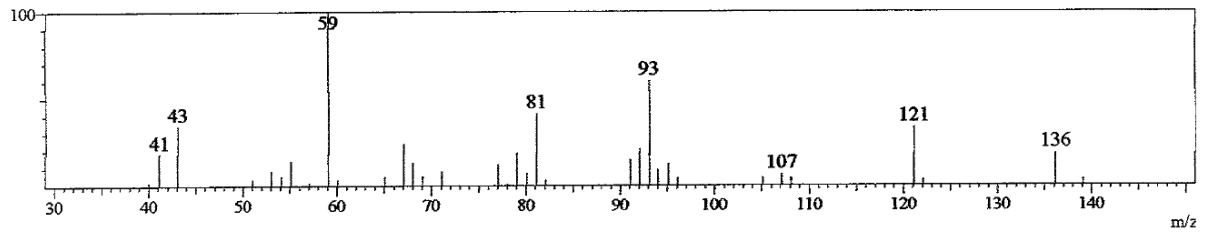
Line#2 R.Time:12.3(Scan#:1172)



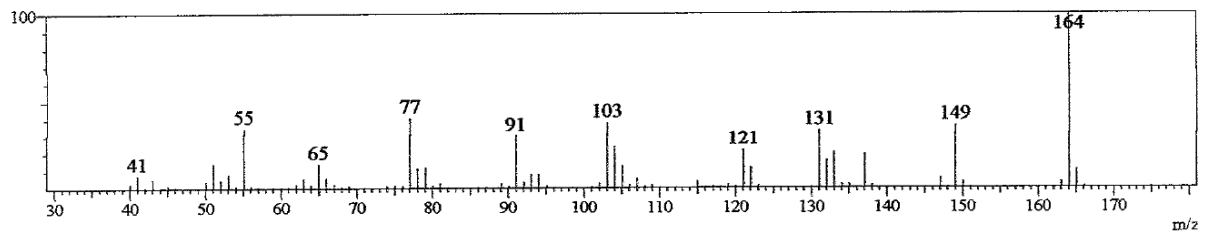
Line#3 R.Time:13.0(Scan#:1258)



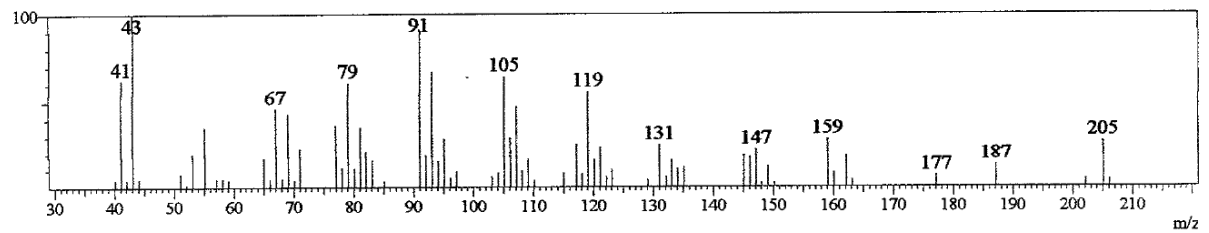
Line#4 R.Time:18.6(Scan#:1935)



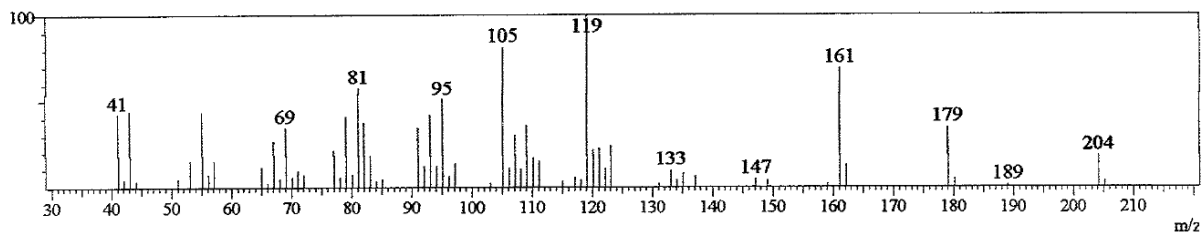
Line#5 R.Time:28.9(Scan#:3168)



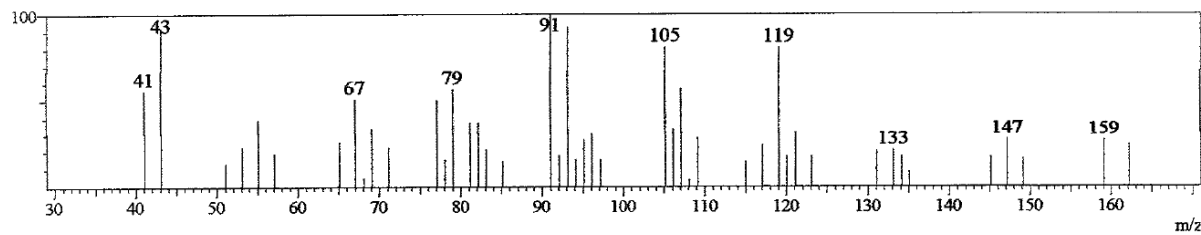
Line#6 R.Time:39.5(Scan#:4437)



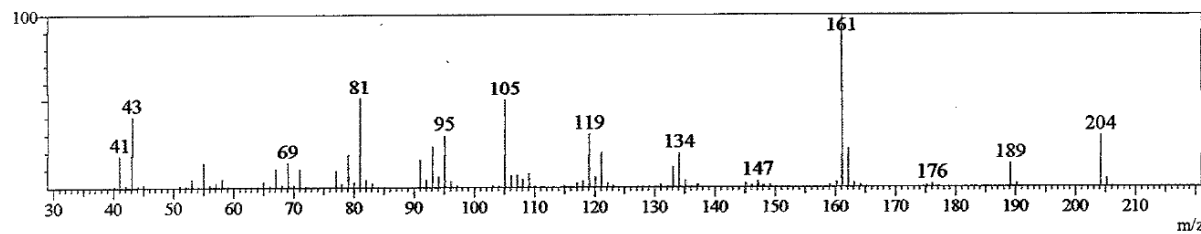
Line#:7 R.Time:40.9(Scan#:4607)



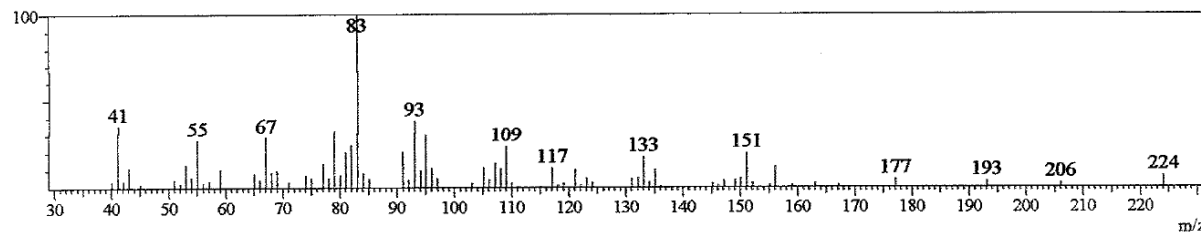
Line#:8 R.Time:41.6(Scan#:4691)



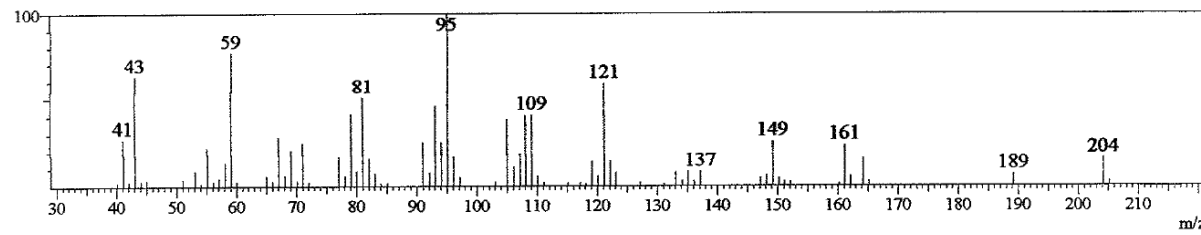
Line#:9 R.Time:41.7(Scan#:4709)



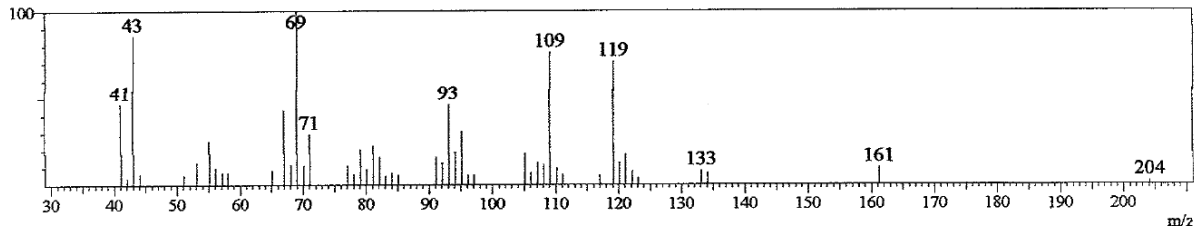
Line#:10 R.Time:41.9(Scan#:4733)



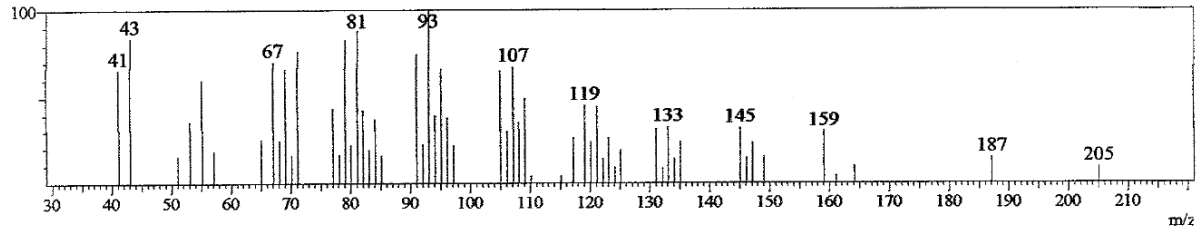
Line#:11 R.Time:42.1(Scan#:4750)



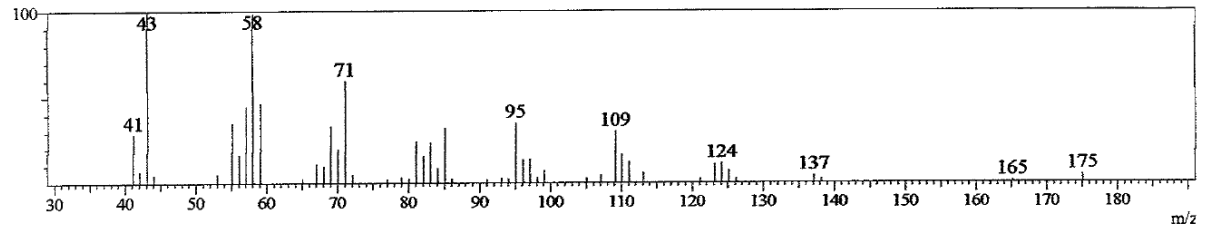
Line#:12 R.Time:42.7(Scan#:4823)



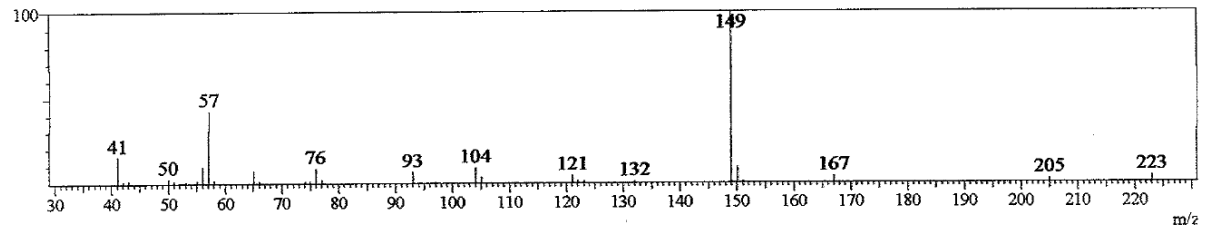
Line#:13 R.Time:43.5(Scan#:4923)



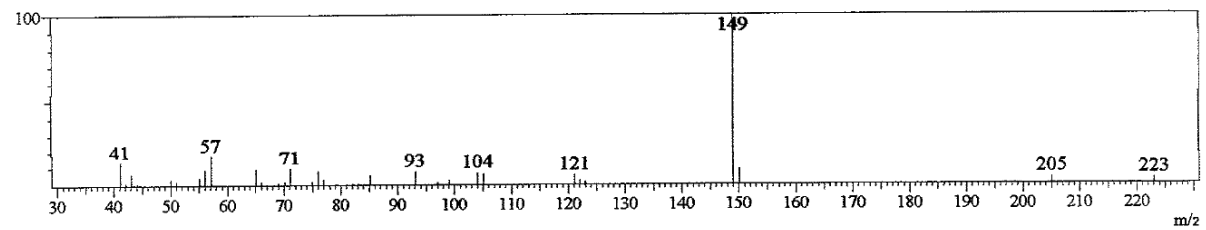
Line#:14 R.Time:44.7(Scan#:5068)



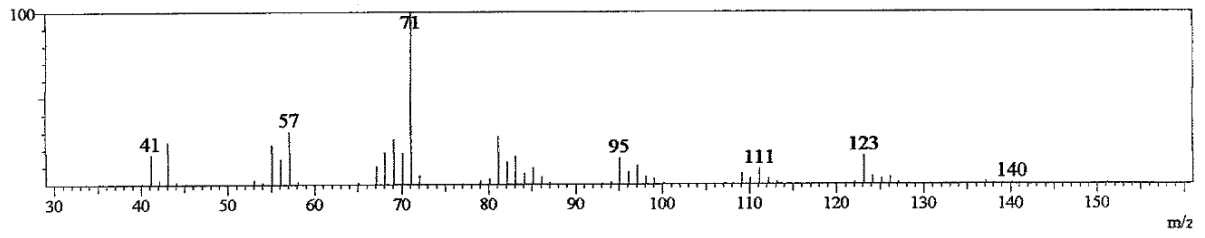
Line#:15 R.Time:45.2(Scan#:5122)



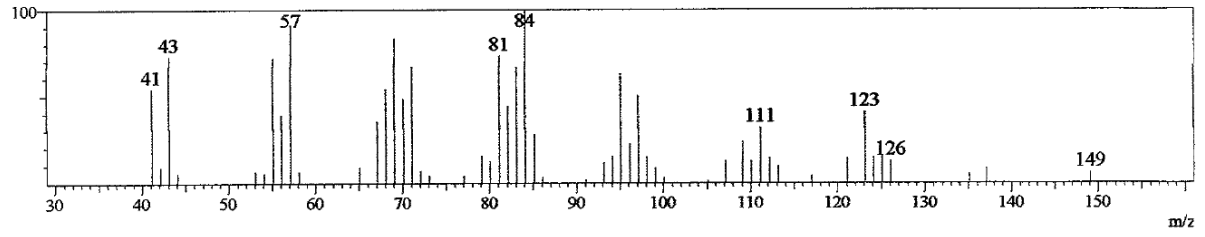
Line#:16 R.Time:46.1(Scan#:5235)



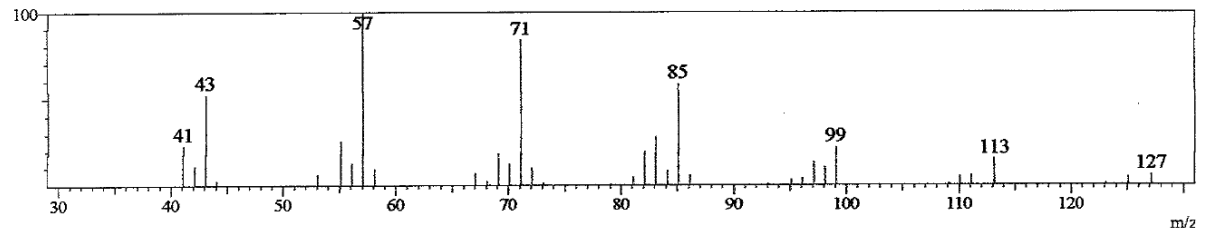
Line#:17 R.Time:47.2(Scan#:5359)



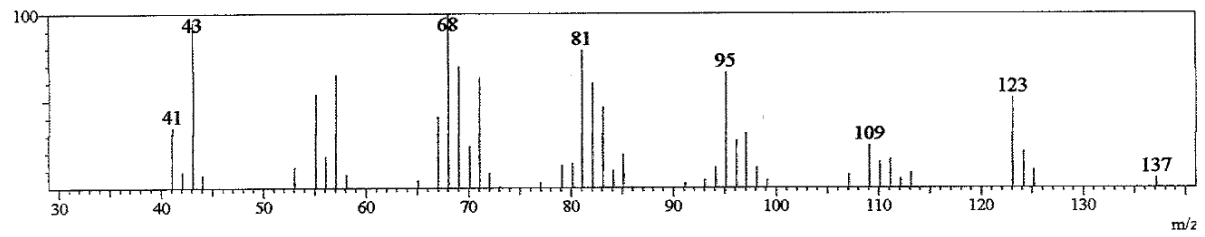
Line#:18 R.Time:47.4(Scan#:5384)



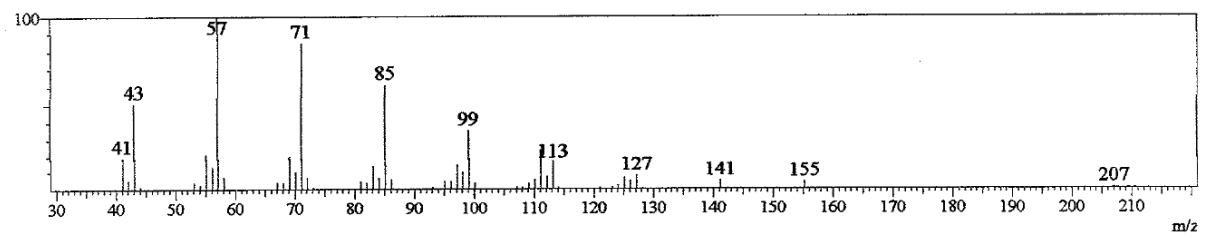
Line#:19 R.Time:47.6(Scan#:5410)



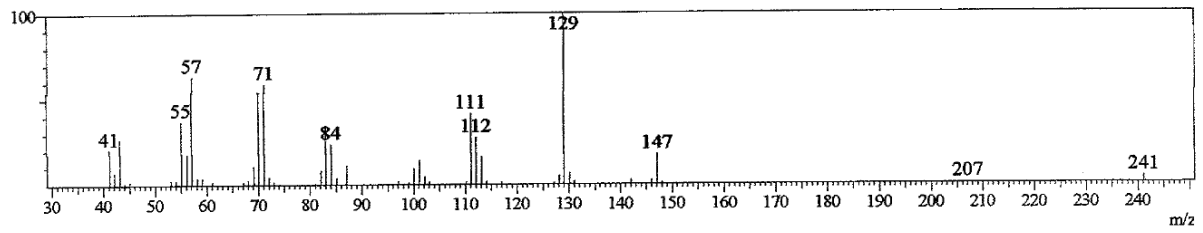
Line#:20 R.Time:47.8(Scan#:5433)



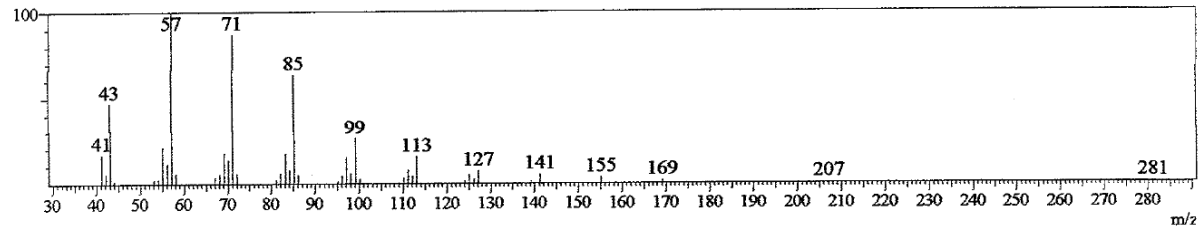
Line#:21 R.Time:48.8(Scan#:5555)



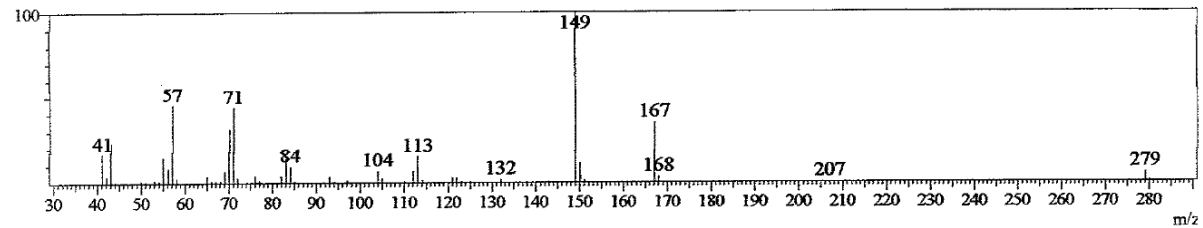
Line#:22 R.Time:48.9(Scan#:5567)



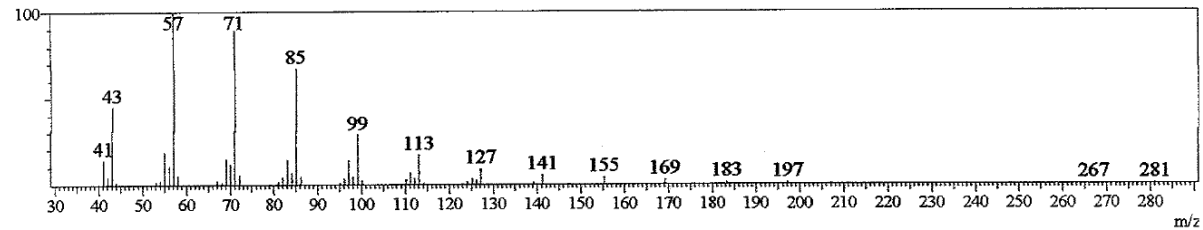
Line#:23 R.Time:49.3(Scan#:5620)



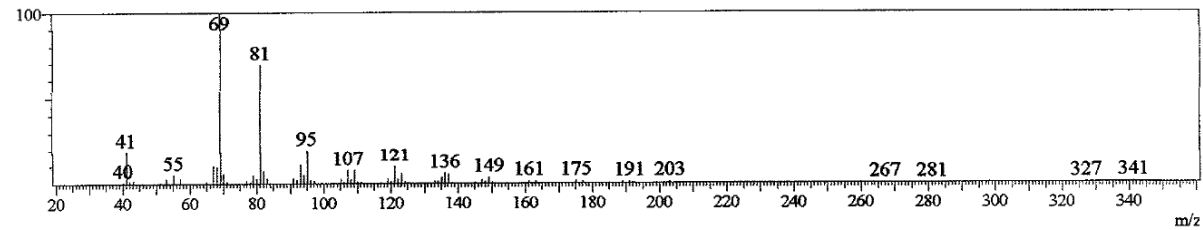
Line#:24 R.Time:49.8(Scan#:5678)



Line#:25 R.Time:50.4(Scan#:5747)

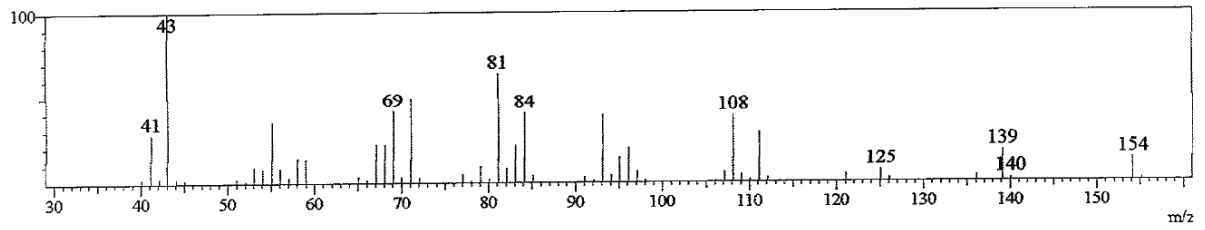


Line#:26 R.Time:51.2(Scan#:5849)

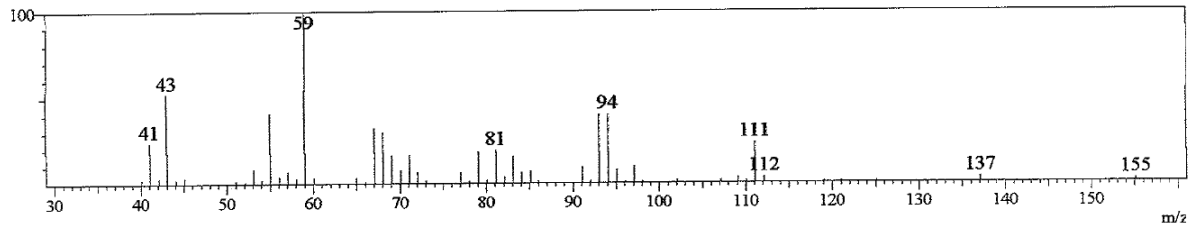


Anexo 35. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NH}_4\text{ ha}^{-1}$

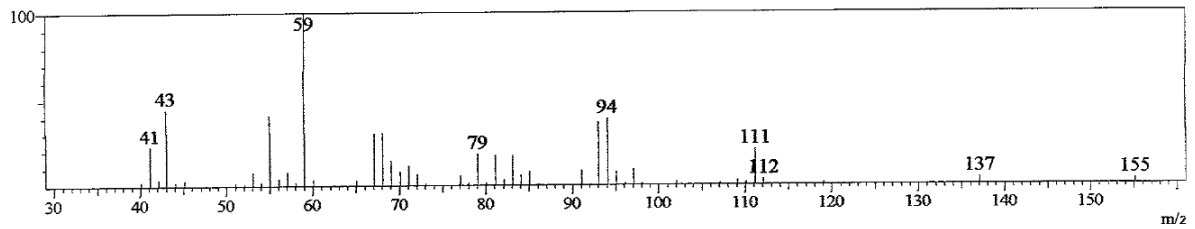
Line#1 R.Time:9.4(Scan#:824)



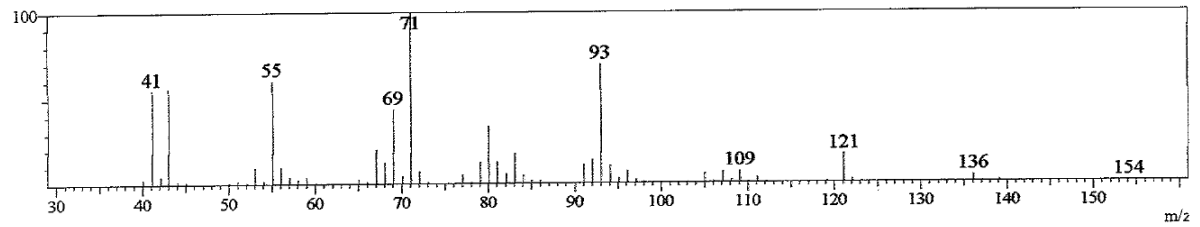
Line#2 R.Time:11.4(Scan#:1063)



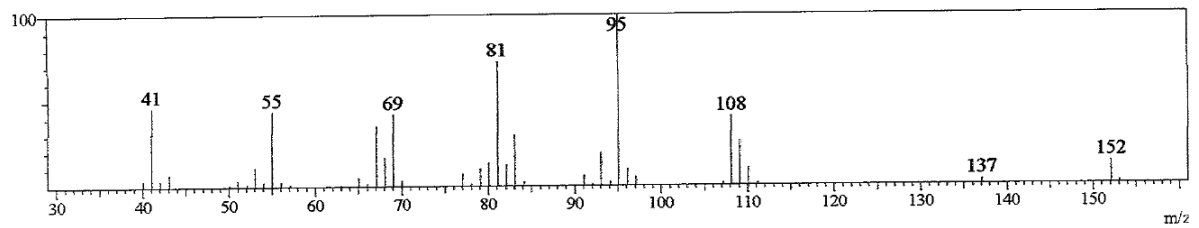
Line#3 R.Time:12.2(Scan#:1167)



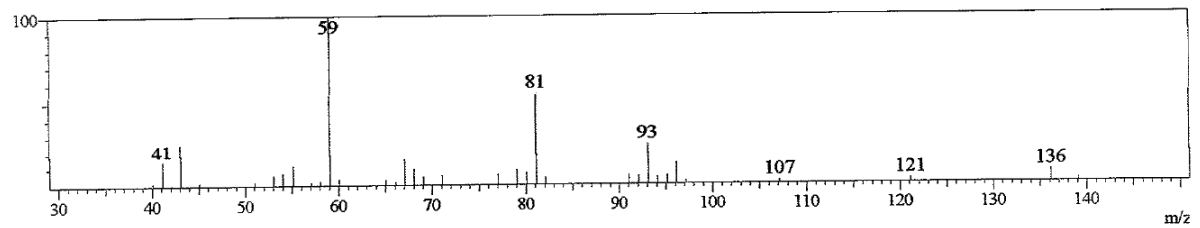
Line#4 R.Time:13.0(Scan#:1261)



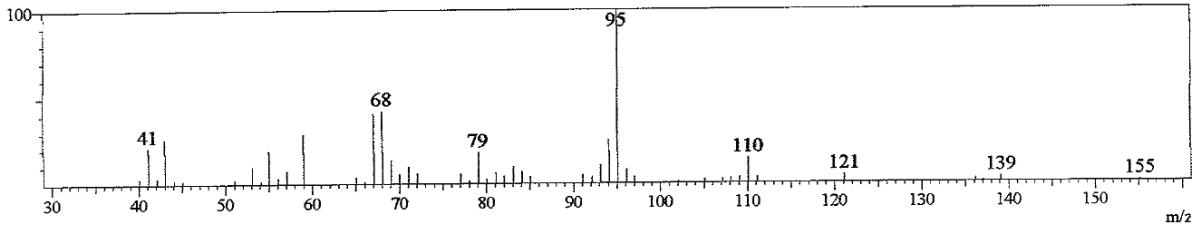
Line#5 R.Time:15.6(Scan#:1570)



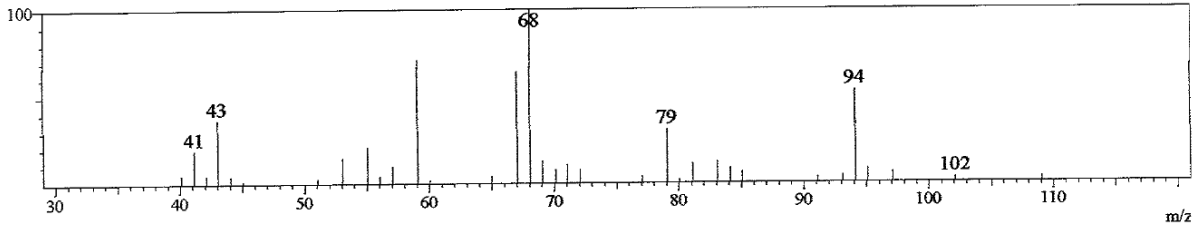
Line#6 R.Time:17.1(Scan#:1756)



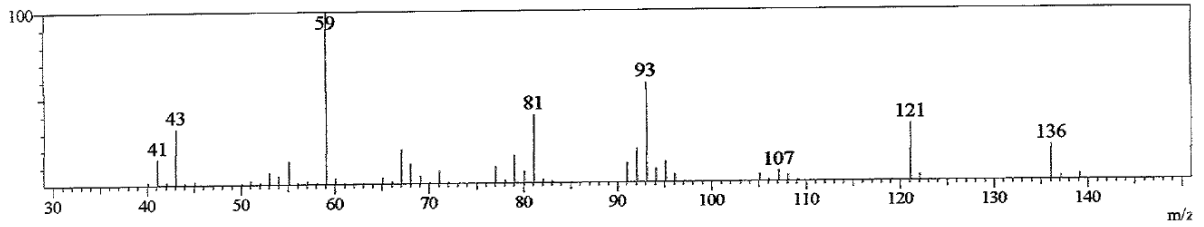
Line#:7 R.Time:17.3(Scan#:1775)



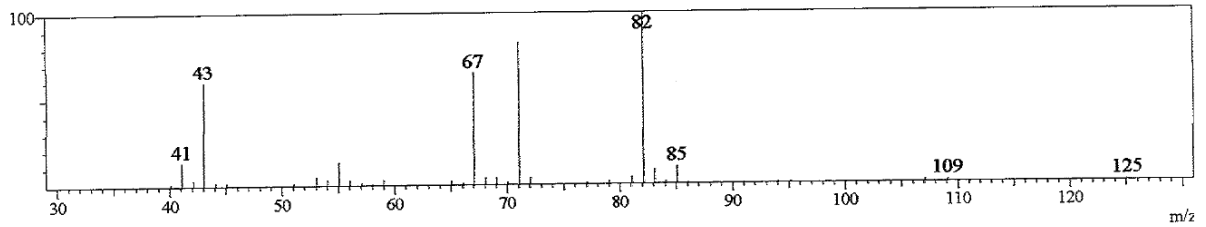
Line#:8 R.Time:17.7(Scan#:1829)



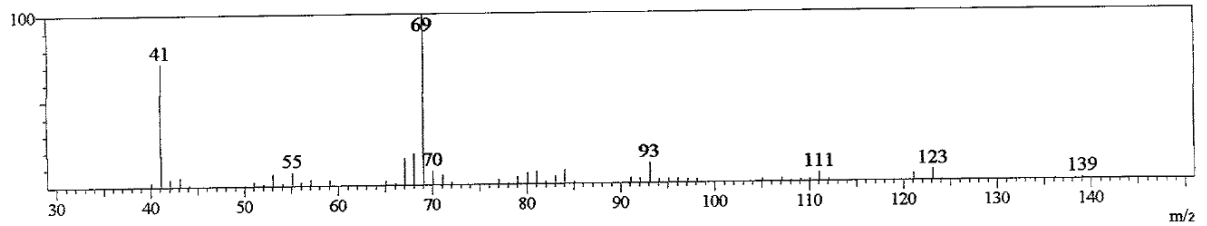
Line#:9 R.Time:18.6(Scan#:1931)



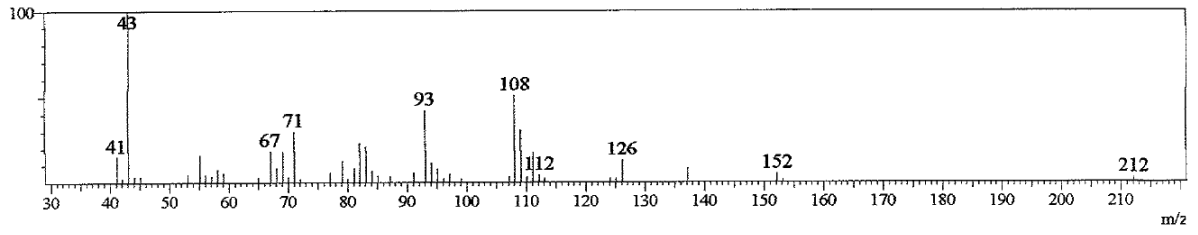
Line#:10 R.Time:18.8(Scan#:1956)



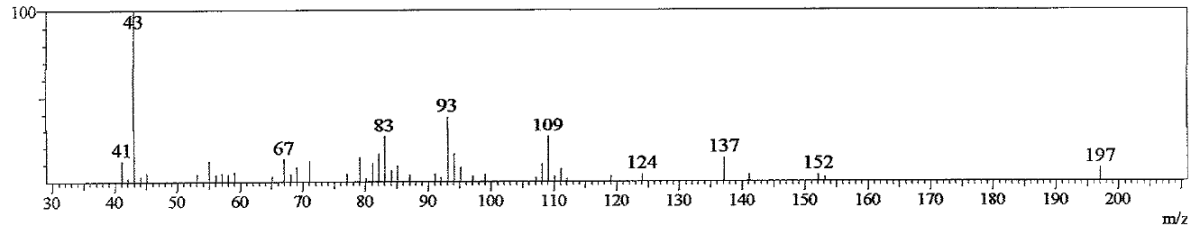
Line#:11 R.Time:22.3(Scan#:2378)



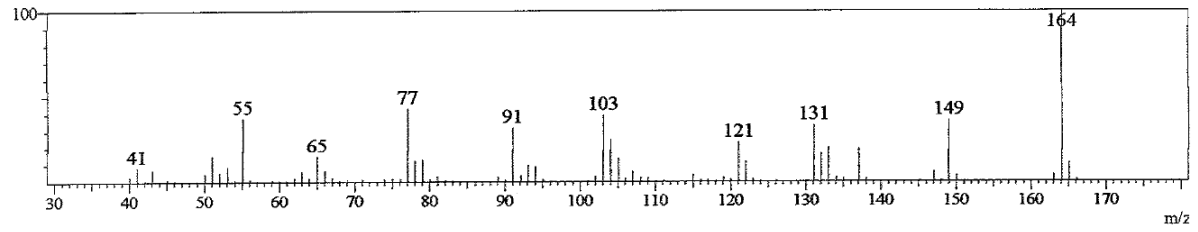
Line# 12 R.Time:27.5(Scan# 3001)



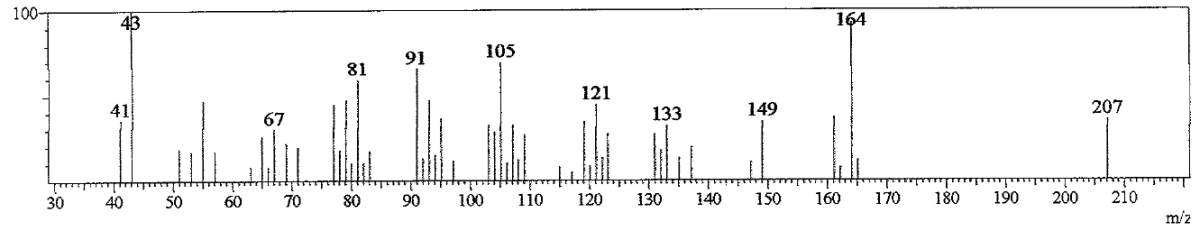
Line# 13 R.Time:28.5(Scan# 3118)



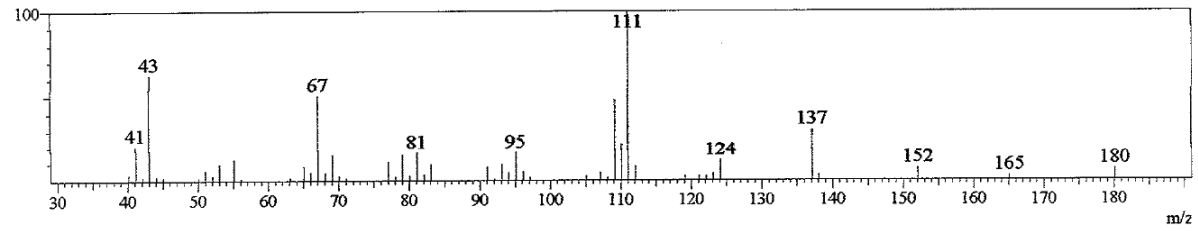
Line# 14 R.Time:28.9(Scan# 3166)



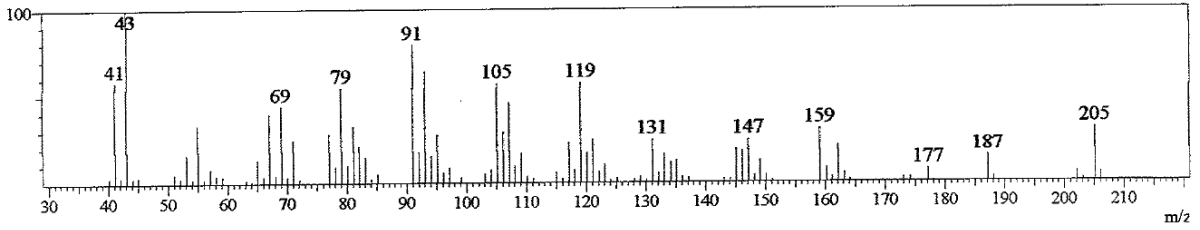
Line# 15 R.Time:37.3(Scan# 4173)



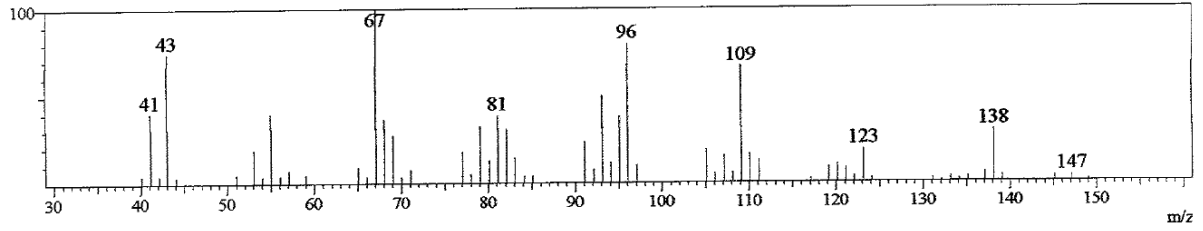
Line# 16 R.Time:37.8(Scan# 4235)



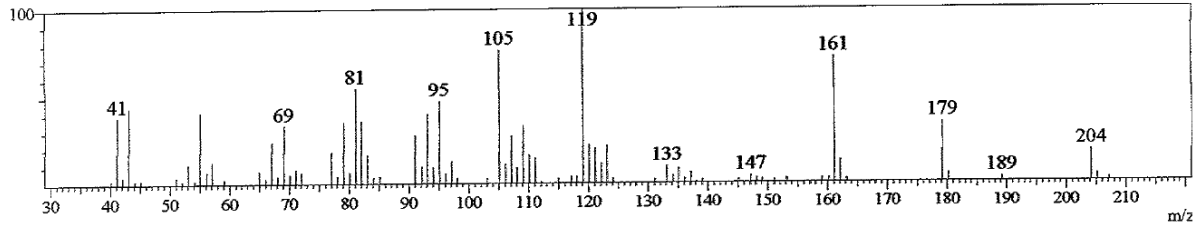
Line#:17 R.Time:39.5(Scan#:4438)



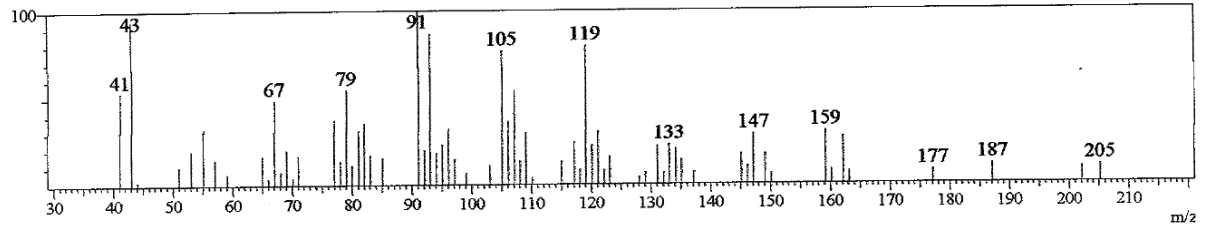
Line#:18 R.Time:40.7(Scan#:4586)



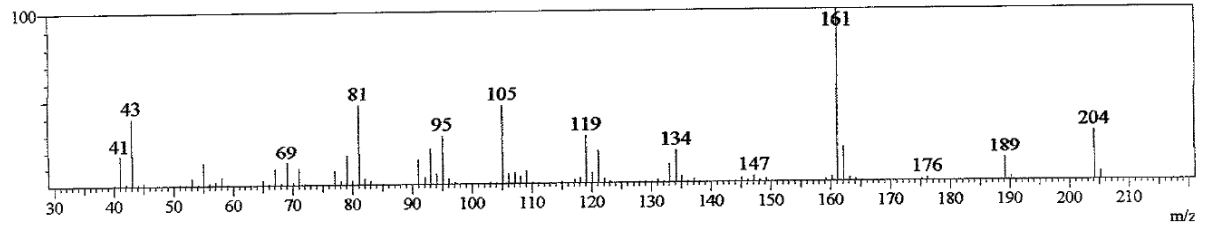
Line#:19 R.Time:40.9(Scan#:4607)



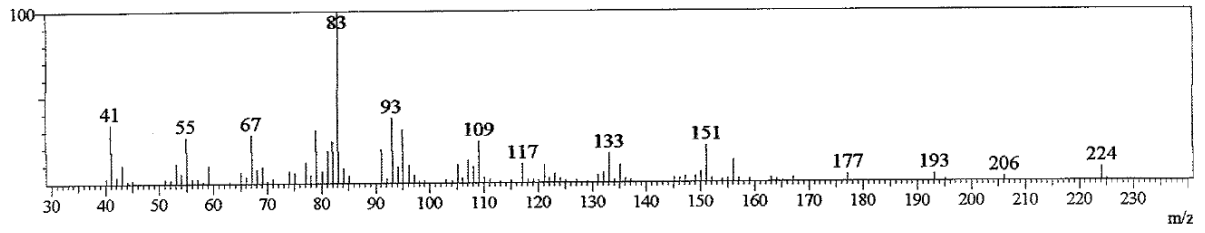
Line#:20 R.Time:41.6(Scan#:4692)



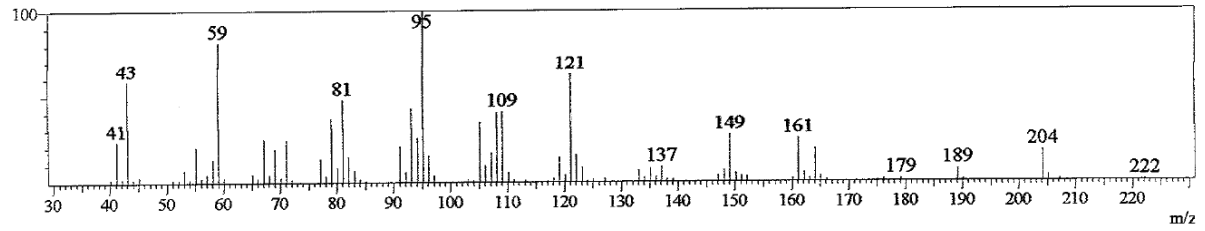
Line#:21 R.Time:41.8(Scan#:4712)



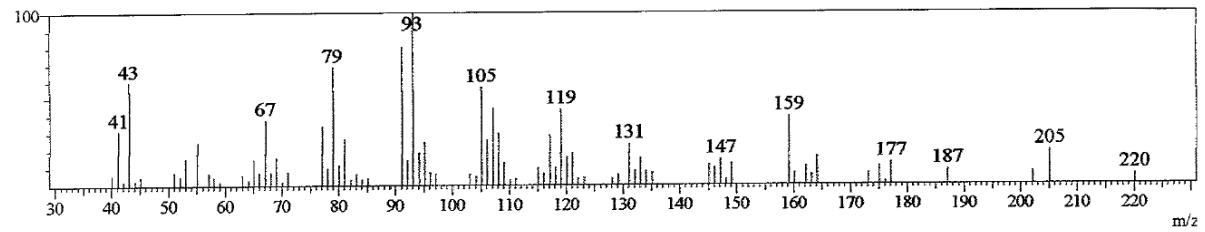
Line#:22 R.Time:41.9(Scan#:4733)



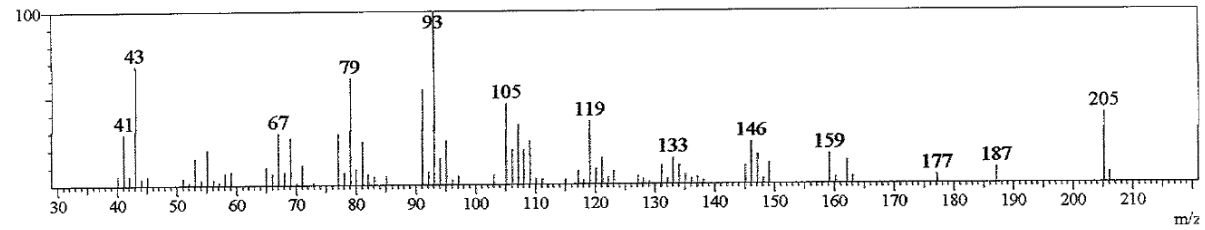
Line#:23 R.Time:42.1(Scan#:4751)



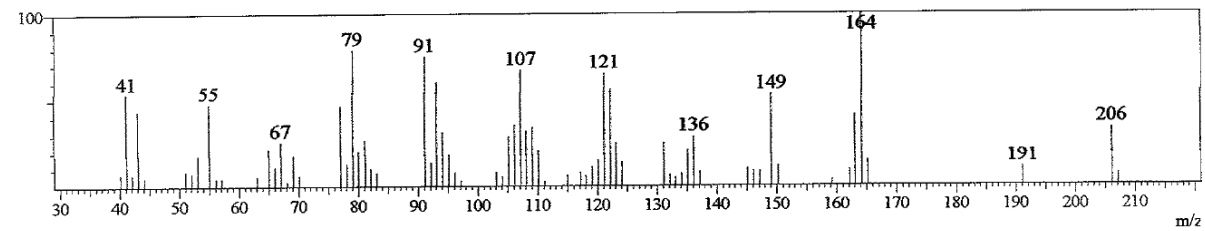
Line#:24 R.Time:42.2(Scan#:4768)



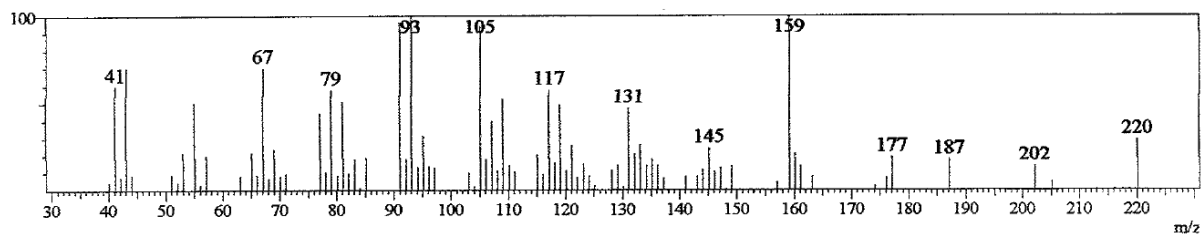
Line#:25 R.Time:42.5(Scan#:4798)



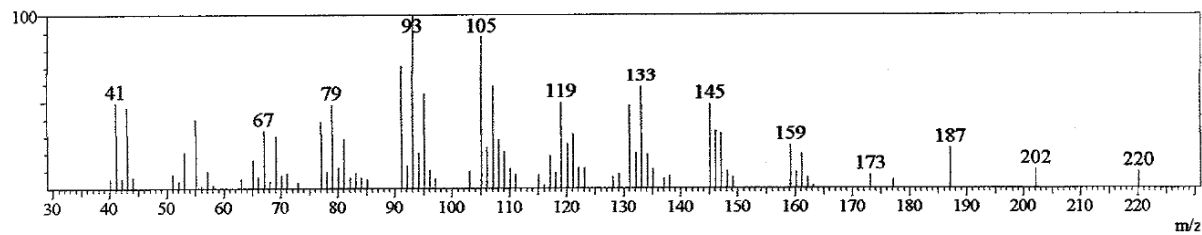
Line#:26 R.Time:42.8(Scan#:4834)



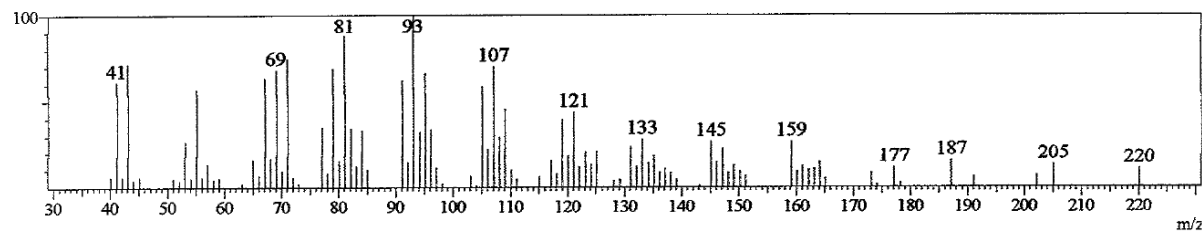
Line#:27 R.Time:42.9(Scan#:4848)



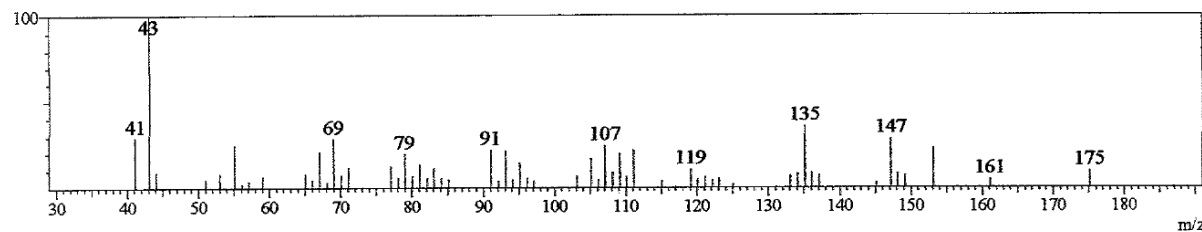
Line#:28 R.Time:43.2(Scan#:4888)



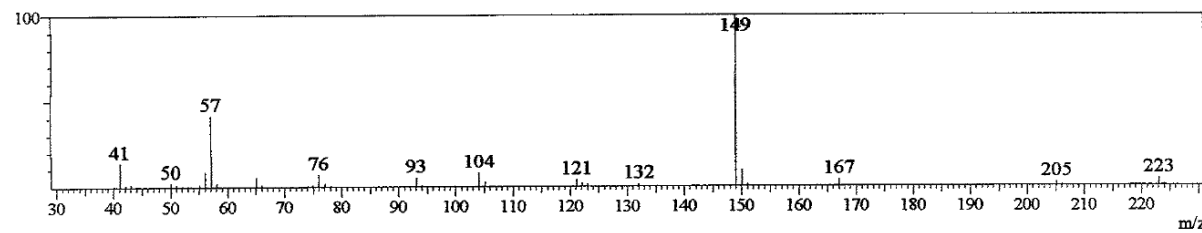
Line#:29 R.Time:43.5(Scan#:4923)



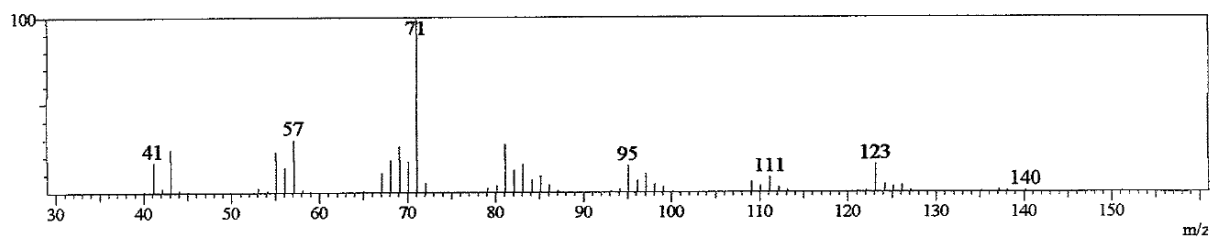
Line#:30 R.Time:43.7(Scan#:4946)



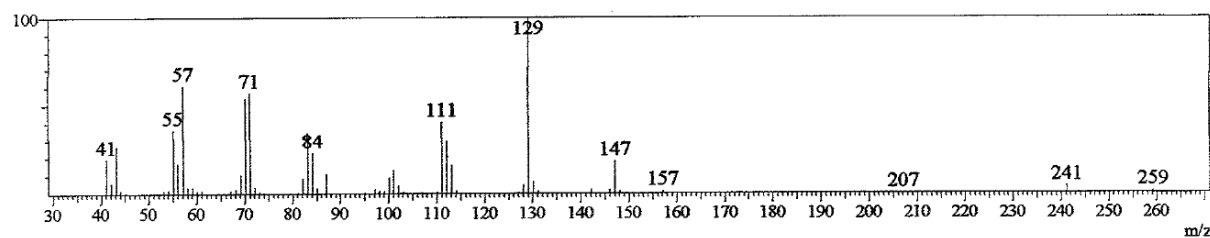
Line#:31 R.Time:45.2(Scan#:5122)



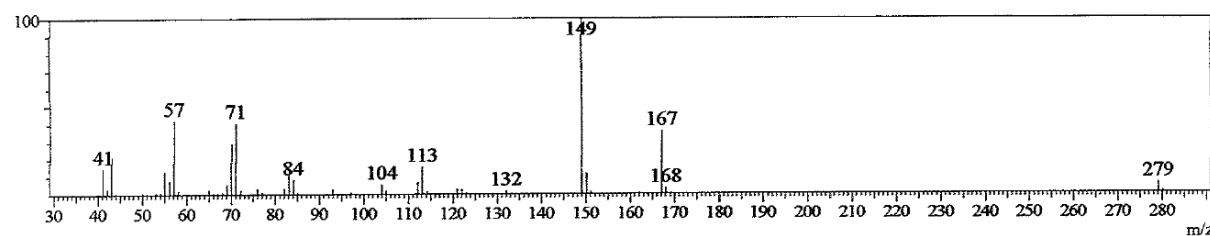
Line#:32 R.Time:47.2(Scan#:5360)



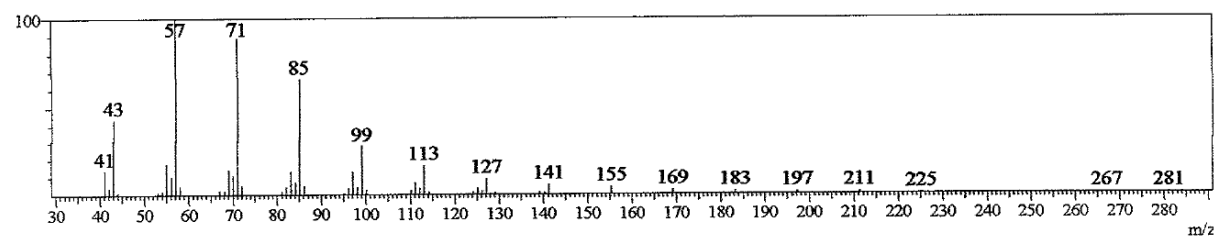
Line#:33 R.Time:48.9(Scan#:5567)



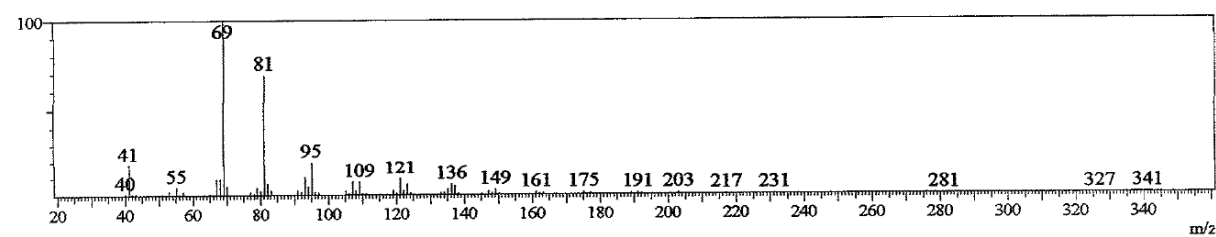
Line#:34 R.Time:49.8(Scan#:5678)



Line#:35 R.Time:50.4(Scan#:5747)



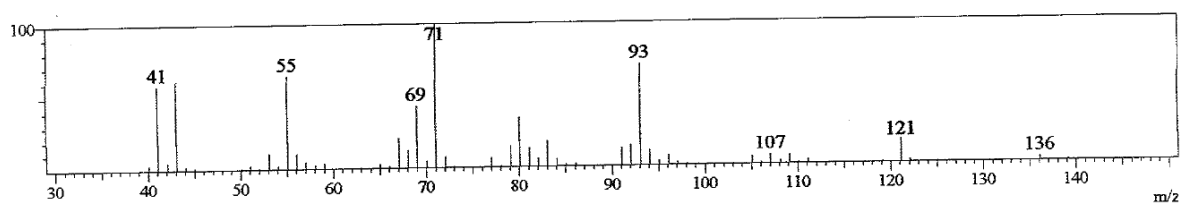
Line#:36 R.Time:51.2(Scan#:5850)



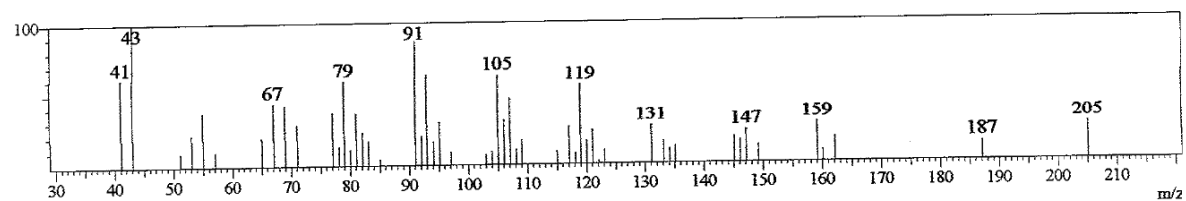
Anexo 36. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NH}_4\text{ ha}^{-1}$

Espectro de massa das amostras de óleo essencial de manjeriçã cultivar Maria Bonita

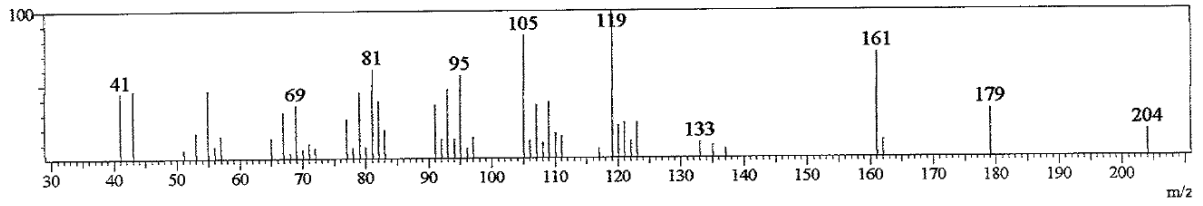
Line#1 R.Time:13.0(Scan#1258)



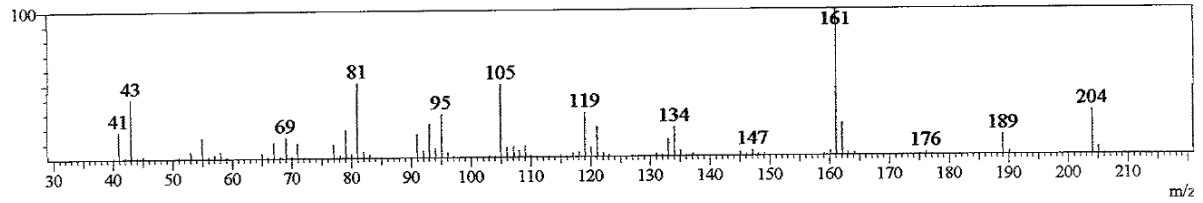
Line#2 R.Time:39.5(Scan#4439)



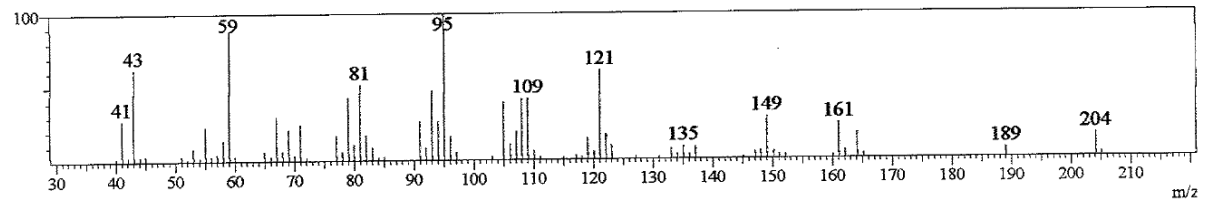
Line#:3 R.Time:40.9(Scan#:4608)



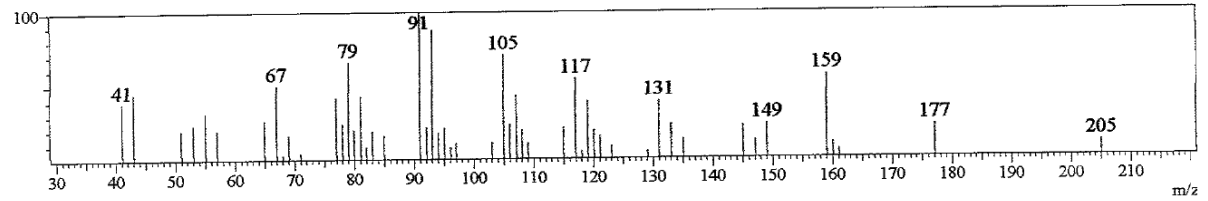
Line#:4 R.Time:41.7(Scan#:4710)



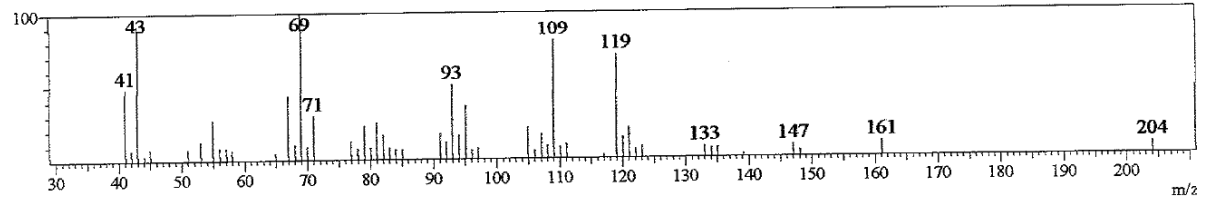
Line#:5 R.Time:42.1(Scan#:4750)



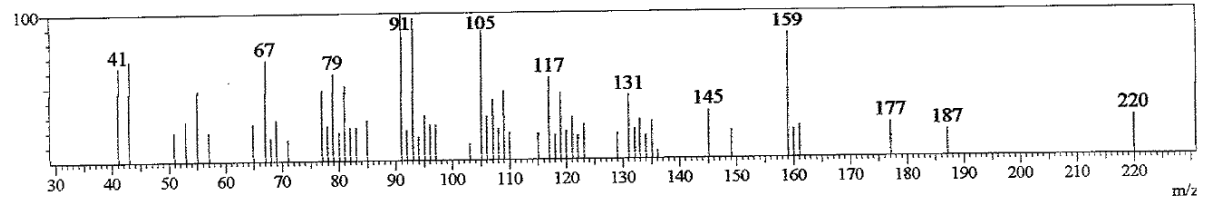
Line#:6 R.Time:42.2(Scan#:4769)



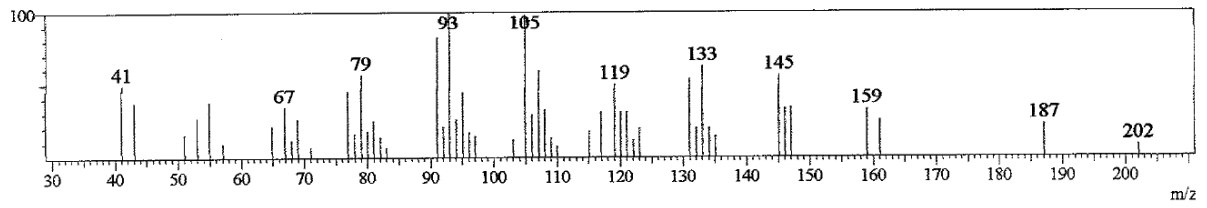
Line#:7 R.Time:42.7(Scan#:4824)



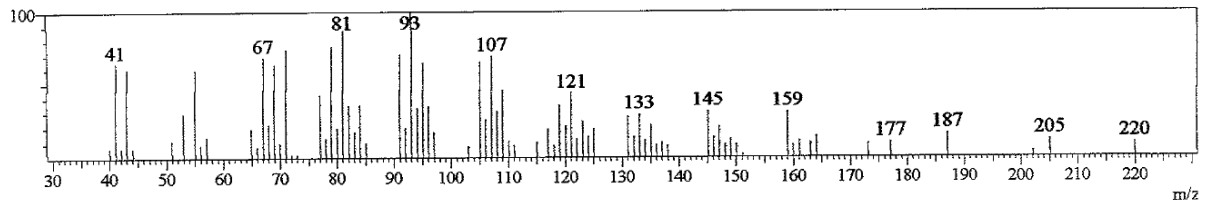
Line#:8 R.Time:42.9(Scan#:4848)



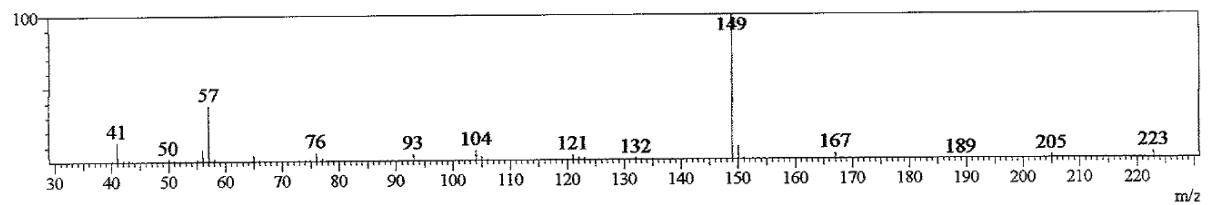
Line# 9 R.Time:43.2(Scan#:4889)



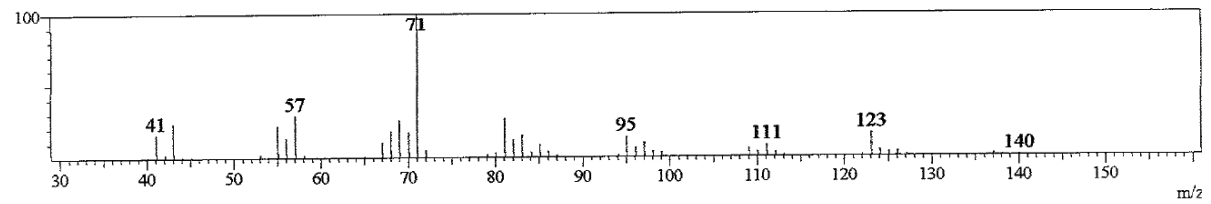
Line# 10 R.Time:43.5(Scan#:4923)



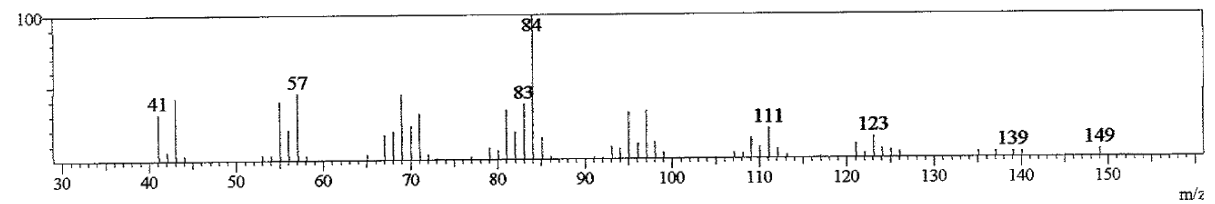
Line# 11 R.Time:45.2(Scan#:5122)



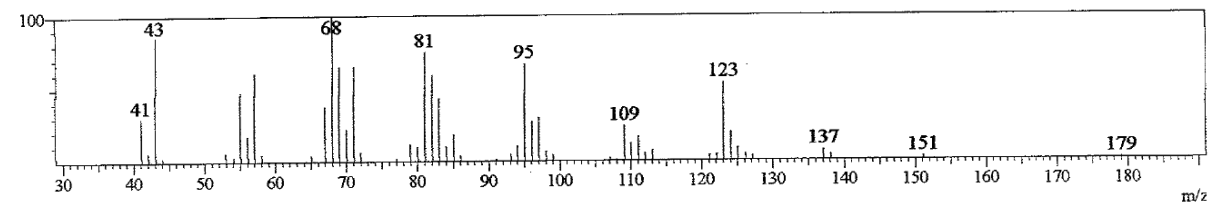
Line# 12 R.Time:47.2(Scan#:5360)



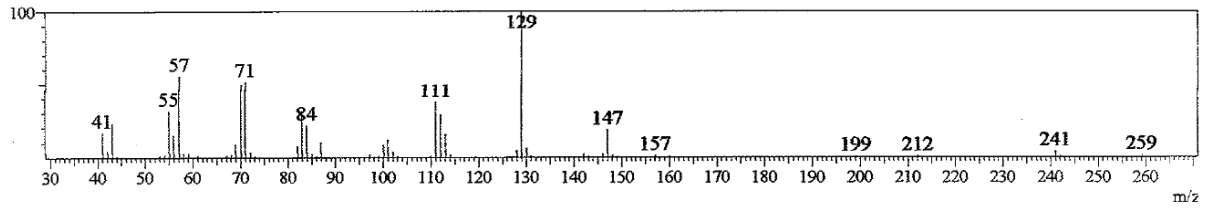
Line# 13 R.Time:47.4(Scan#:5385)



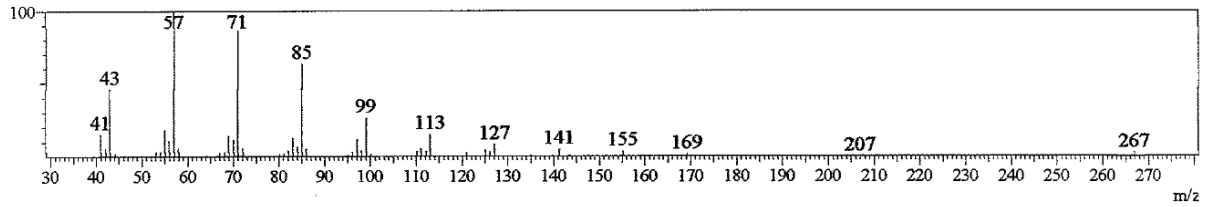
Line# 14 R.Time:47.8(Scan#:5433)



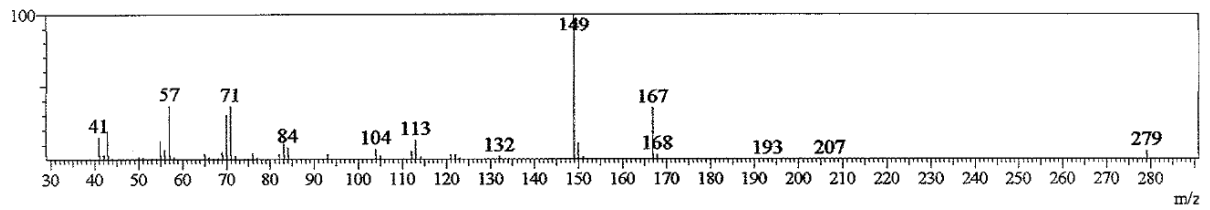
Line#:15 R.Time:48.9(Scan#:5567)



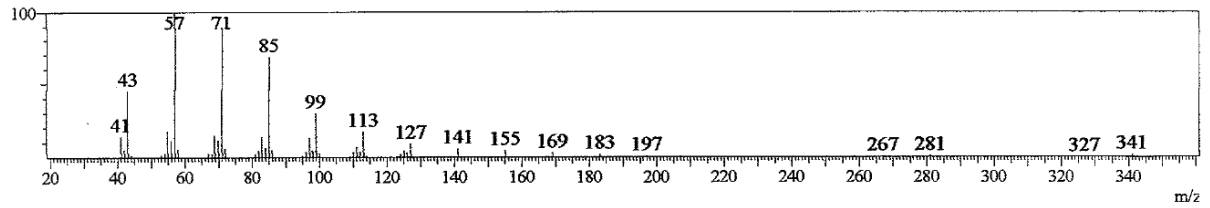
Line#:16 R.Time:49.3(Scan#:5621)



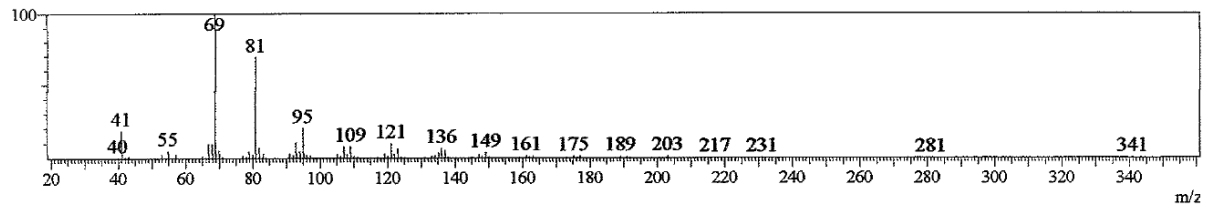
Line#:17 R.Time:49.8(Scan#:5678)



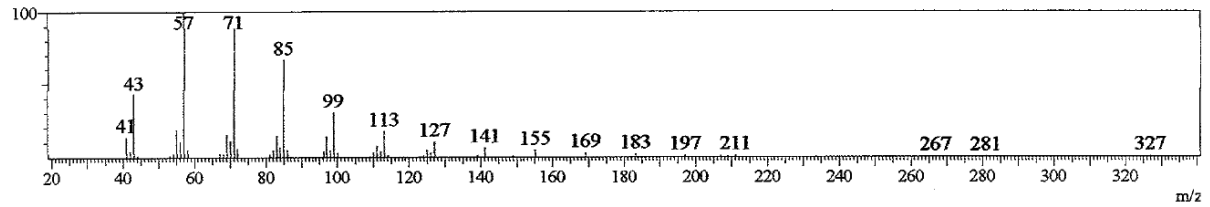
Line#:18 R.Time:50.4(Scan#:5747)



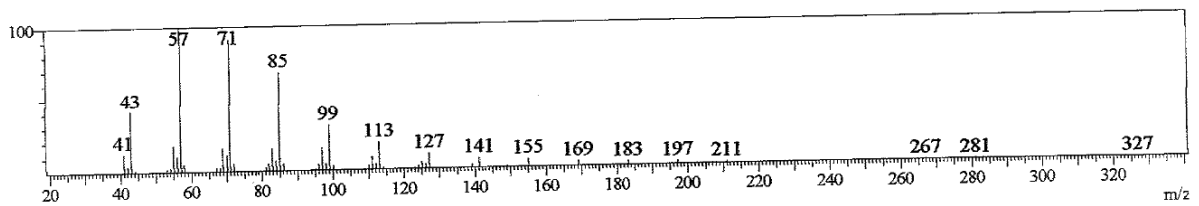
Line#:19 R.Time:51.2(Scan#:5850)



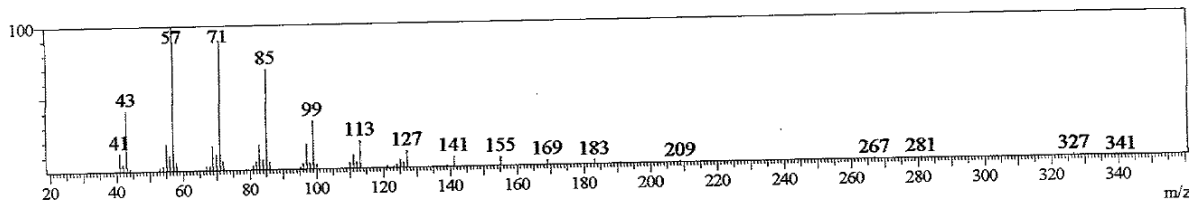
Line#:20 R.Time:51.6(Scan#:5890)



Line#:21 R.Time:53.1(Scan#:6070)

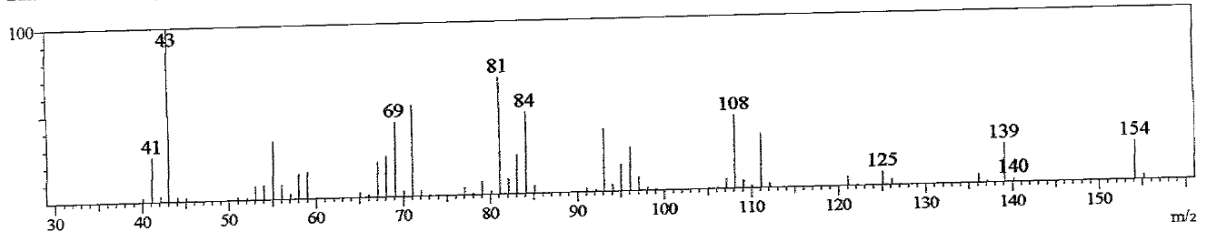


Line#:22 R.Time:55.1(Scan#:6317)

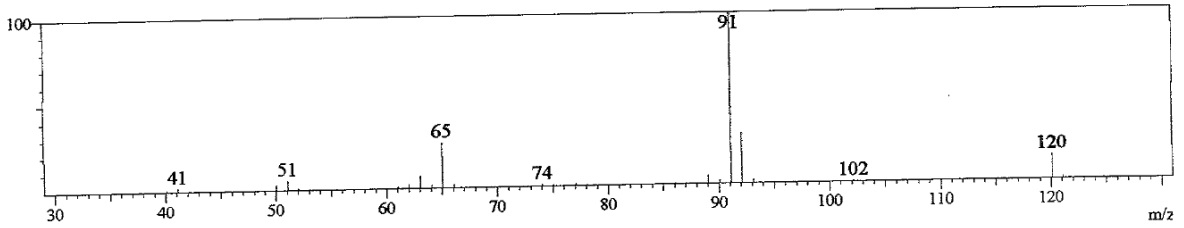


Anexo 37. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetida ao tratamento sem nitrogênio.

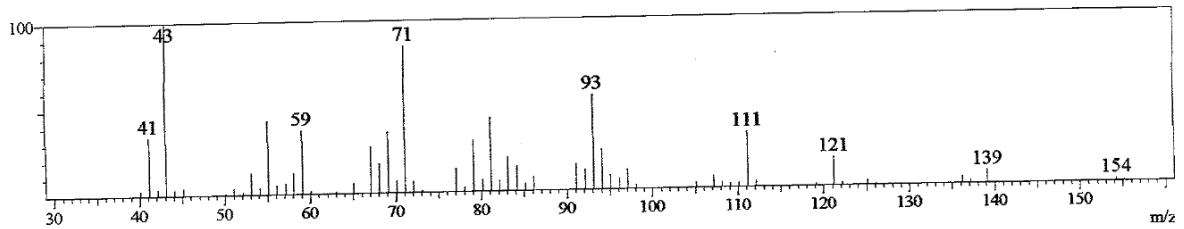
Line#:1 R.Time:9.4(Scan#:824)



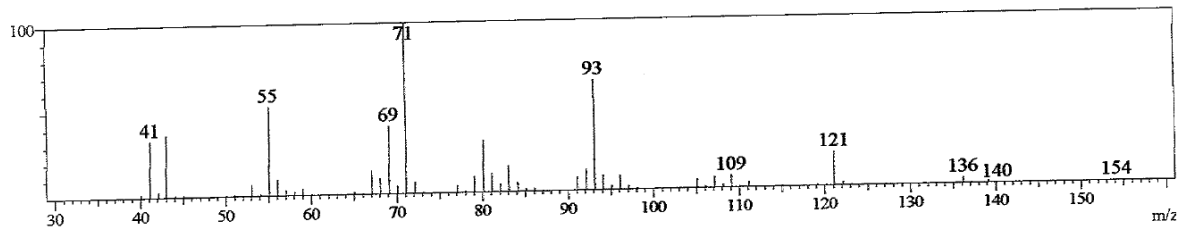
Line#:2 R.Time:10.5(Scan#:956)



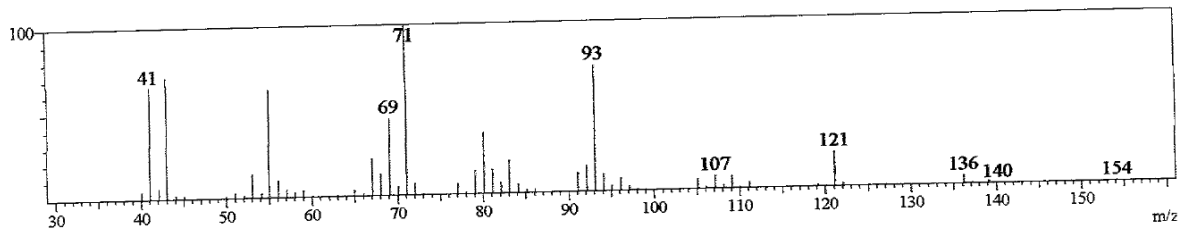
Line#:3 R.Time:11.4(Scan#:1071)



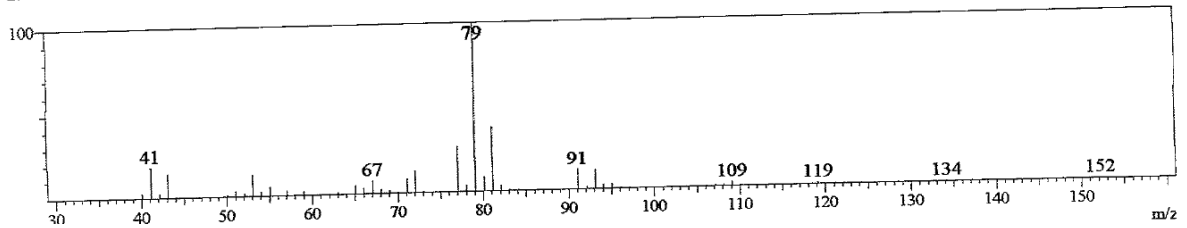
Line#:4 R.Time:13.4(Scan#:1305)



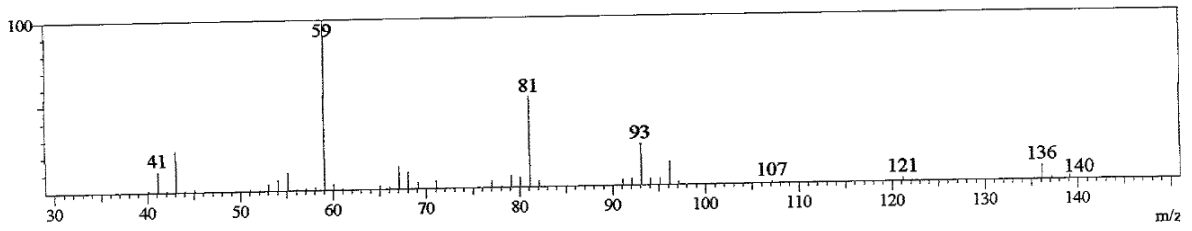
Line#:5 R.Time:13.8(Scan#:1358)



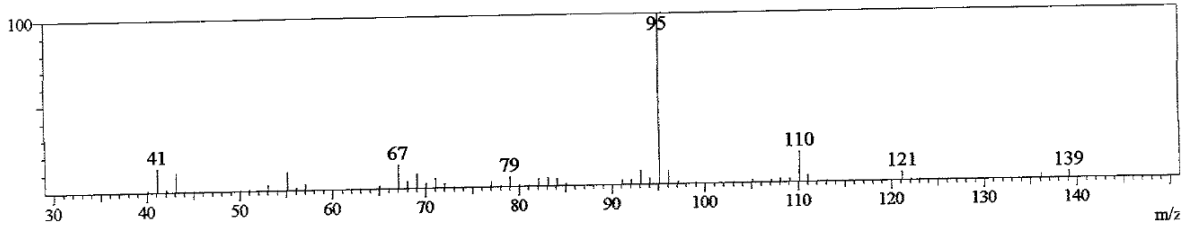
Line#:6 R.Time:15.2(Scan#:1530)



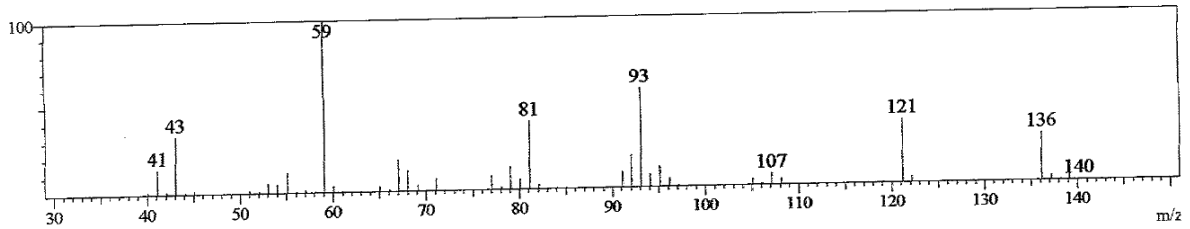
Line#:7 R.Time:17.2(Scan#:1765)



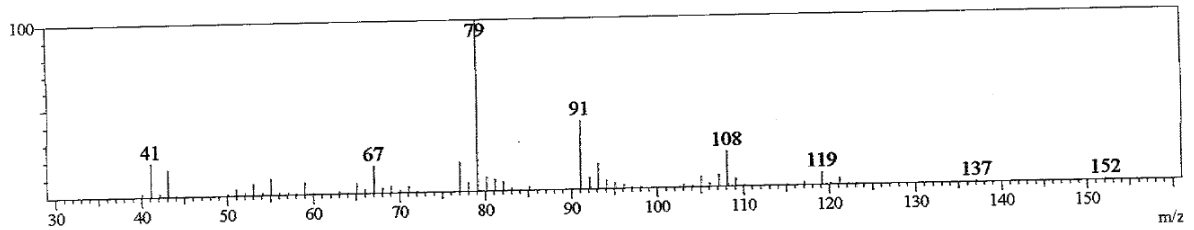
Line#:8 R.Time:17.4(Scan#:1783)



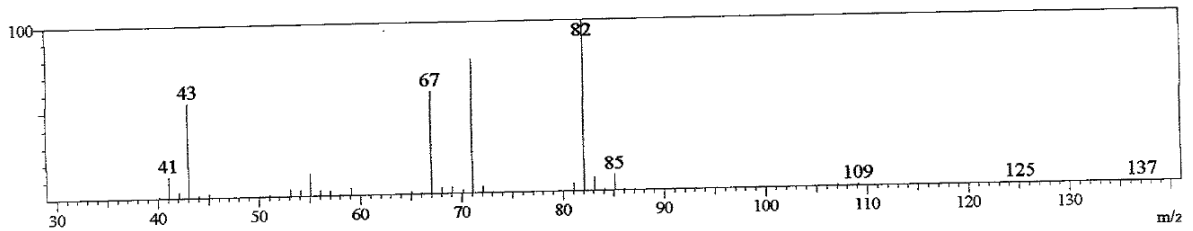
Line#:9 R.Time:18.7(Scan#:1947)



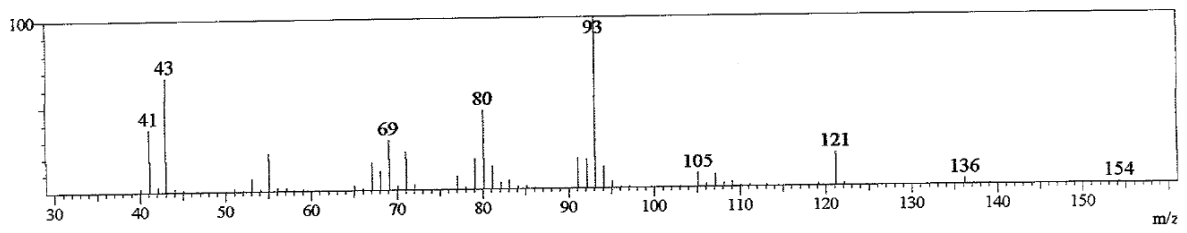
Line#:10 R.Time:18.9(Scan#:1974)



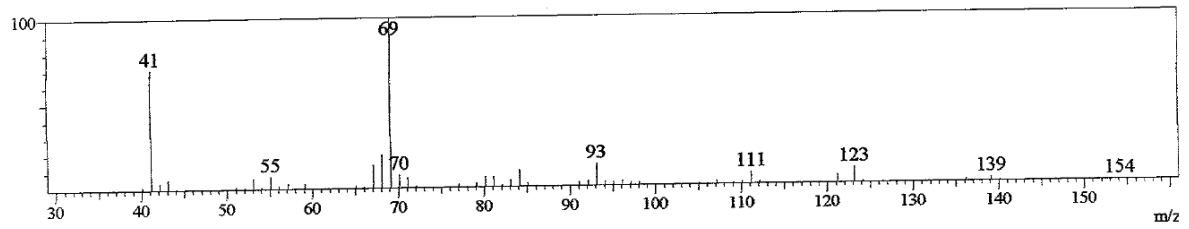
Line#:11 R.Time:19.2(Scan#:2005)



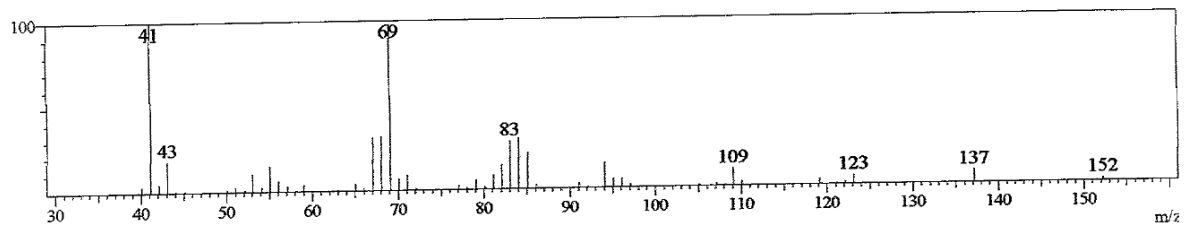
Line#:12 R.Time:21.8(Scan#:2315)



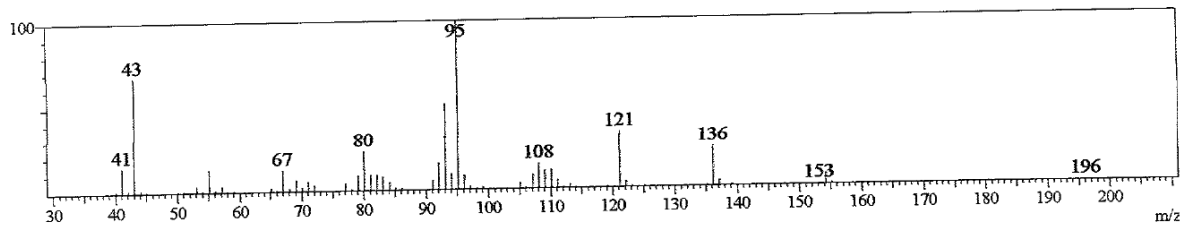
Line#:13 R.Time:22.7(Scan#:2430)



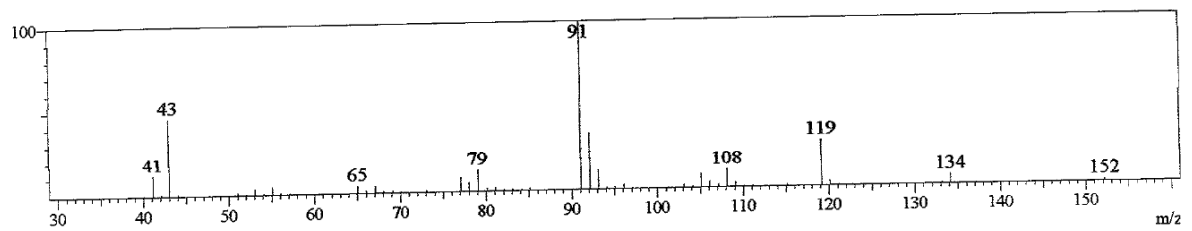
Line#:14 R.Time:23.3(Scan#:2499)



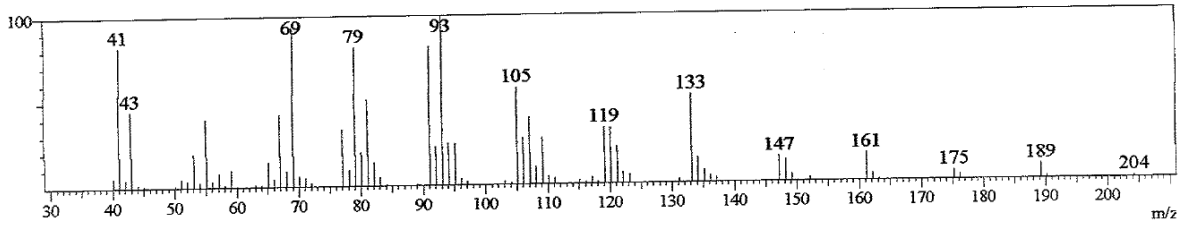
Line#:15 R.Time:23.9(Scan#:2573)



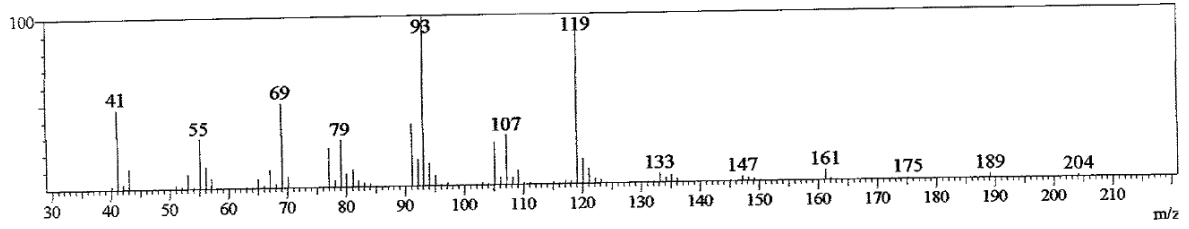
Line#:16 R.Time:26.4(Scan#:2873)



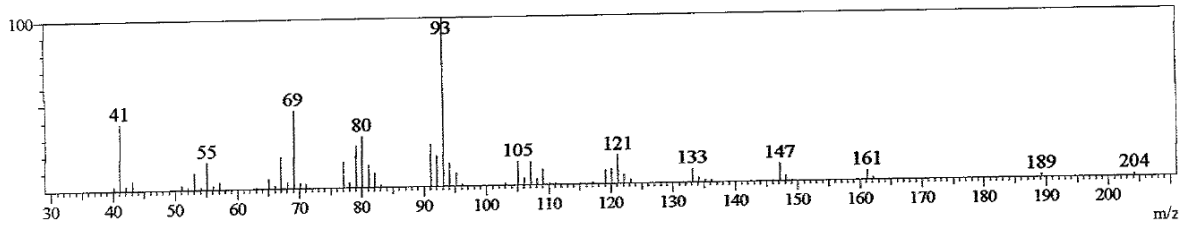
Line#:22 R.Time:31.5(Scan#:3476)



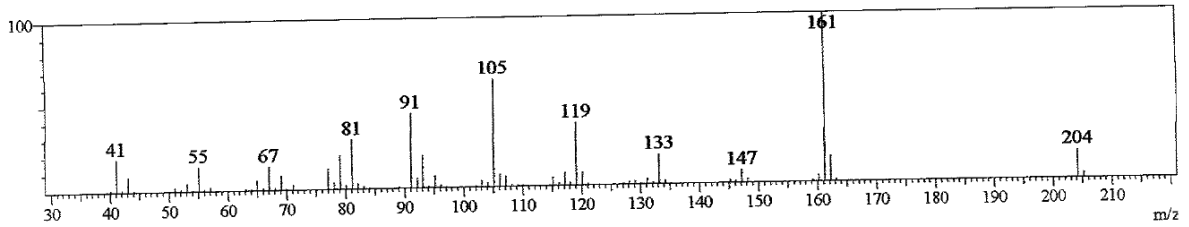
Line#:23 R.Time:32.3(Scan#:3576)



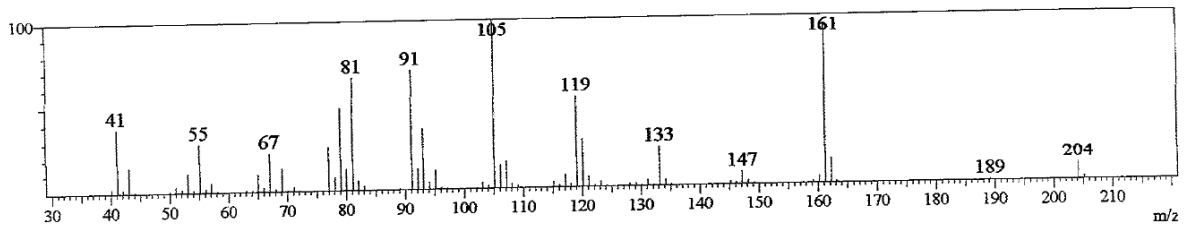
Line#:24 R.Time:33.4(Scan#:3703)



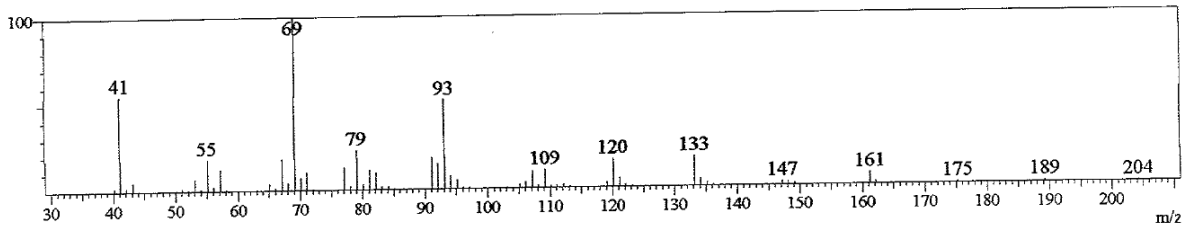
Line#:25 R.Time:33.7(Scan#:3743)



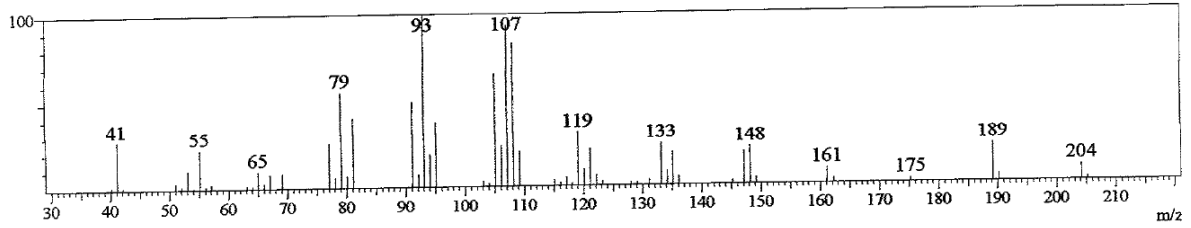
Line#:26 R.Time:34.7(Scan#:3862)



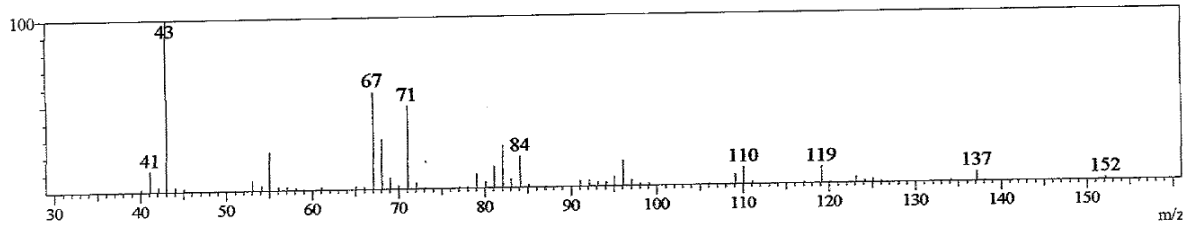
Line#:27 R.Time:34.8(Scan#:3877)



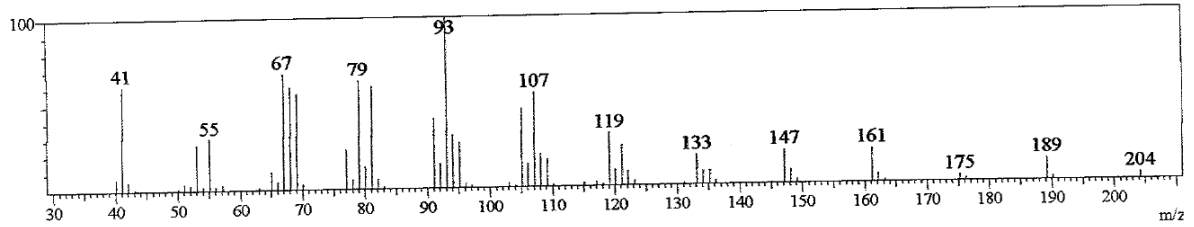
Line#:28 R.Time:35.7(Scan#:3985)



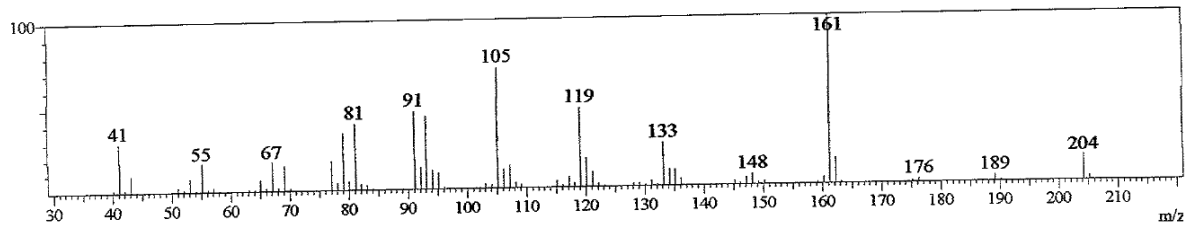
Line#:29 R.Time:35.8(Scan#:3997)



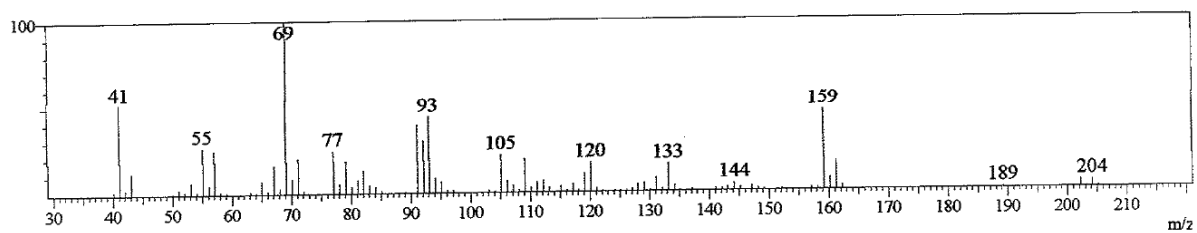
Line#:30 R.Time:36.0(Scan#:4016)



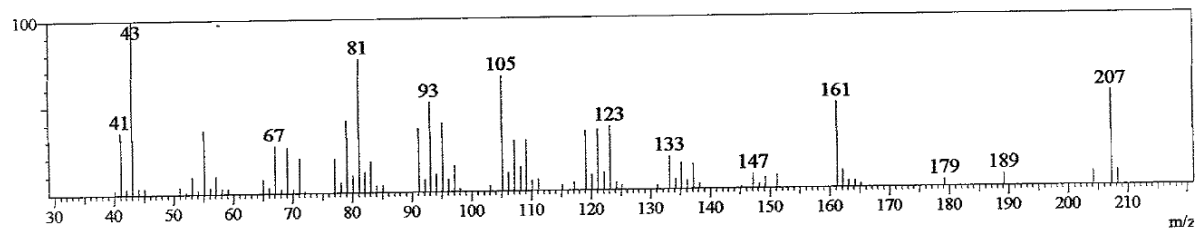
Line#:31 R.Time:36.3(Scan#:4053)



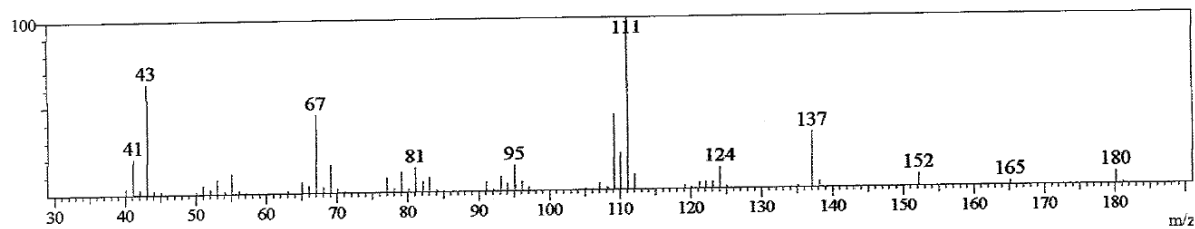
Line#:32 R.Time:36.7(Scan#:4104)



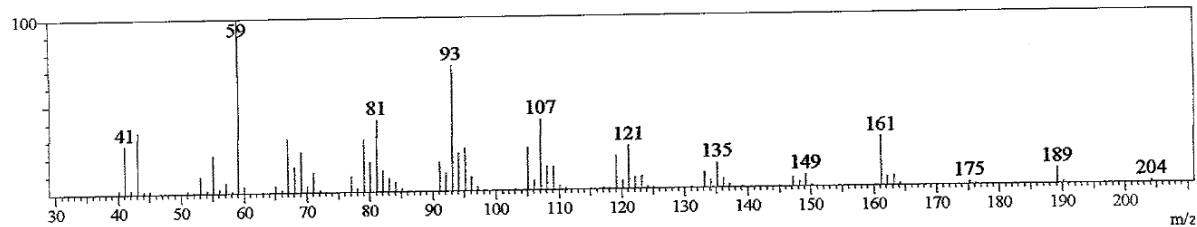
Line#:33 R.Time:37.3(Scan#:4172)



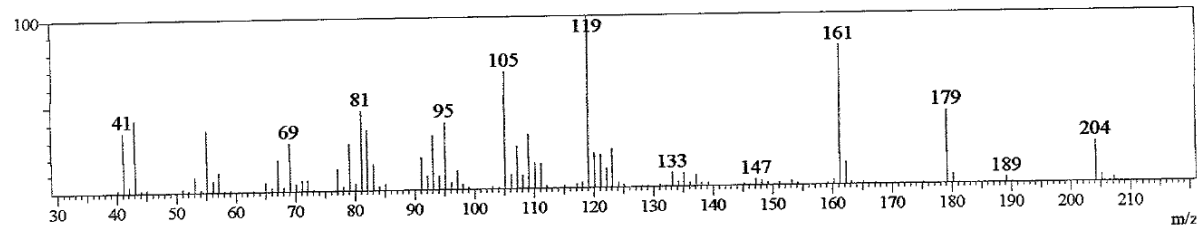
Line#:34 R.Time:37.8(Scan#:4236)



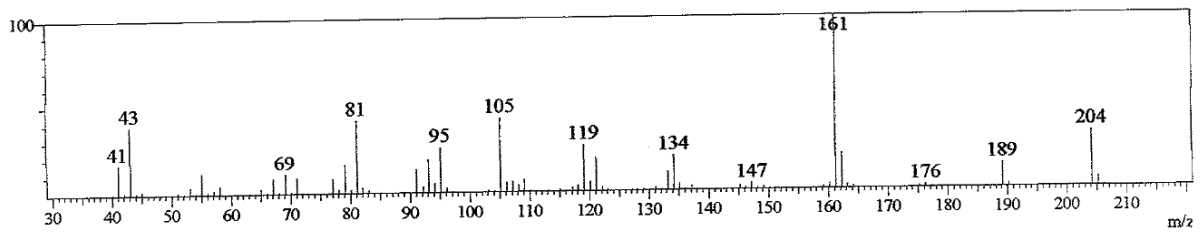
Line#:35 R.Time:38.2(Scan#:4289)



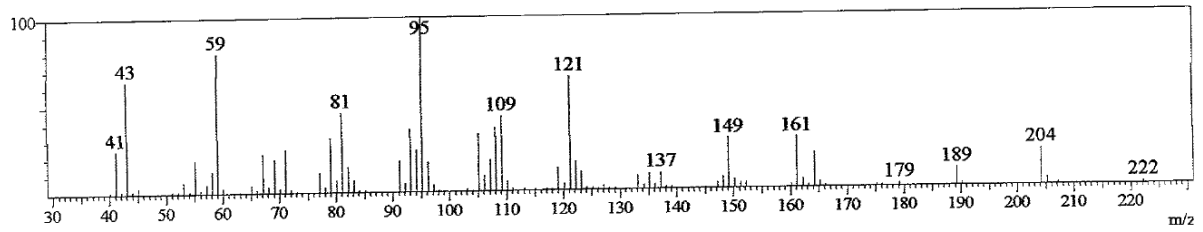
Line#:36 R.Time:40.9(Scan#:4608)



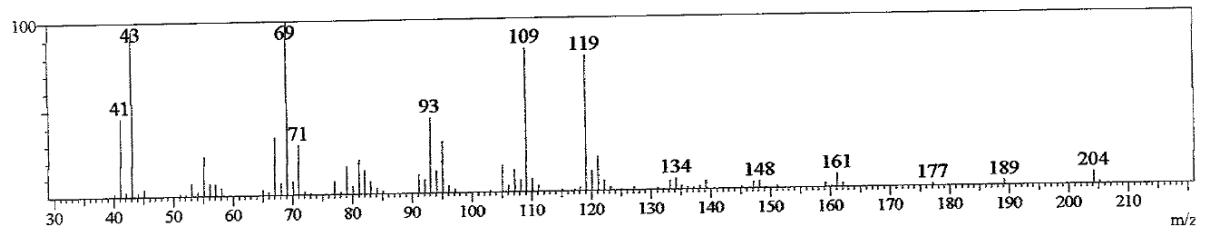
Line#:37 R.Time:41.8(Scan#:4717)



Line#:38 R.Time:42.1(Scan#:4752)

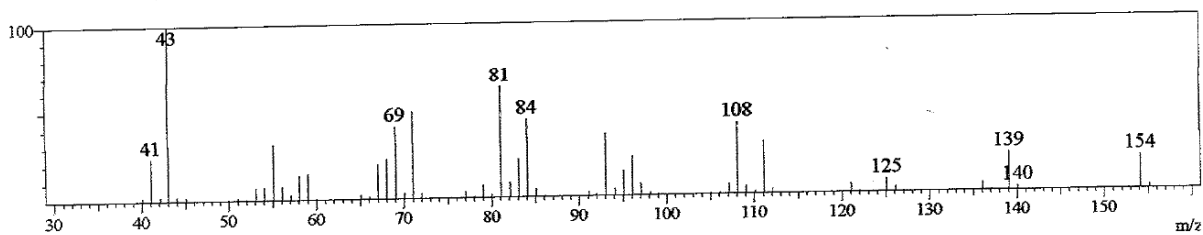


Line#:39 R.Time:42.7(Scan#:4823)

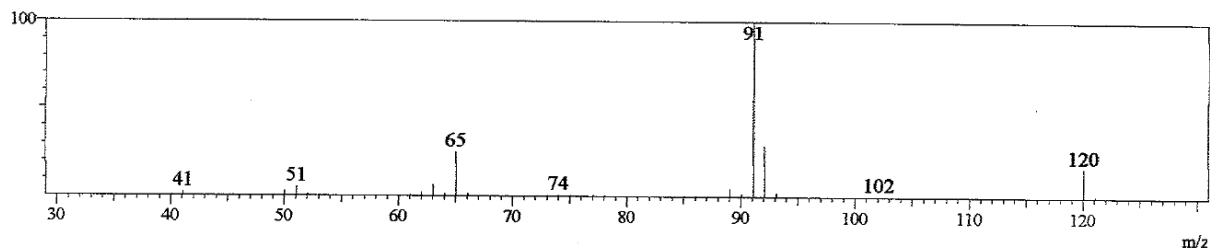


Anexo 38. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $50\text{Kg}\cdot\text{NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$

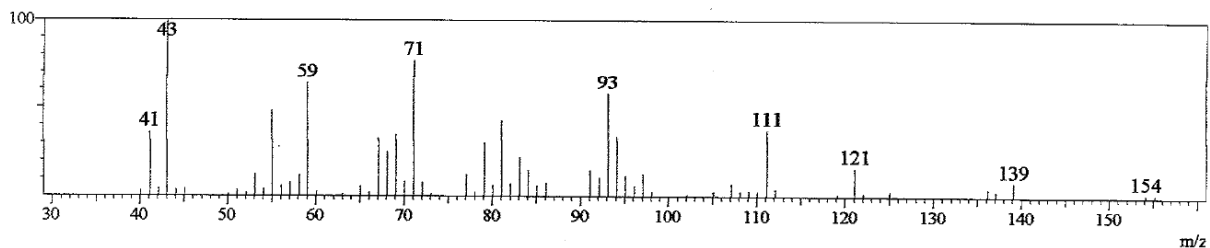
Line#1 R.Time:9.3(Scan#:823)



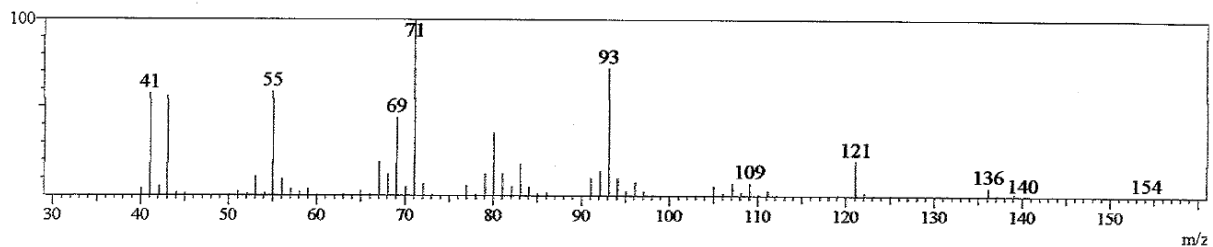
Line#2 R.Time:10.5(Scan#:956)



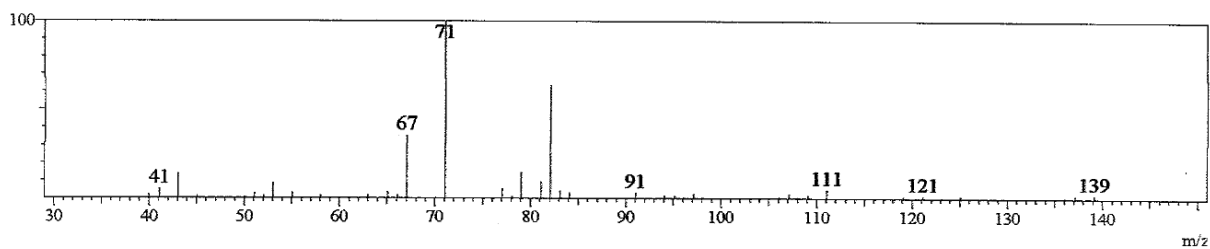
Line#3 R.Time:11.4(Scan#:1069)



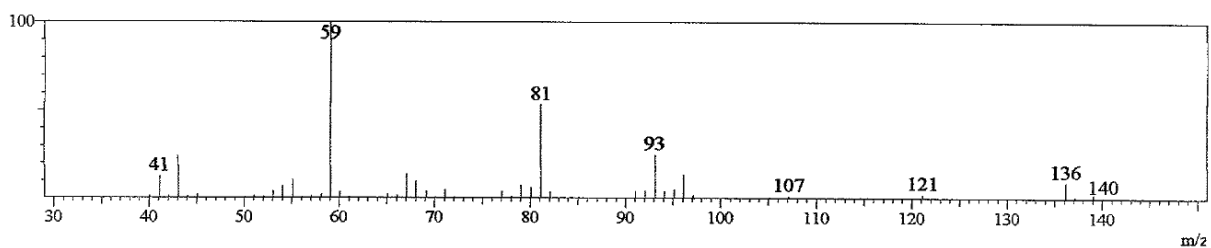
Line#4 R.Time:13.5(Scan#:1322)



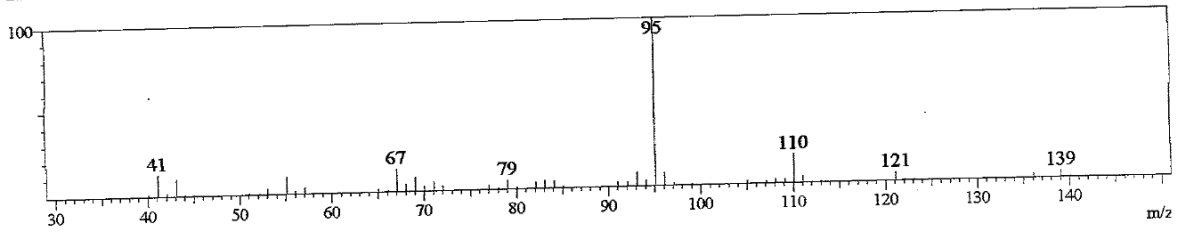
Line#5 R.Time:13.6(Scan#:1329)



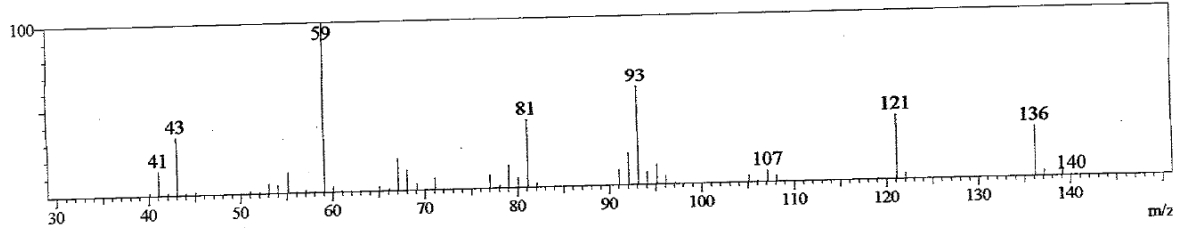
Line#6 R.Time:17.2(Scan#:1759)



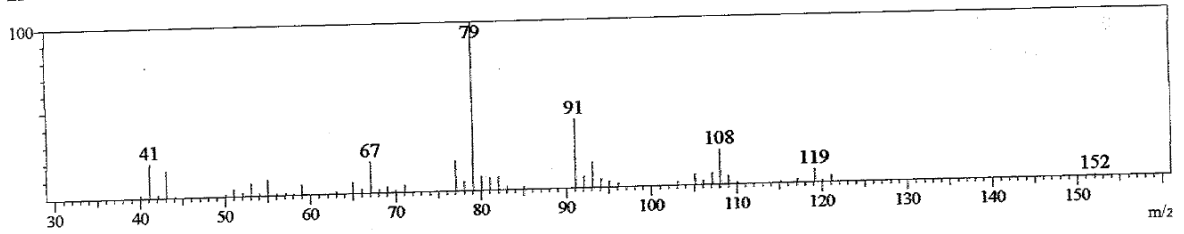
Line#:7 R.Time:17.3(Scan#:1777)



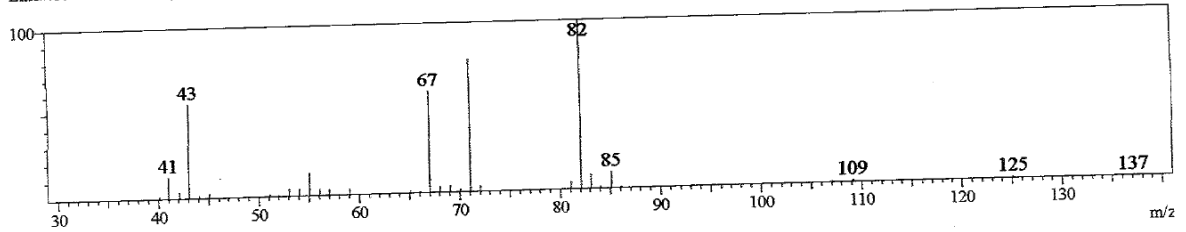
Line#:8 R.Time:18.7(Scan#:1940)



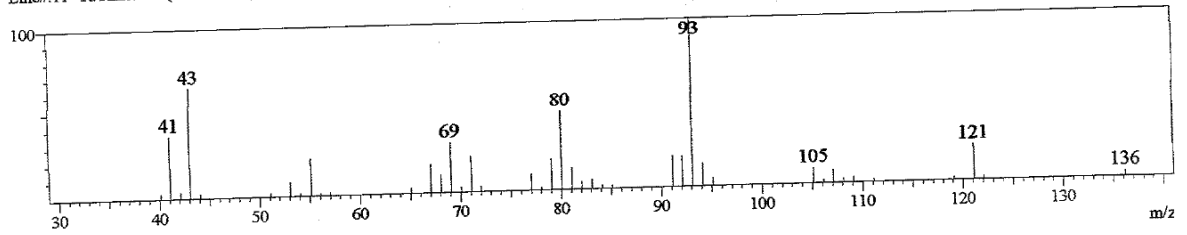
Line#:9 R.Time:18.9(Scan#:1970)



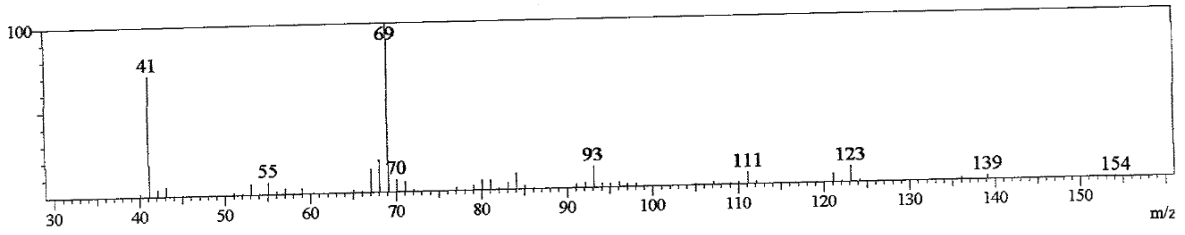
Line#:10 R.Time:19.1(Scan#:1994)



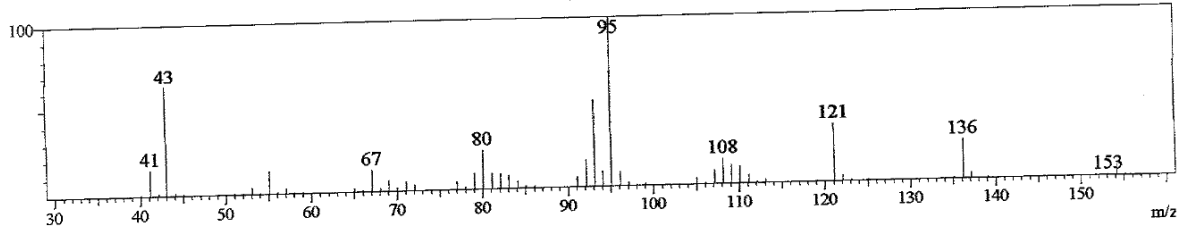
Line#:11 R.Time:21.8(Scan#:2314)



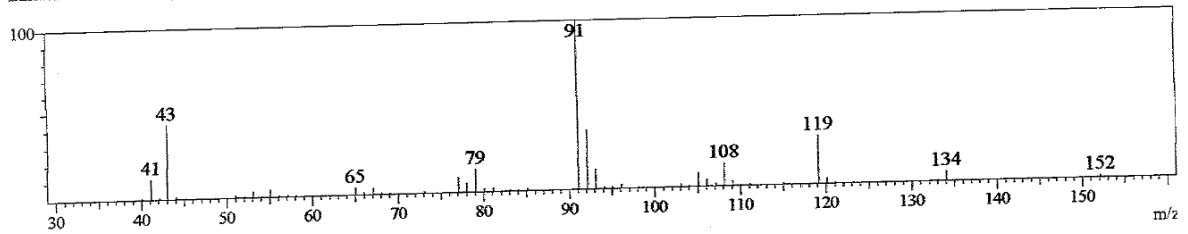
Line#:12 R.Time:22.7(Scan#:2423)



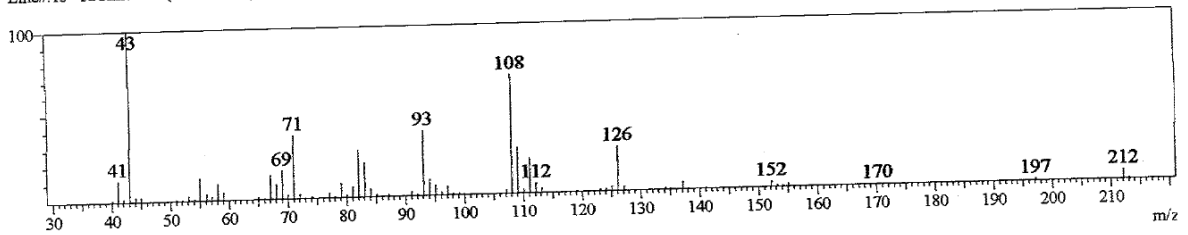
Line#:13 R.Time:23.9(Scan#:2571)



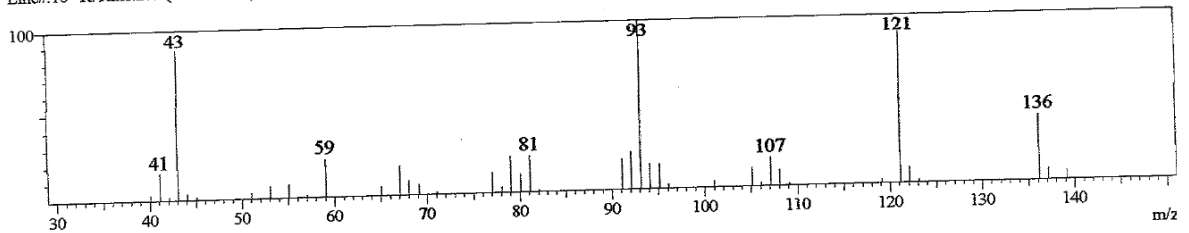
Line#:14 R.Time:26.4(Scan#:2871)



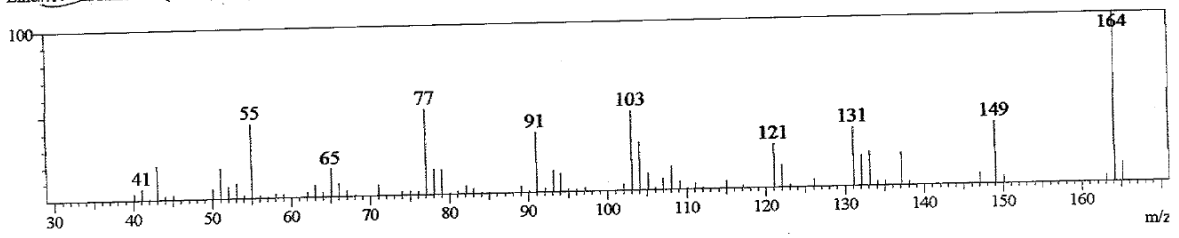
Line#:15 R.Time:27.5(Scan#:3003)



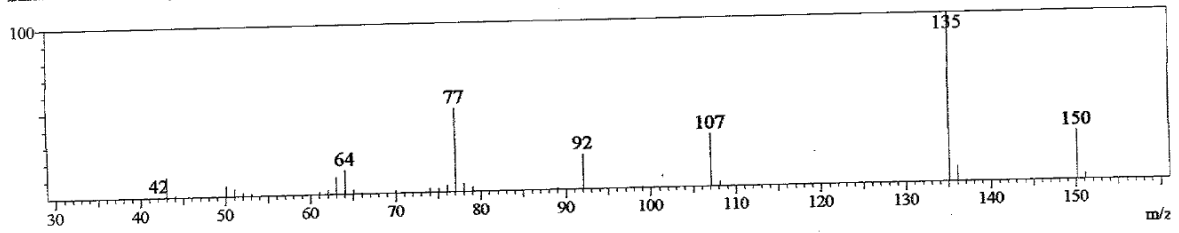
Line#:16 R.Time:27.8(Scan#:3040)



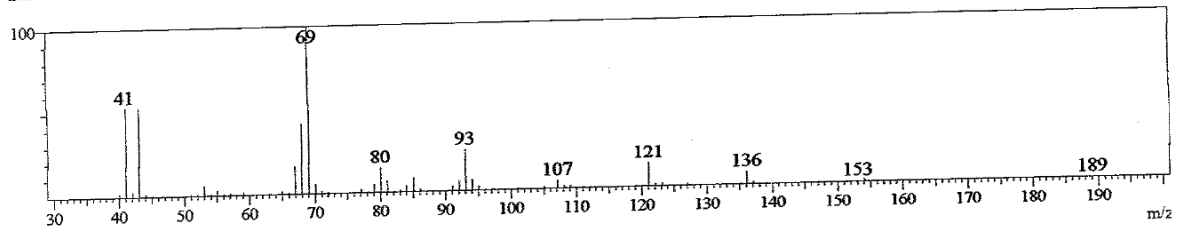
Line#:17 R.Time:28.8(Scan#:3162)



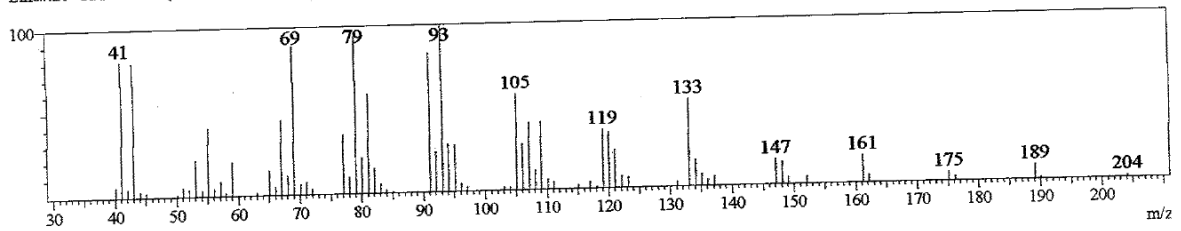
Line#:18 R.Time:29.1(Scan#:3193)



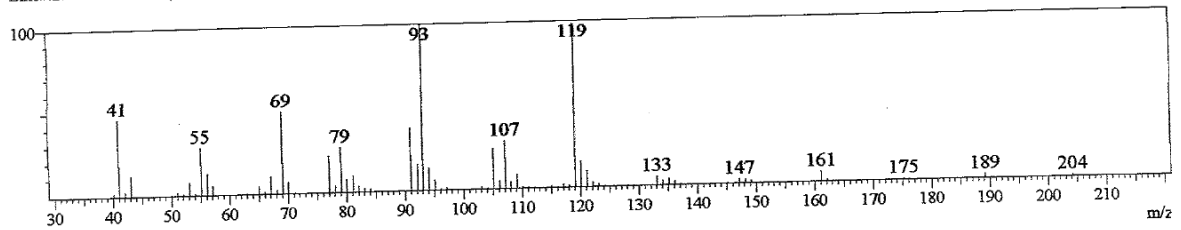
Line#:19 R.Time:29.9(Scan#:3285)



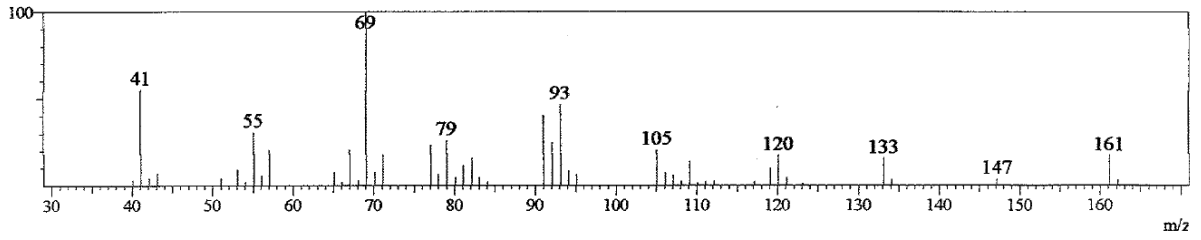
Line#:20 R.Time:31.5(Scan#:3476)



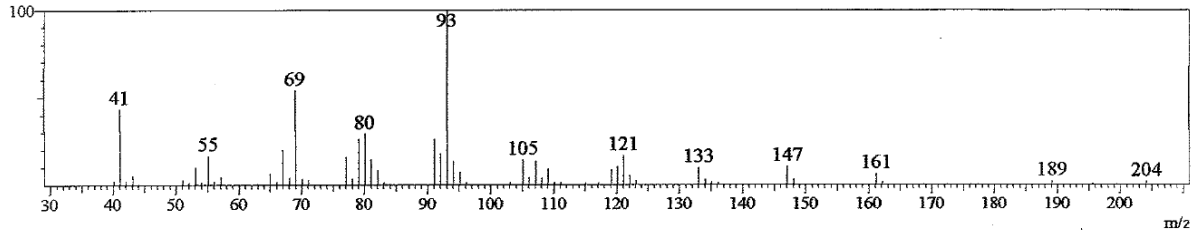
Line#:21 R.Time:32.3(Scan#:3572)



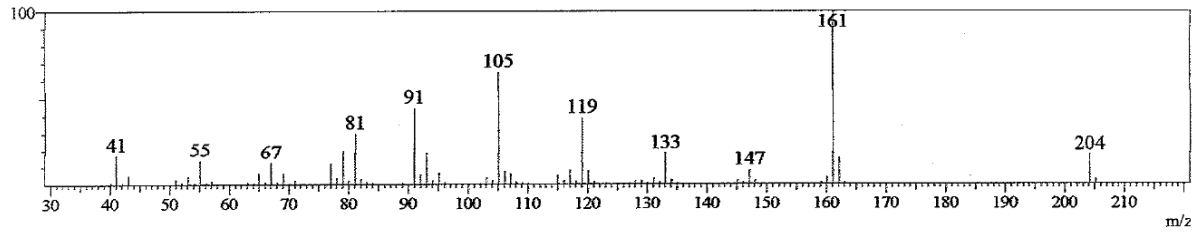
Line#:22 R.Time:32.6(Scan#:3618)



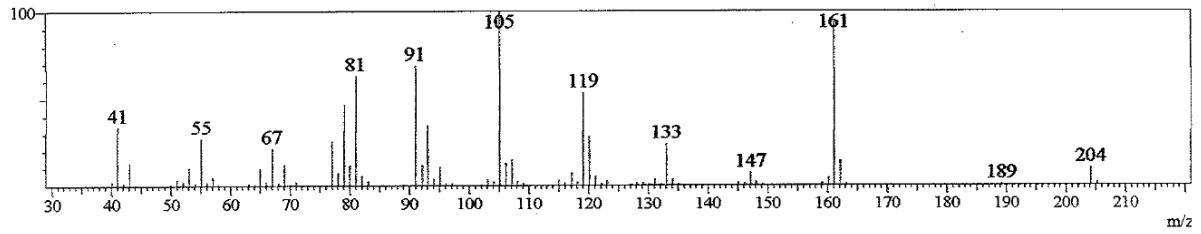
Line#:23 R.Time:33.4(Scan#:3703)



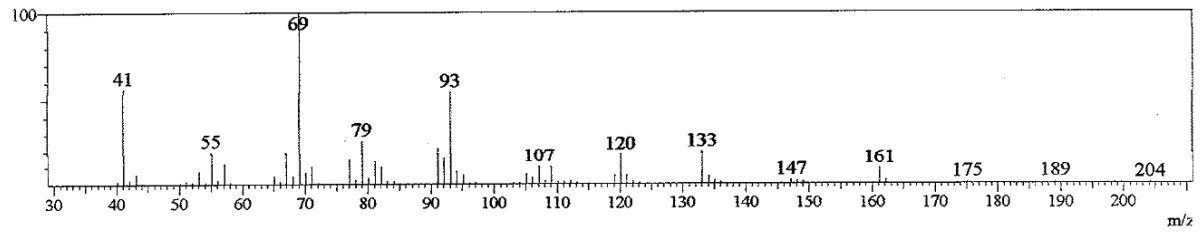
Line#:24 R.Time:33.7(Scan#:3743)



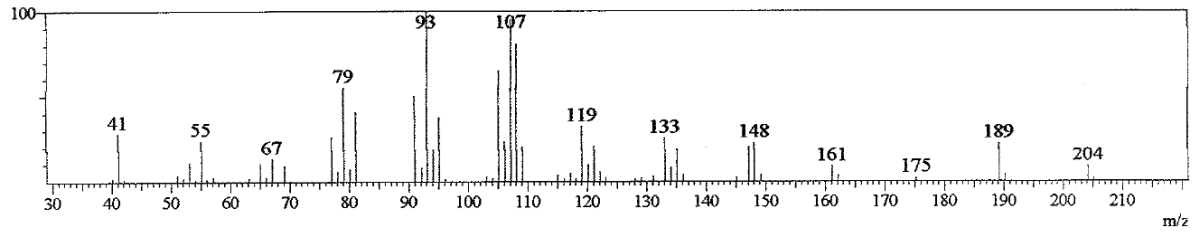
Line#:25 R.Time:34.7(Scan#:3861)



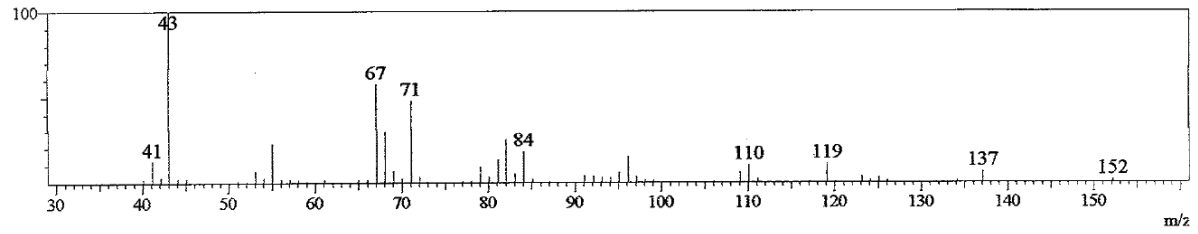
Line#:26 R.Time:34.8(Scan#:3877)



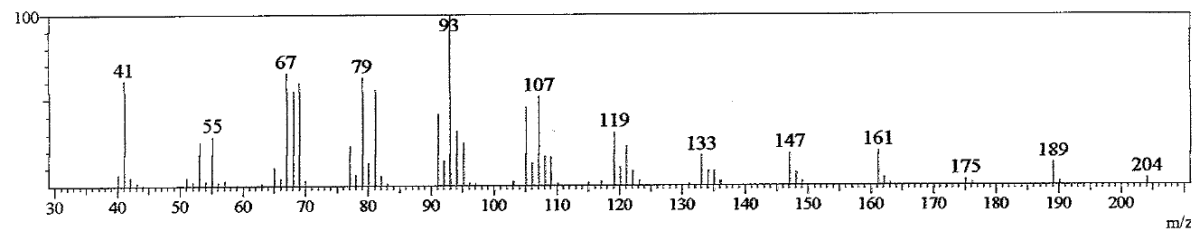
Line#:27 R.Time:35.7(Scan#:3985)



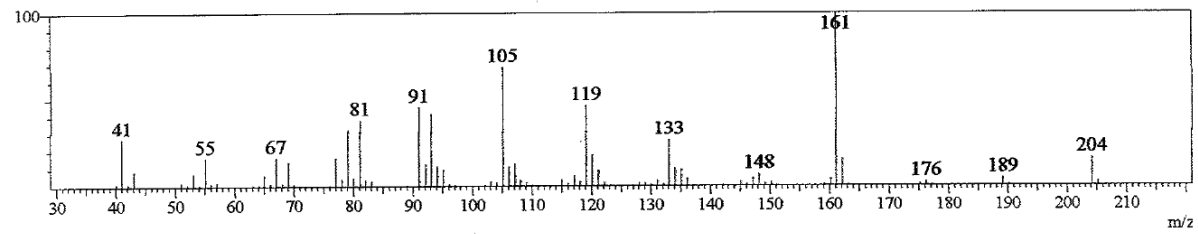
Line#:28 R.Time:35.8(Scan#:3997)



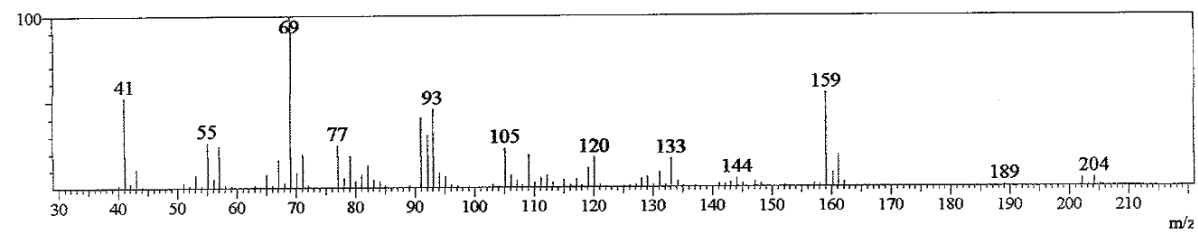
Line#:29 R.Time:36.0(Scan#:4016)



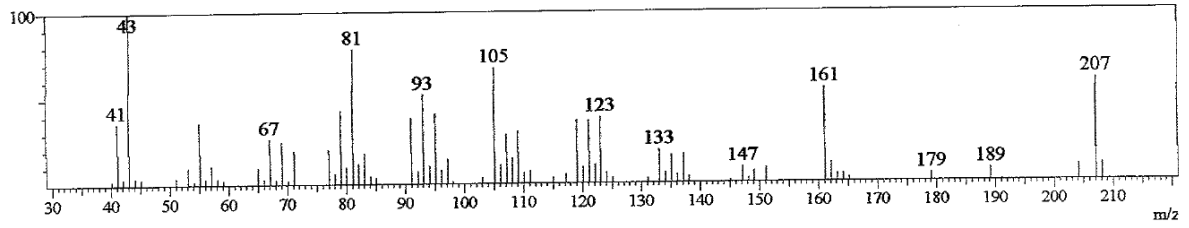
Line#:30 R.Time:36.3(Scan#:4051)



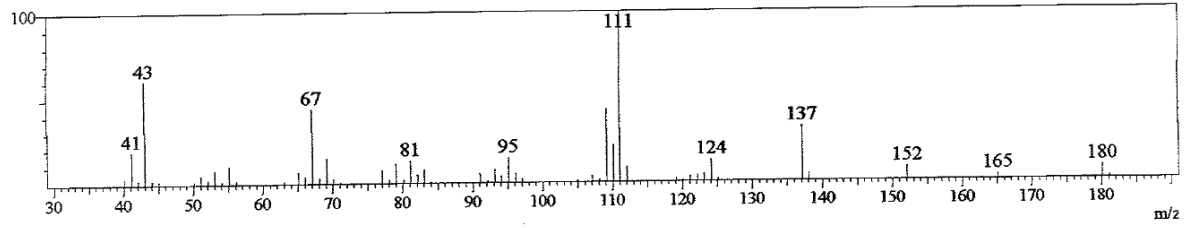
Line#:31 R.Time:36.7(Scan#:4103)



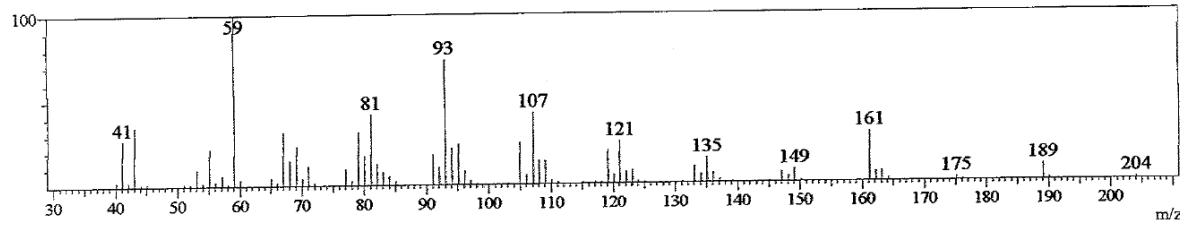
Line#:32 R.Time:37.3(Scan#:4171)



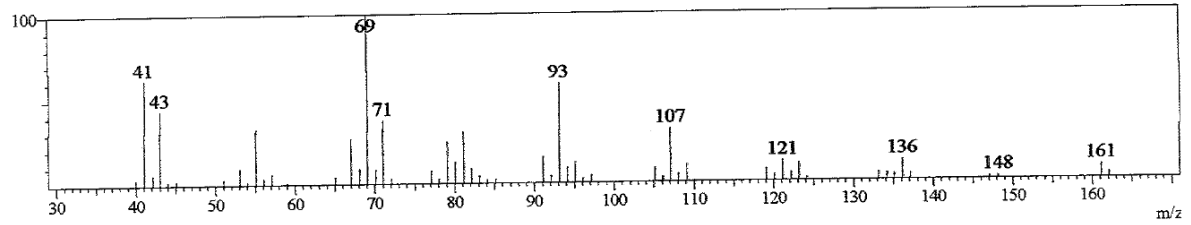
Line#:33 R.Time:37.8(Scan#:4235)



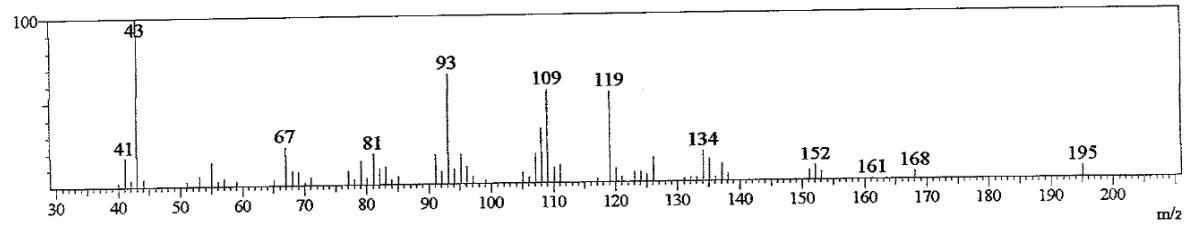
Line#:34 R.Time:38.2(Scan#:4289)



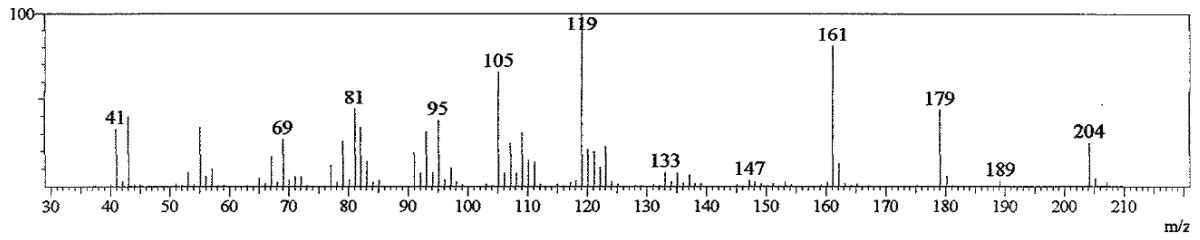
Line#:35 R.Time:38.6(Scan#:4332)



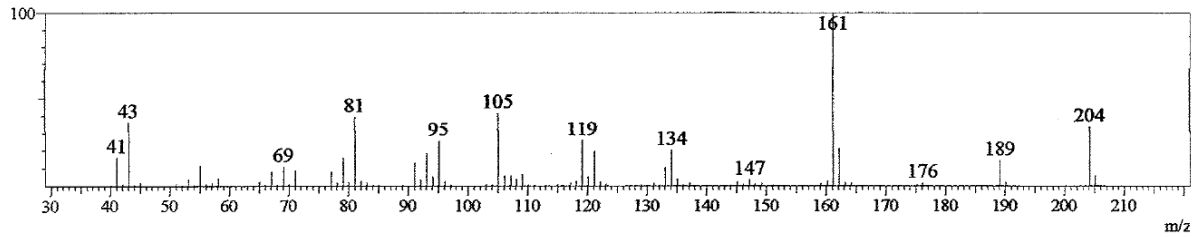
Line#:36 R.Time:40.7(Scan#:4586)



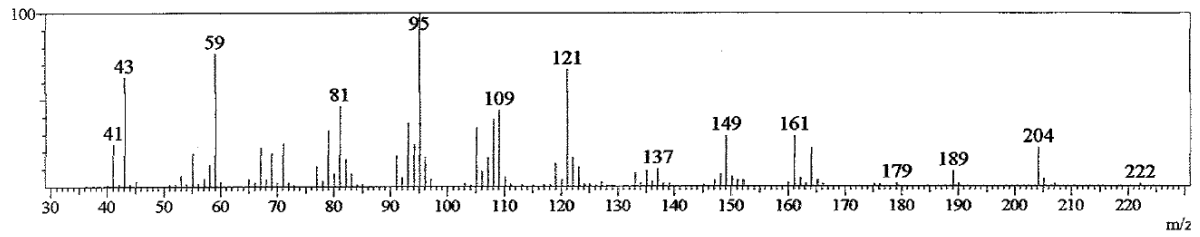
Line#:37 R.Time:40.9(Scan#:4607)



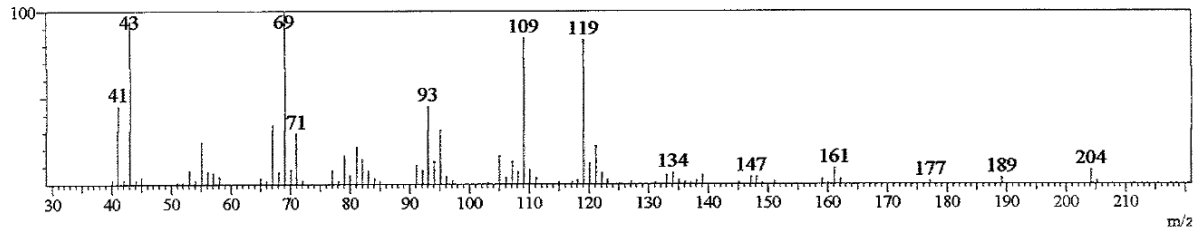
Line#:38 R.Time:41.8(Scan#:4716)



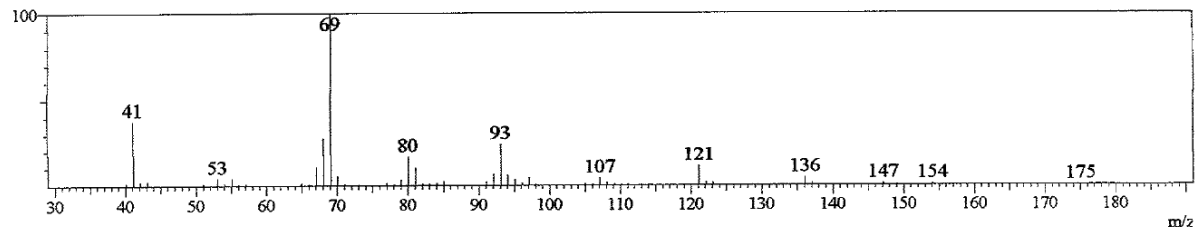
Line#:39 R.Time:42.1(Scan#:4751)



Line#:40 R.Time:42.7(Scan#:4823)

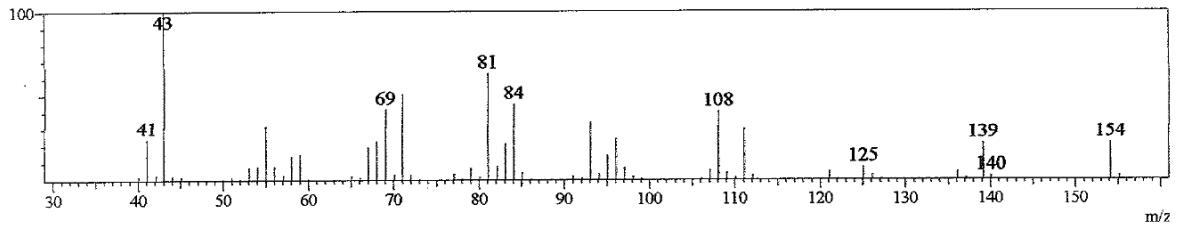


Line#:41 R.Time:43.7(Scan#:4944)

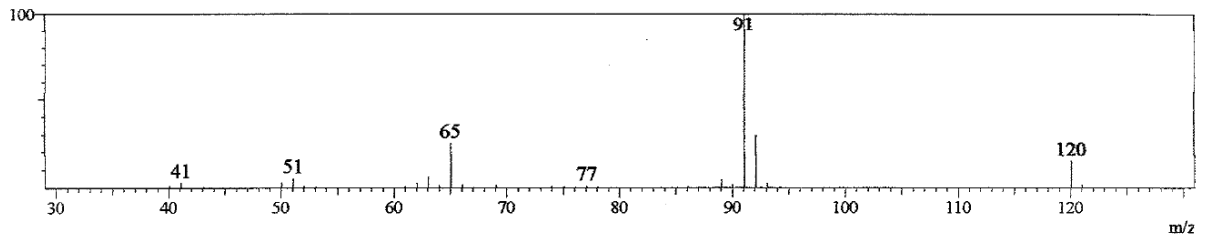


Anexo 39. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $100\text{Kg}\cdot\text{NO}_3^- \text{ha}^{-1}$

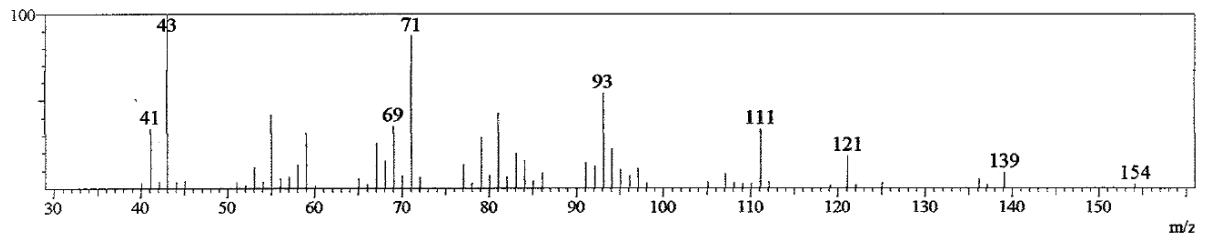
Line#1 R.Time:9.3(Scan#:822)



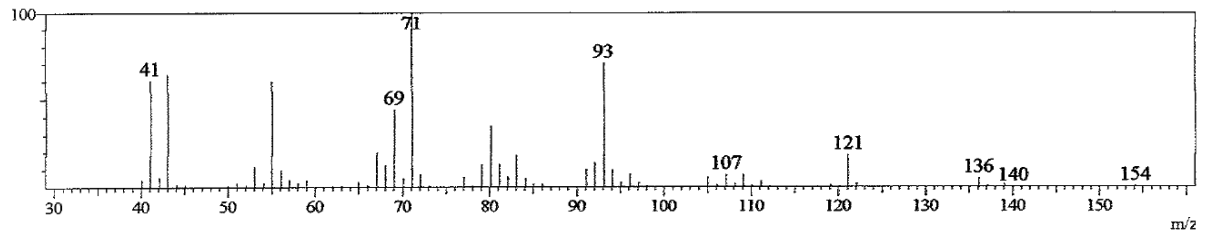
Line#2 R.Time:10.5(Scan#:956)



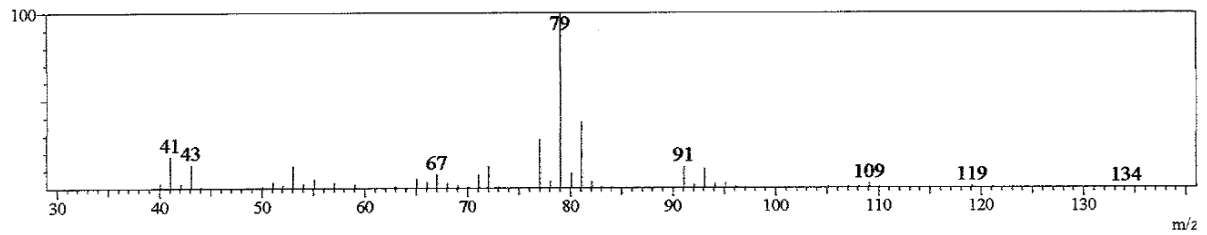
Line#3 R.Time:11.4(Scan#:1070)



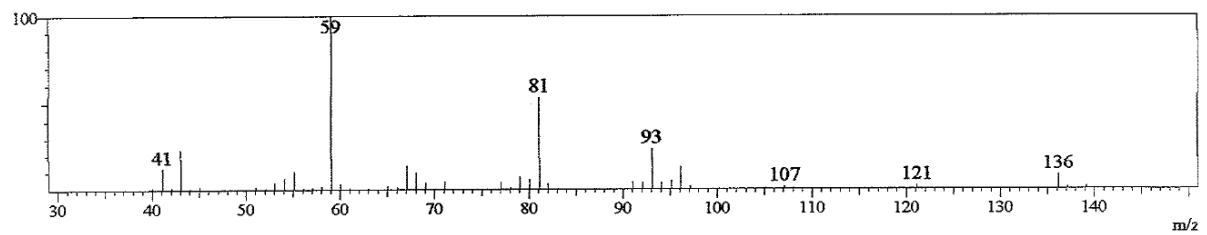
Line#4 R.Time:13.6(Scan#:1328)



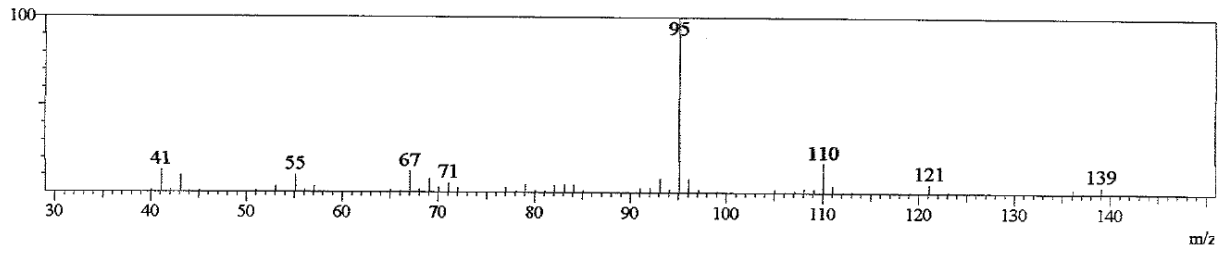
Line#5 R.Time:15.2(Scan#:1521)



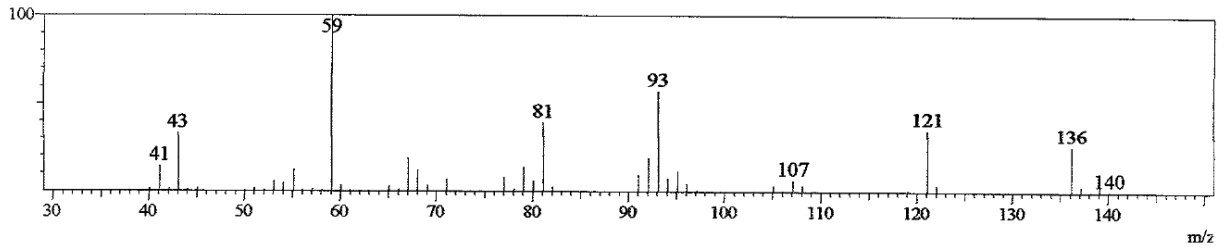
Line#6 R.Time:17.1(Scan#:1758)



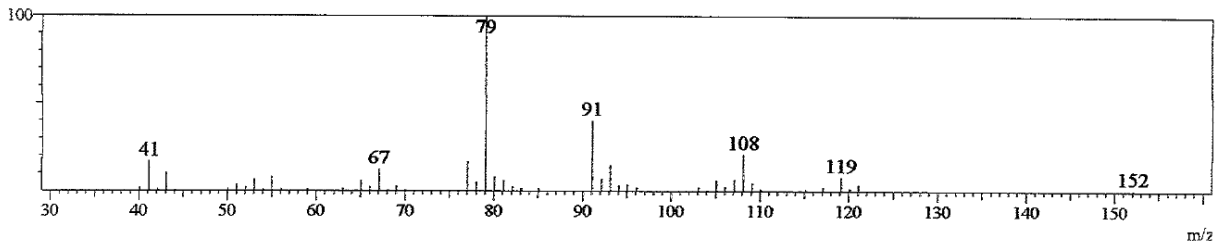
Line#:7 R.Time:17.3(Scan#:1775)



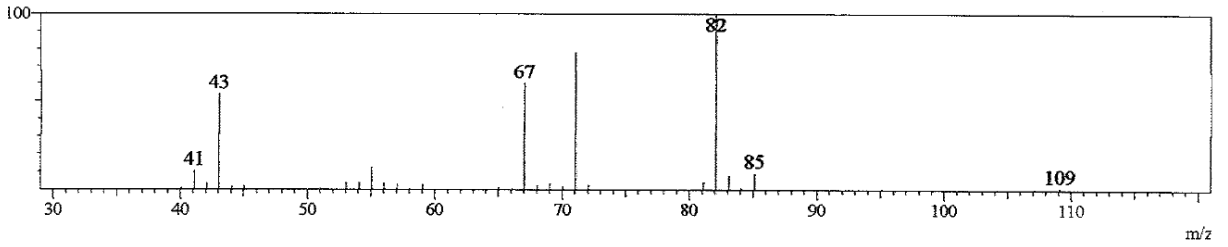
Line#:8 R.Time:18.6(Scan#:1935)



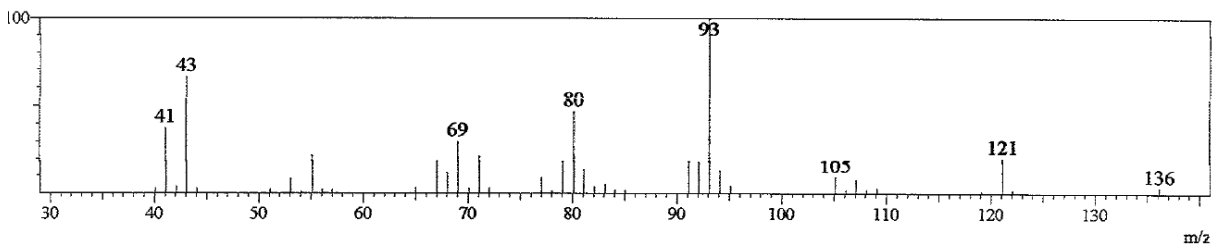
Line#:9 R.Time:18.9(Scan#:1967)



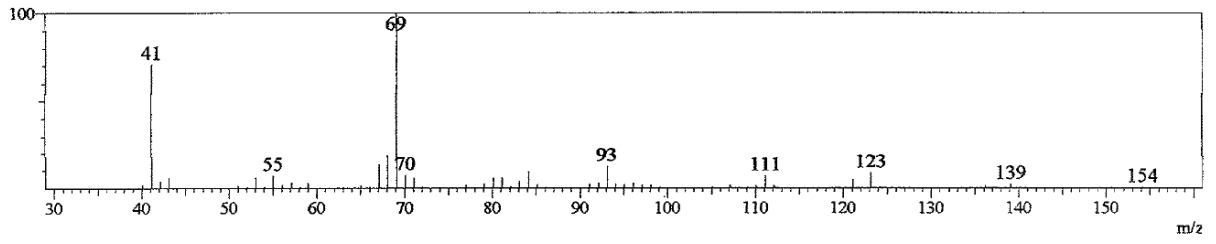
Line#:10 R.Time:19.0(Scan#:1986)



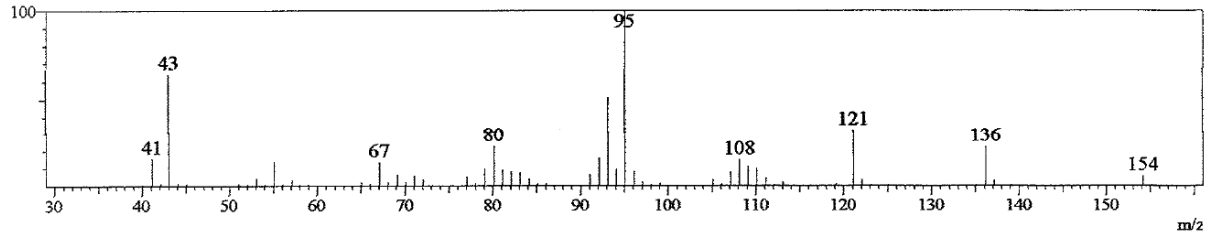
Line#:11 R.Time:21.8(Scan#:2313)



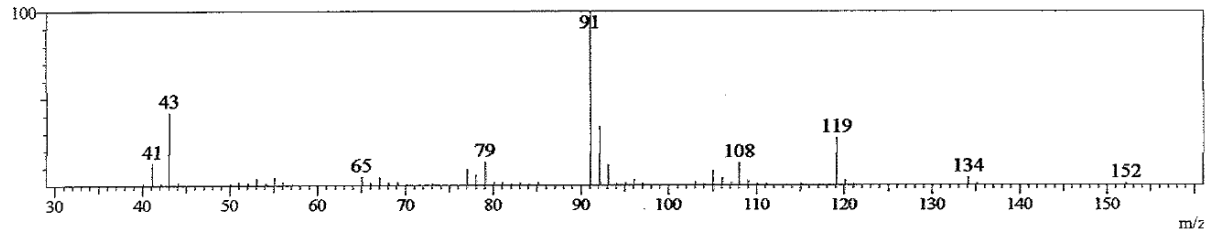
Line# 12 R. Time: 22.6(Scan#: 2417)



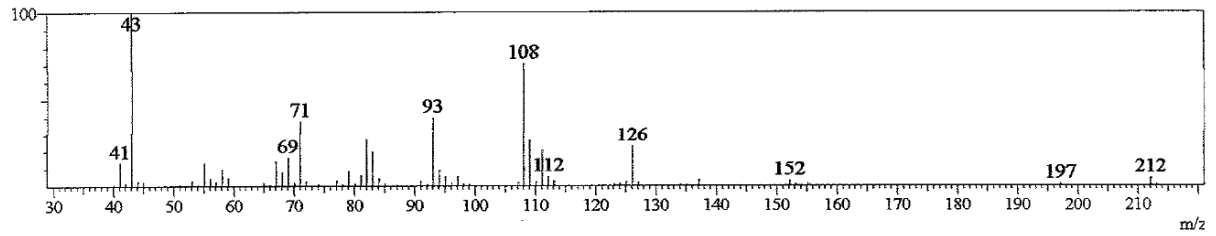
Line# 13 R. Time: 23.9(Scan#: 2569)



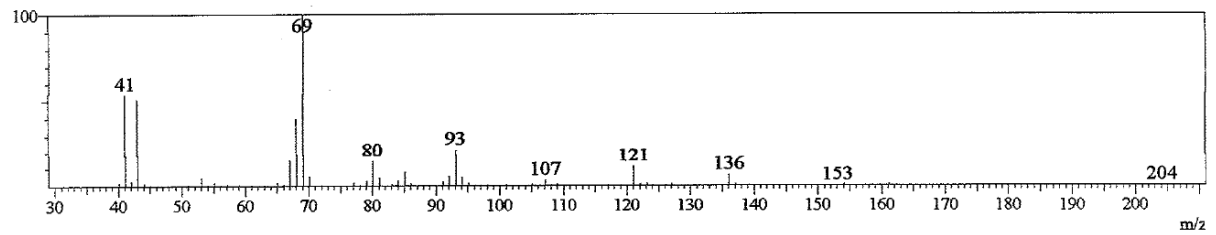
Line# 14 R. Time: 26.4(Scan#: 2870)



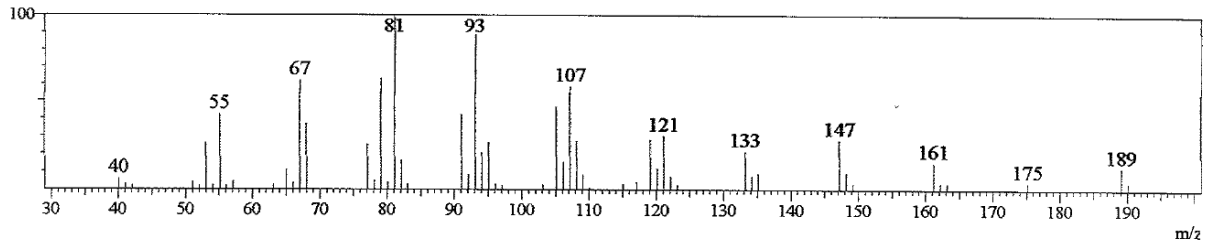
Line# 15 R. Time: 27.5(Scan#: 3001)



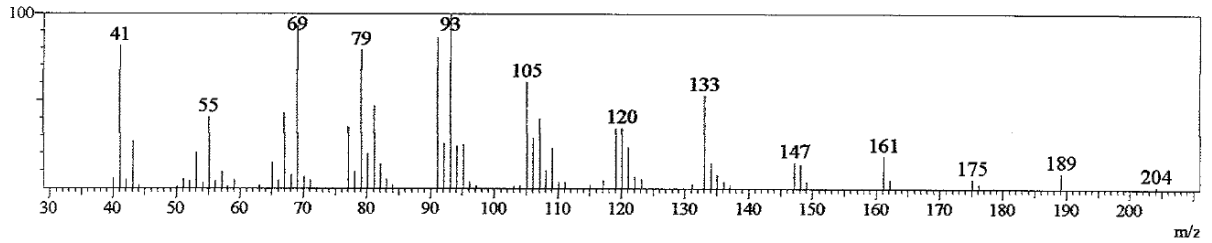
Line# 16 R. Time: 29.8(Scan#: 3276)



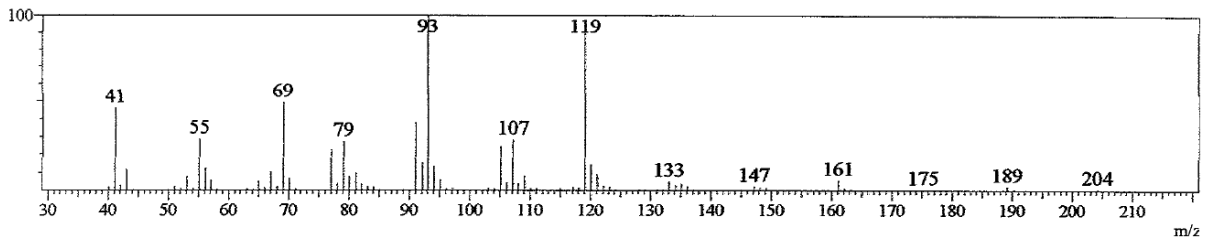
Line#:17 R.Time:29.9(Scan#:3291)



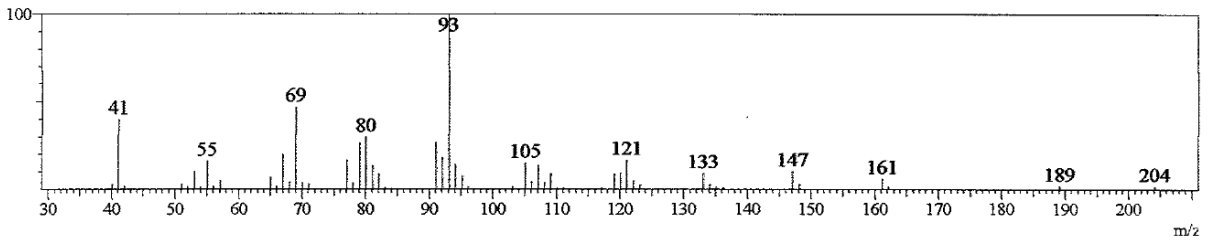
Line#:18 R.Time:31.4(Scan#:3473)



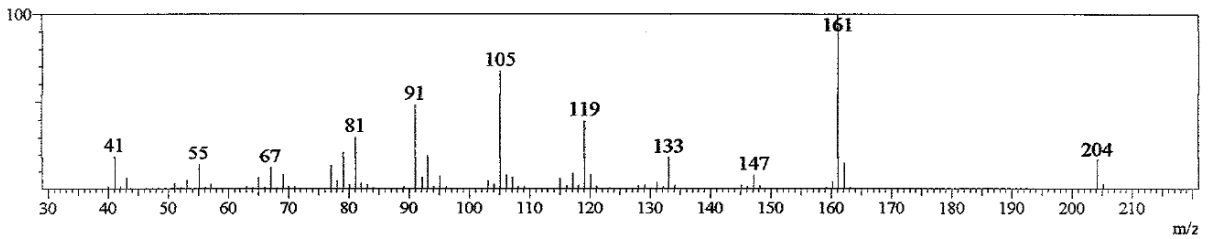
Line#:19 R.Time:32.2(Scan#:3568)



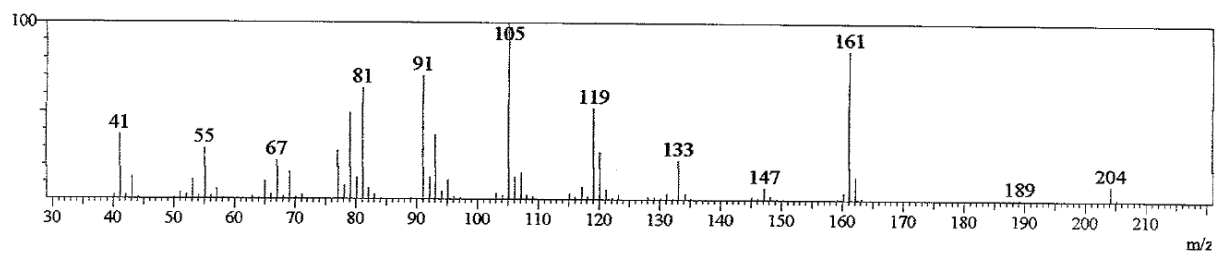
Line#:20 R.Time:33.3(Scan#:3701)



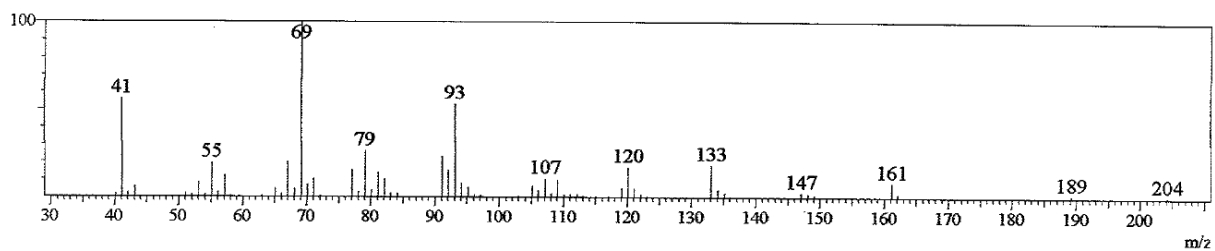
Line#:21 R.Time:33.7(Scan#:3741)



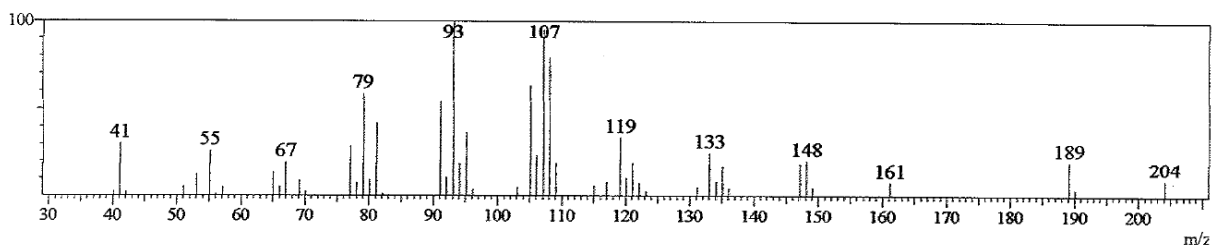
Line#:22 R.Time:34.6(Scan#:3858)



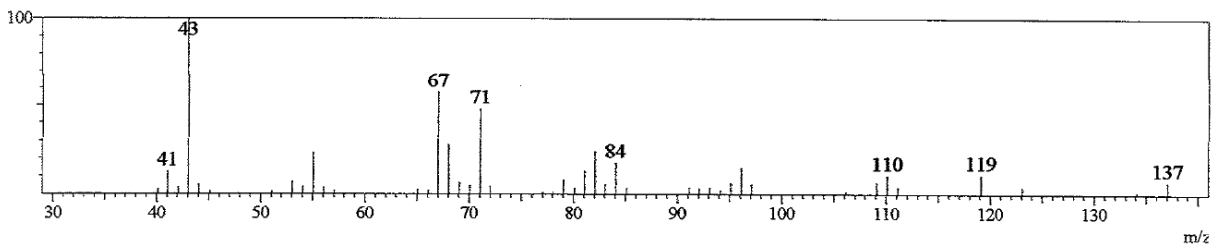
Line#:23 R.Time:34.8(Scan#:3875)



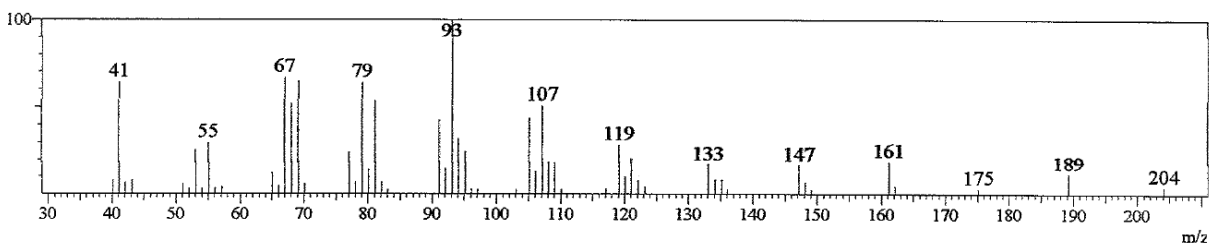
Line#:24 R.Time:35.7(Scan#:3983)



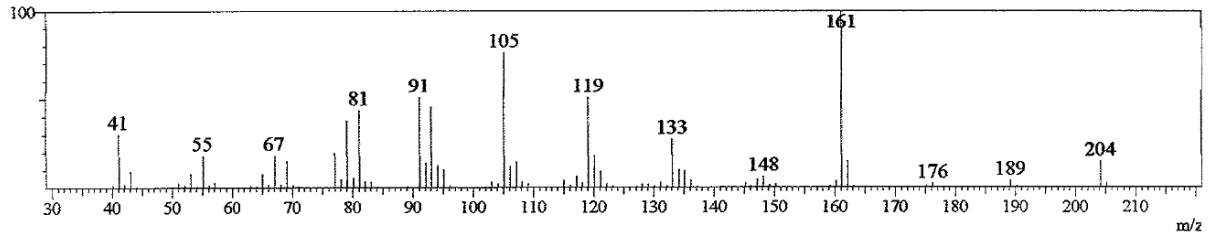
Line#:25 R.Time:35.8(Scan#:3997)



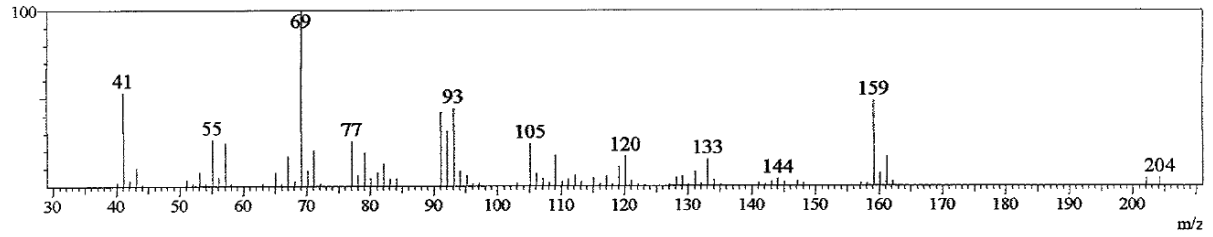
Line#:26 R.Time:35.9(Scan#:4014)



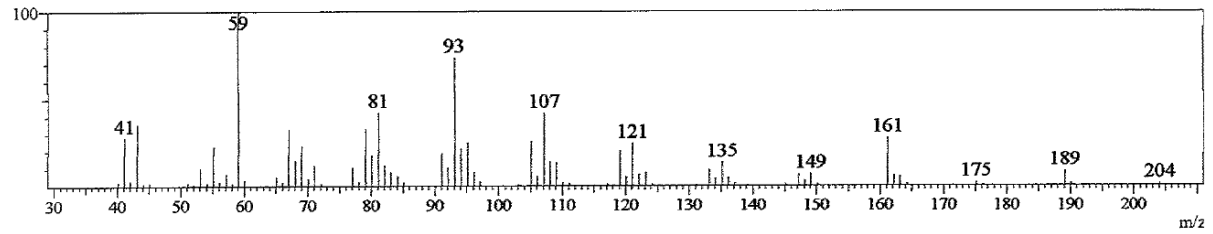
Line#:27 R.Time:36.2(Scan#:4048)



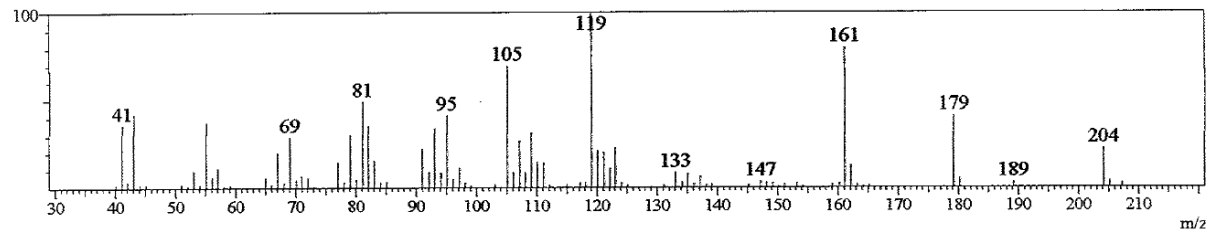
Line#:28 R.Time:36.7(Scan#:4102)



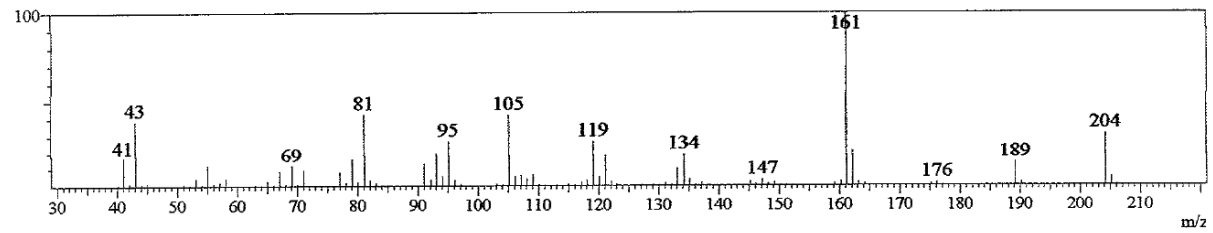
Line#:29 R.Time:38.2(Scan#:4287)



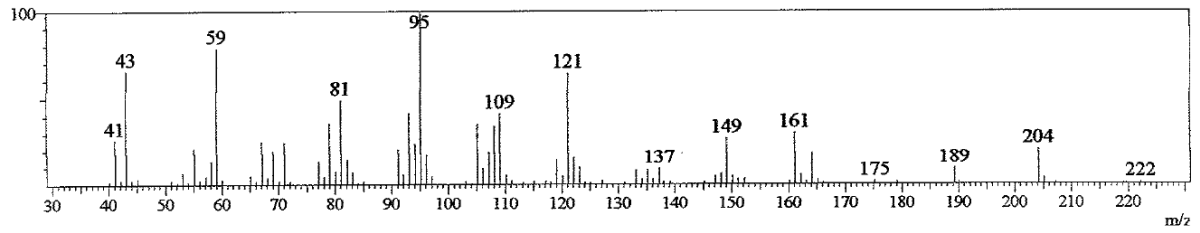
Line#:30 R.Time:40.9(Scan#:4606)



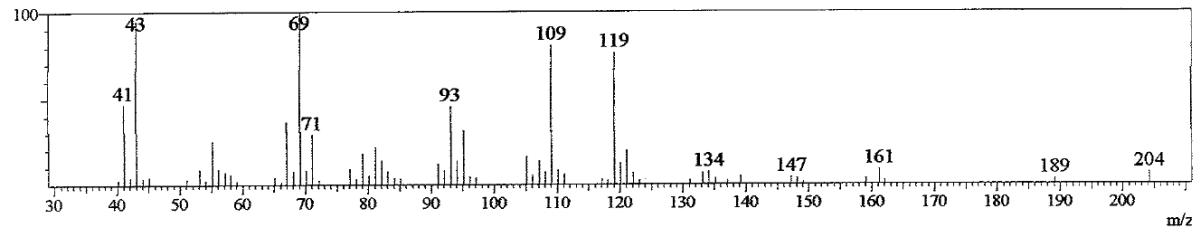
Line#:31 R.Time:41.8(Scan#:4711)



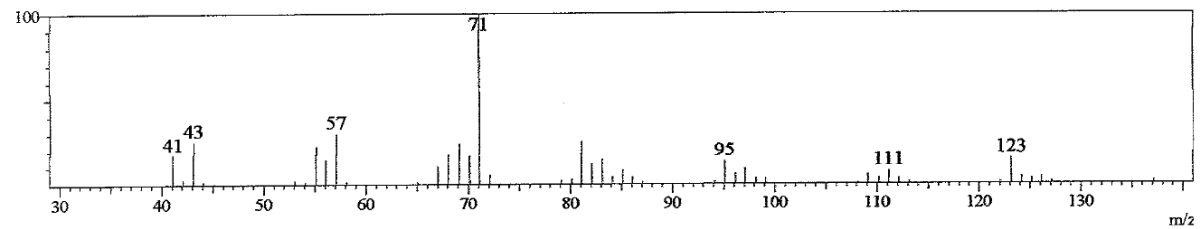
Line#:32 R.Time:42.1(Scan#:4750)



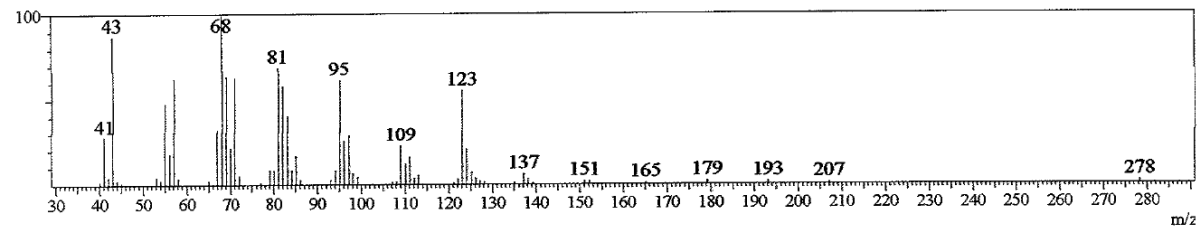
Line#:33 R.Time:42.7(Scan#:4823)



Line#:34 R.Time:47.2(Scan#:5359)

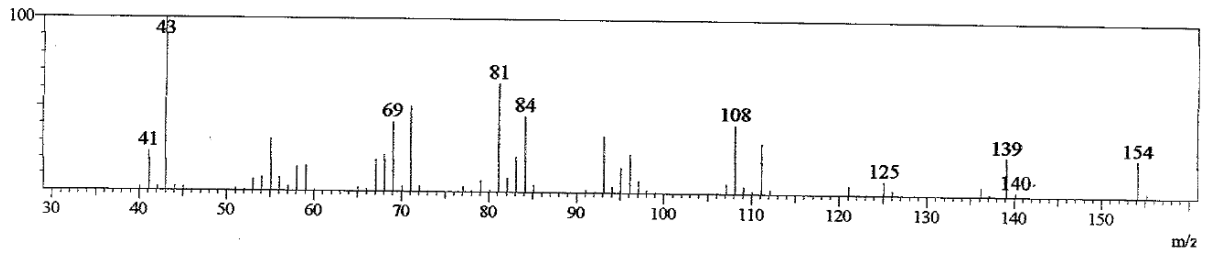


Line#:35 R.Time:47.8(Scan#:5432)

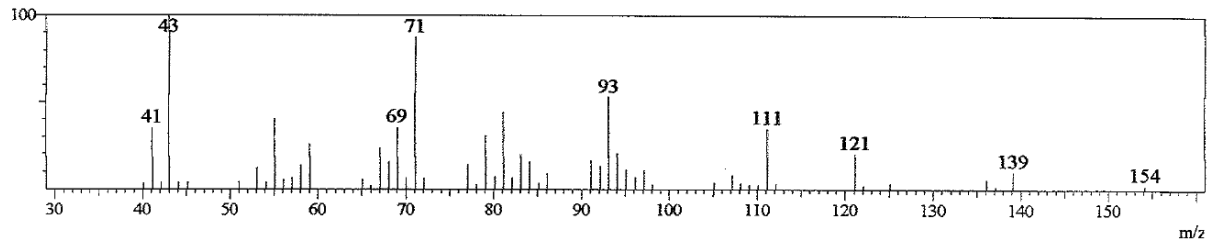


Anexo 40. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{ha}^{-1}$

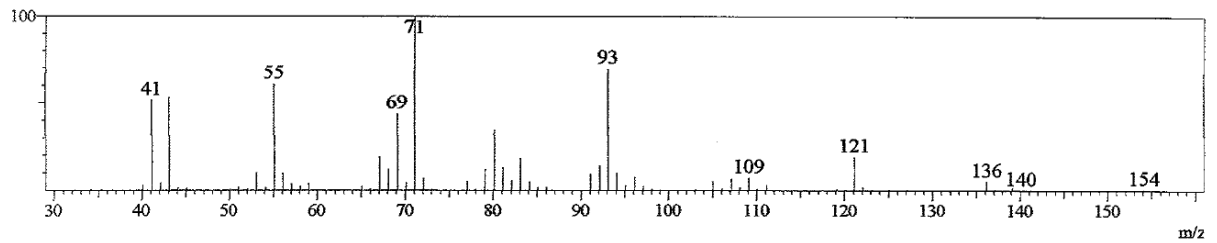
Line#1 R.Time:9.3(Scan#:822)



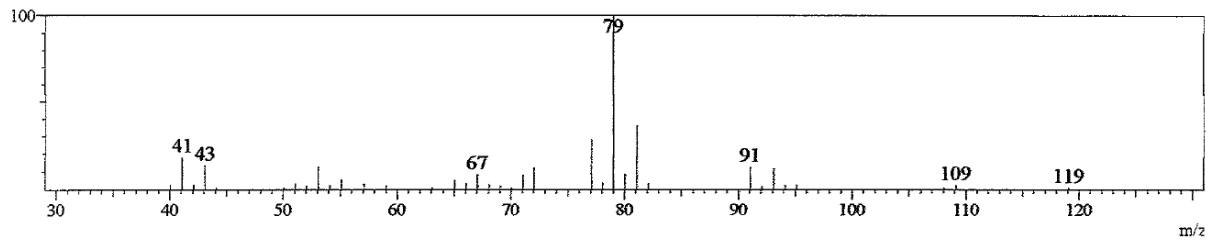
Line#2 R.Time:11.4(Scan#:1068)



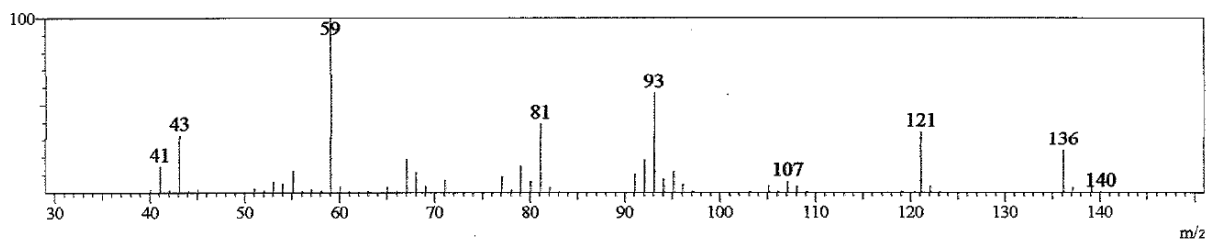
Line#3 R.Time:13.2(Scan#:1289)



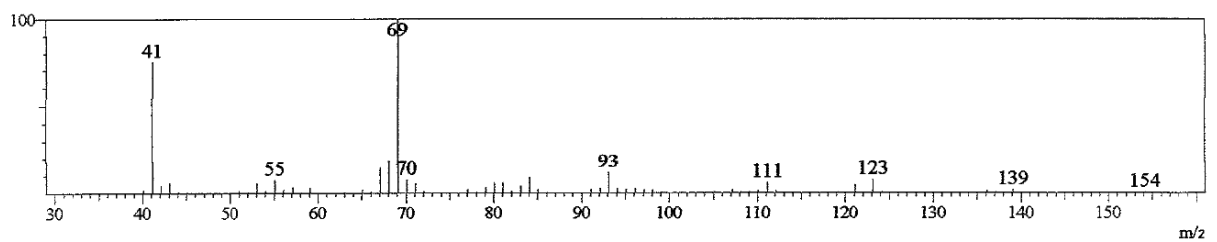
Line#4 R.Time:15.1(Scan#:1515)



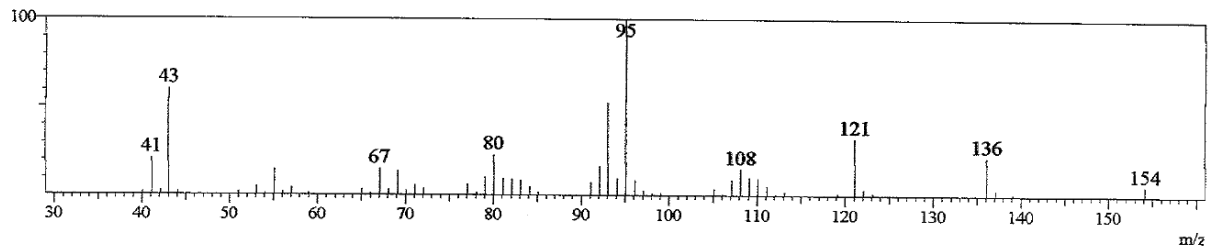
Line#5 R.Time:18.6(Scan#:1931)



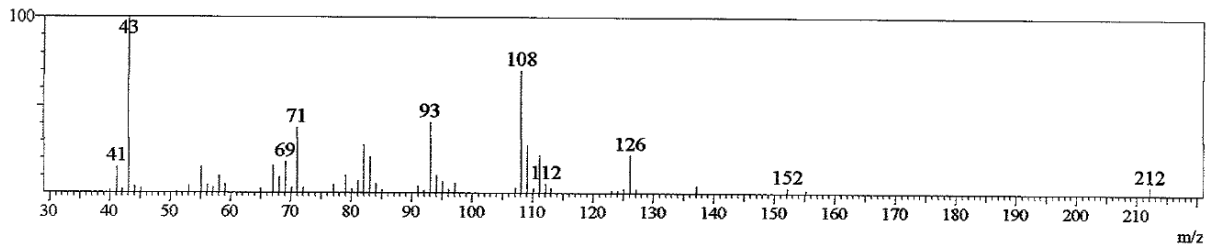
Line#6 R.Time:22.3(Scan#:2380)



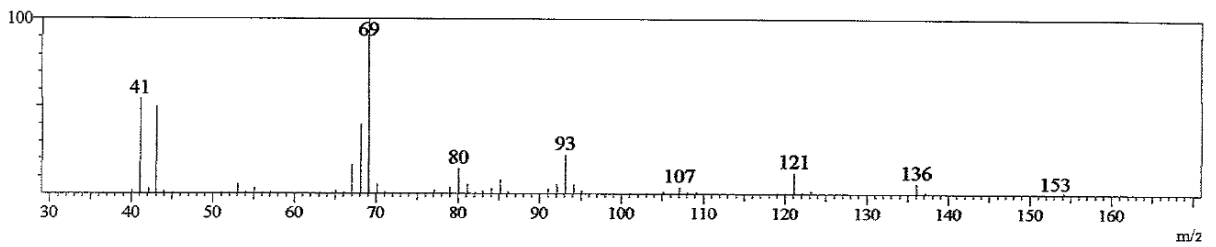
Line#:7 R.Time:23.9(Scan#:2564)



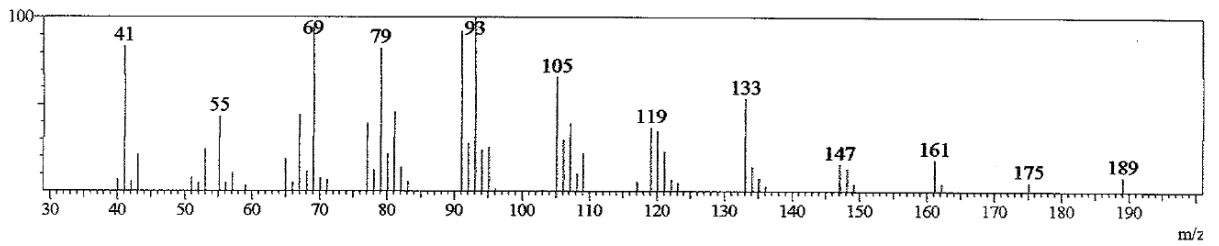
Line#:8 R.Time:27.5(Scan#:3000)



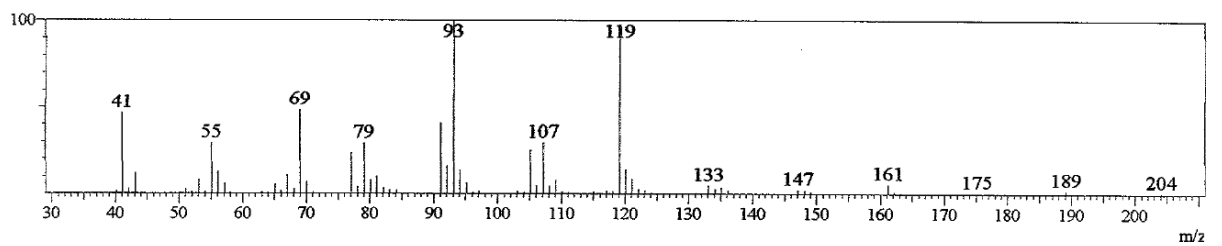
Line#:9 R.Time:29.8(Scan#:3274)



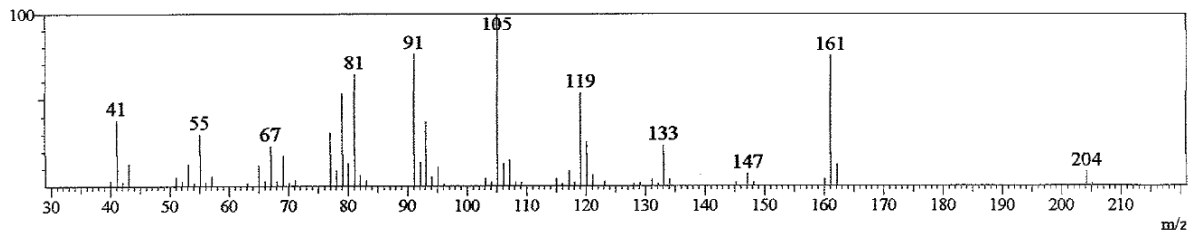
Line#:10 R.Time:31.4(Scan#:3474)



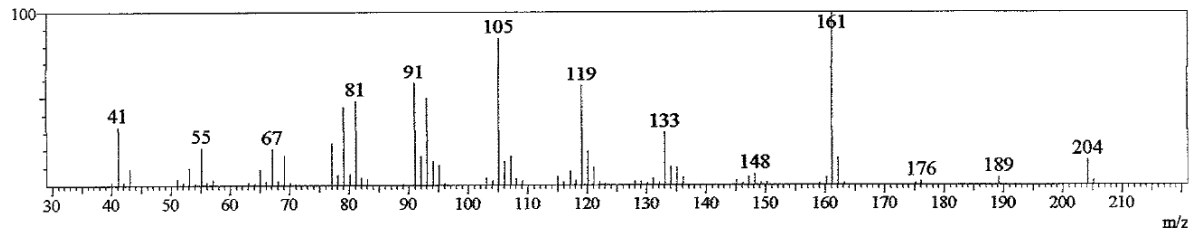
Line#:11 R.Time:32.2(Scan#:3565)



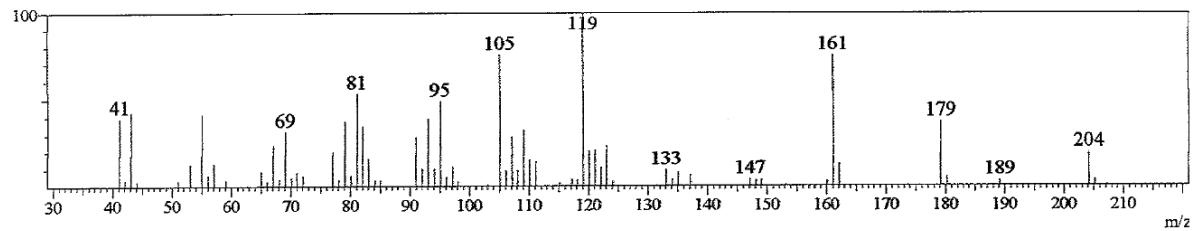
Line#:12 R.Time:34.6(Scan#:3859)



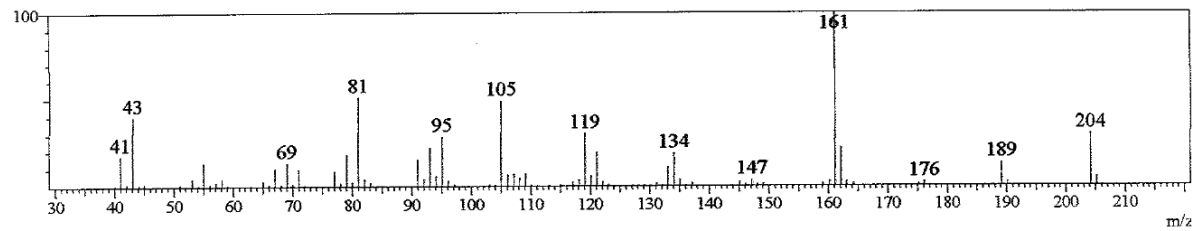
Line#:13 R.Time:36.2(Scan#:4047)



Line#:14 R.Time:40.9(Scan#:4606)

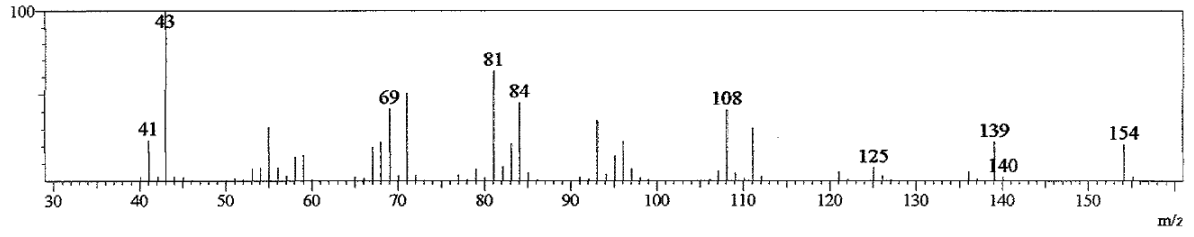


Line#:15 R.Time:41.7(Scan#:4707)

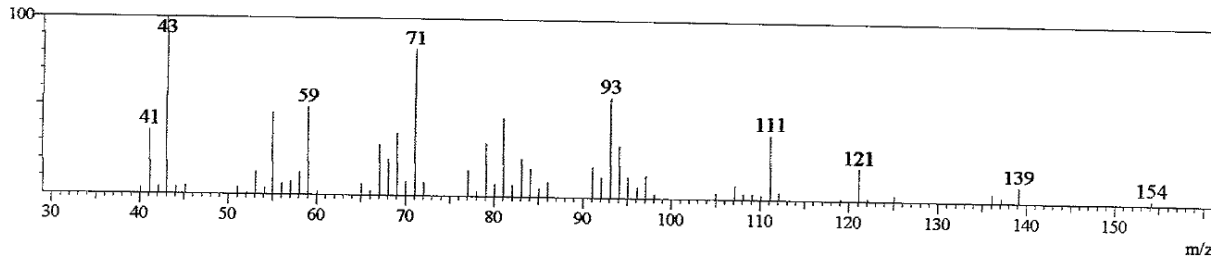


Anexo 41. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{ha}^{-1}$

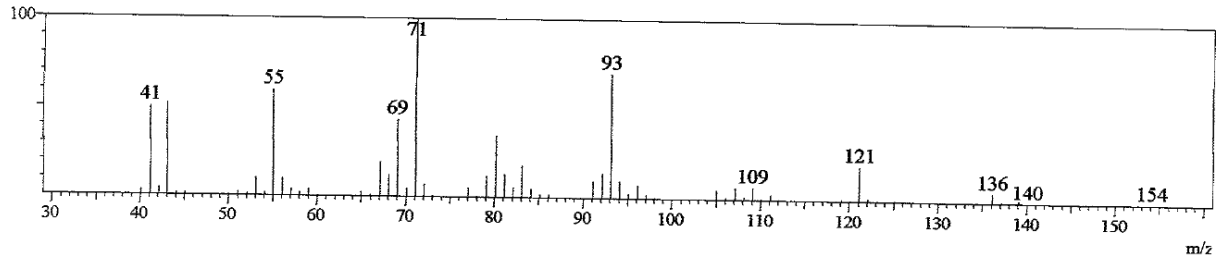
Line# 1 R.Time:9.3(Scan#:822)



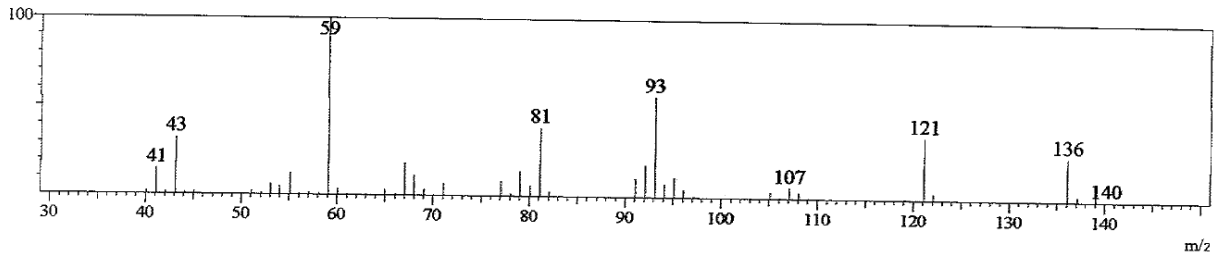
Line# 2 R.Time:11.4(Scan#:1068)



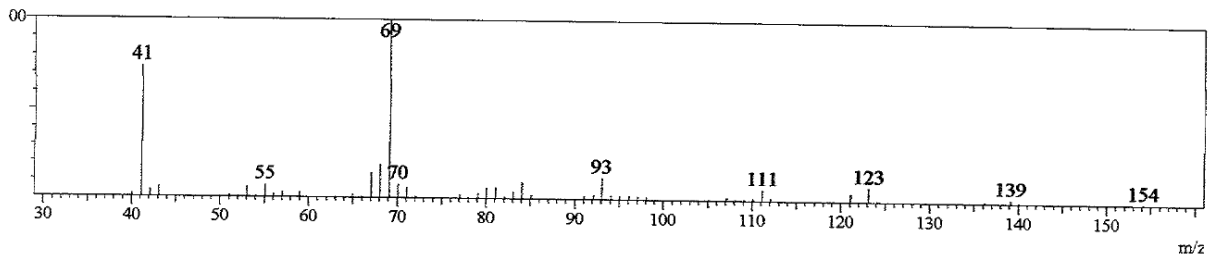
Line# 3 R.Time:13.3(Scan#:1296)



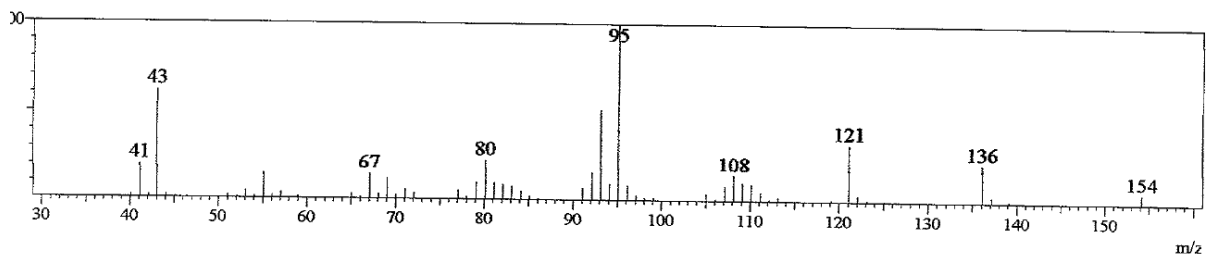
Line# 4 R.Time:18.6(Scan#:1932)



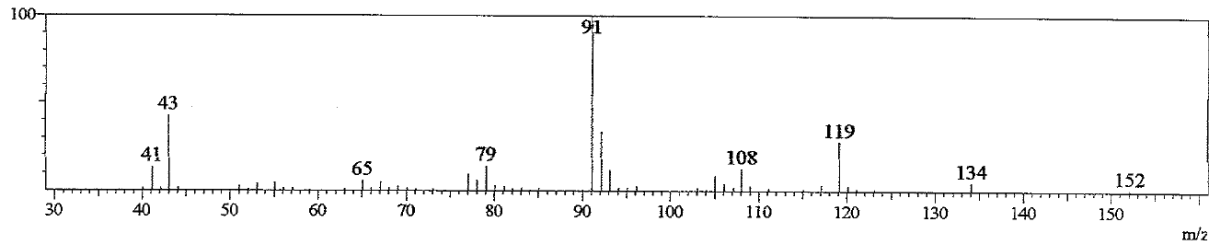
Line# 5 R.Time:22.4(Scan#:2389)



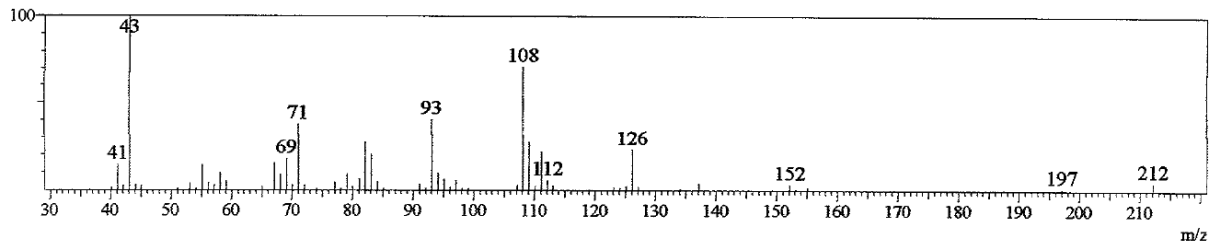
Line# 6 R.Time:23.9(Scan#:2565)



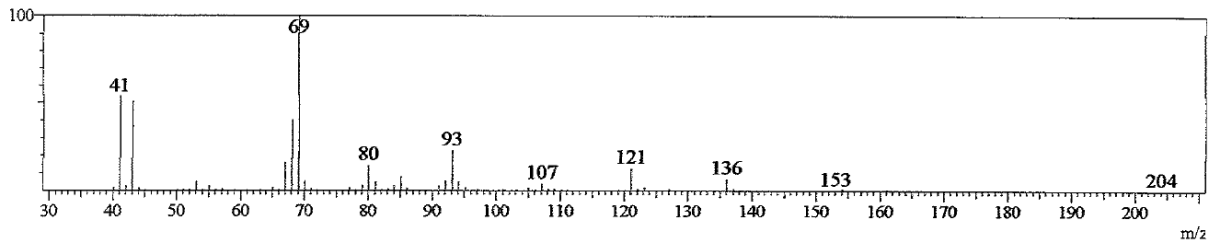
Line#:7 R.Time:26.4(Scan#:2869)



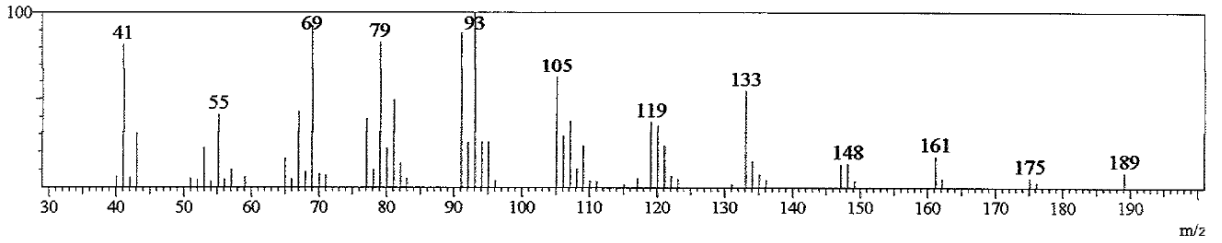
Line#:8 R.Time:27.5(Scan#:3001)



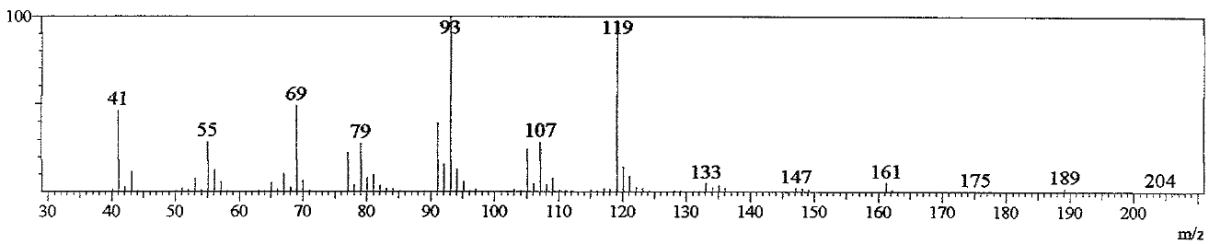
Line#:9 R.Time:29.8(Scan#:3276)



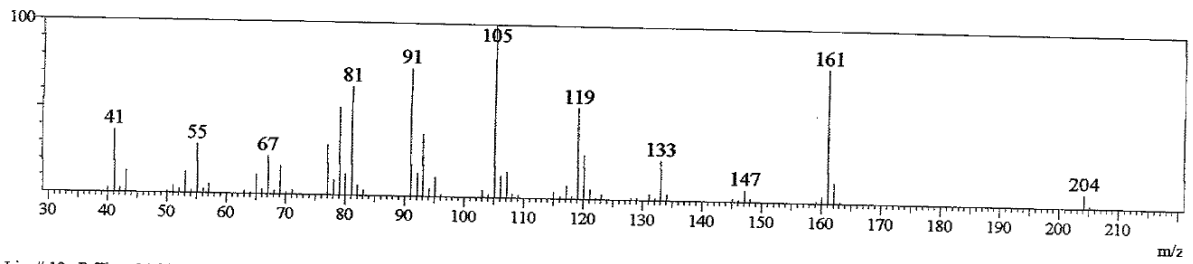
Line#:10 R.Time:31.4(Scan#:3474)



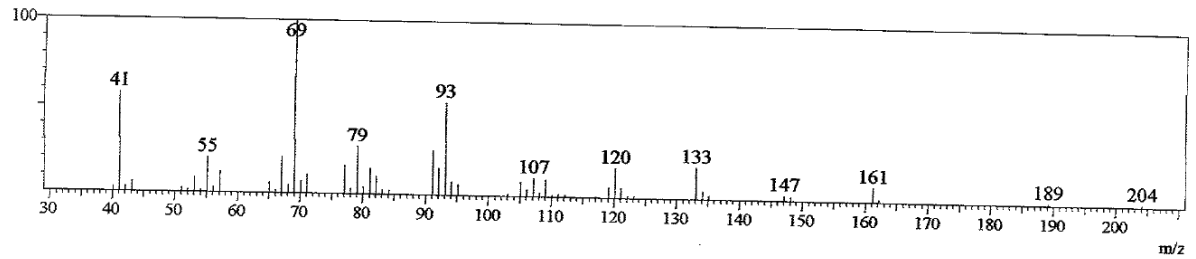
Line#:11 R.Time:32.2(Scan#:3567)



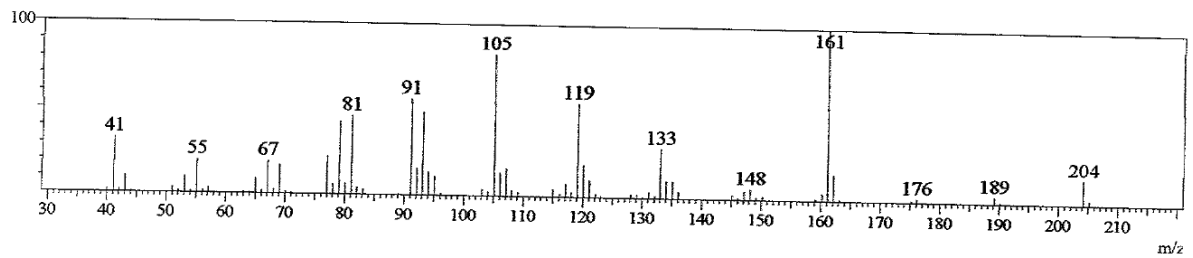
Line#:12 R.Time:34.6(Scan#:3859)



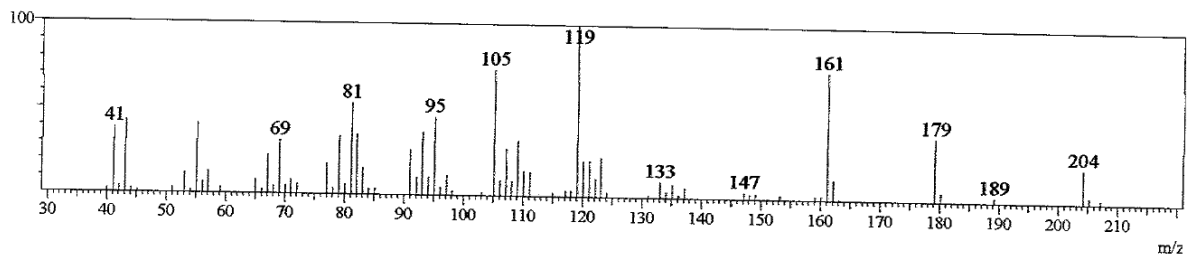
Line#:13 R.Time:34.8(Scan#:3876)



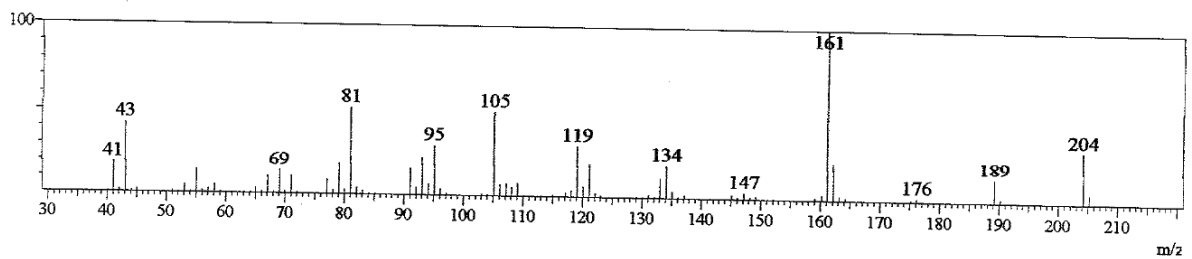
Line#:14 R.Time:36.2(Scan#:4047)



Line#:15 R.Time:40.9(Scan#:4606)

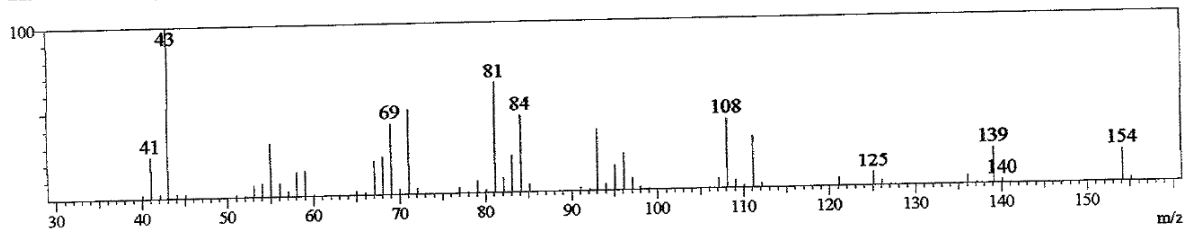


Line#:16 R.Time:41.7(Scan#:4708)

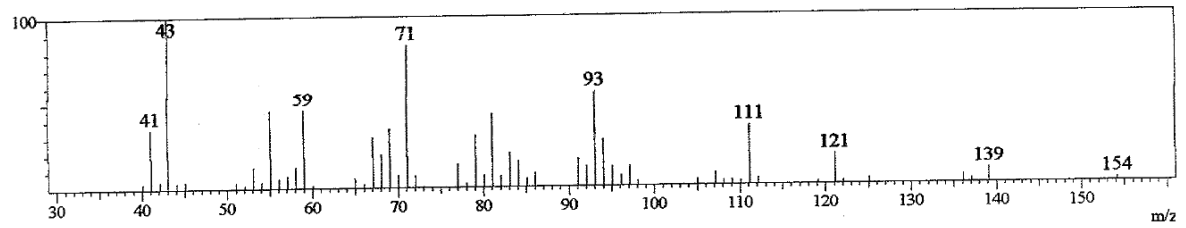


Anexo 42. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $50\text{Kg.NH}_4\text{ ha}^{-1}$

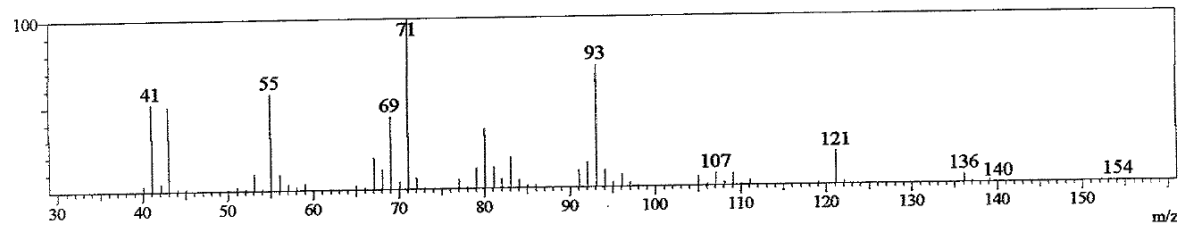
Line#1 R.Time:9.3(Scan#:821)



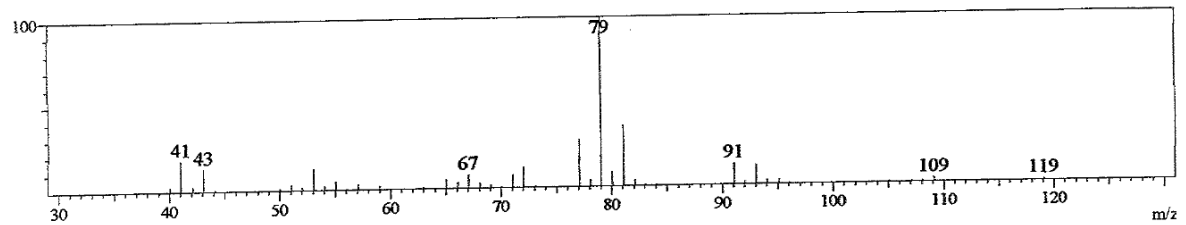
Line#2 R.Time:11.4(Scan#:1068)



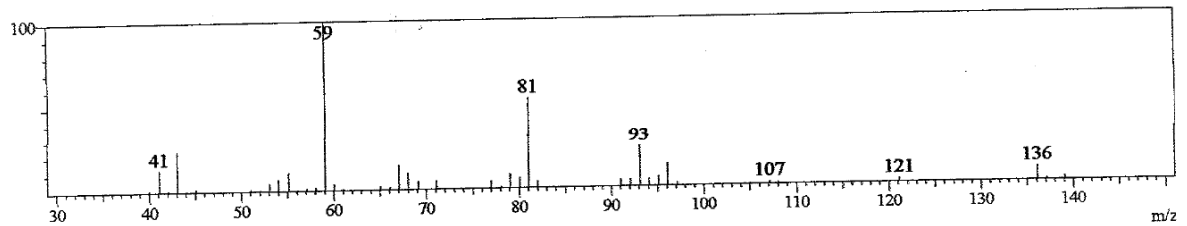
Line#3 R.Time:13.4(Scan#:1306)



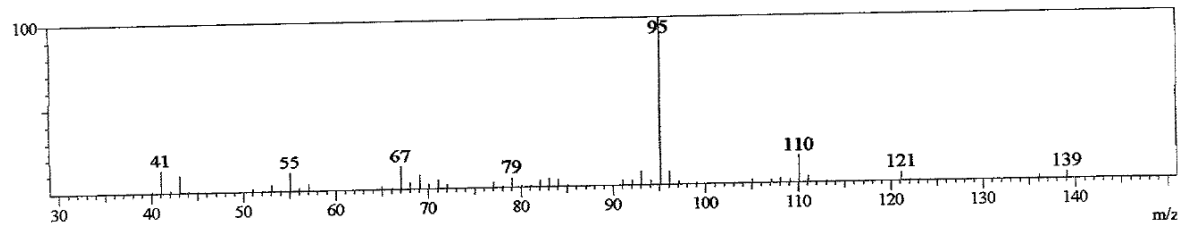
Line#4 R.Time:15.1(Scan#:1517)



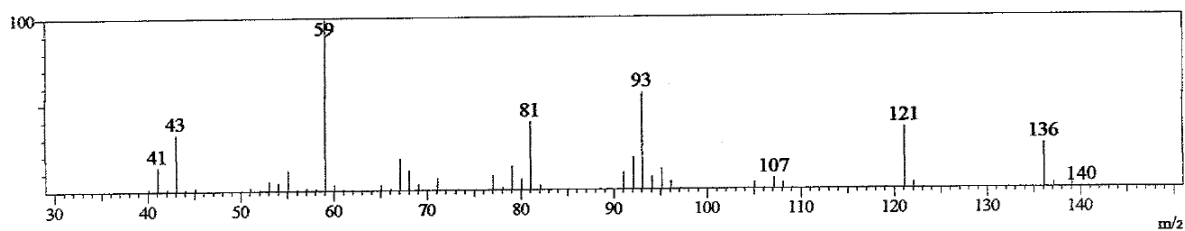
Line#5 R.Time:17.1(Scan#:1756)



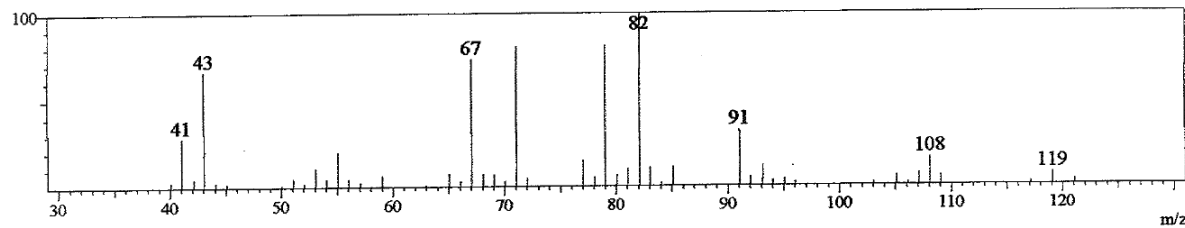
Line#6 R.Time:17.3(Scan#:1774)



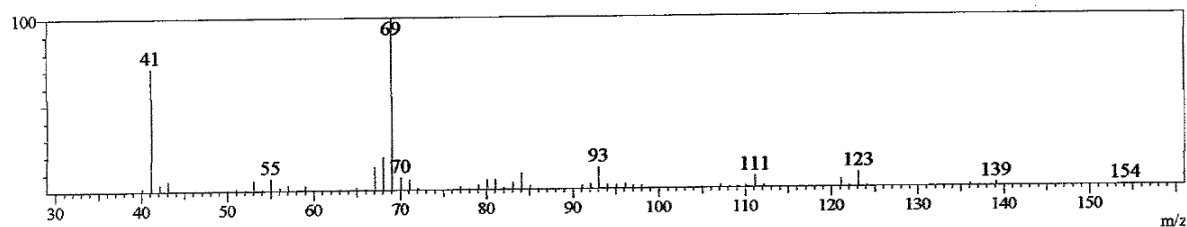
Line#7 R.Time:18.6(Scan#:1933)



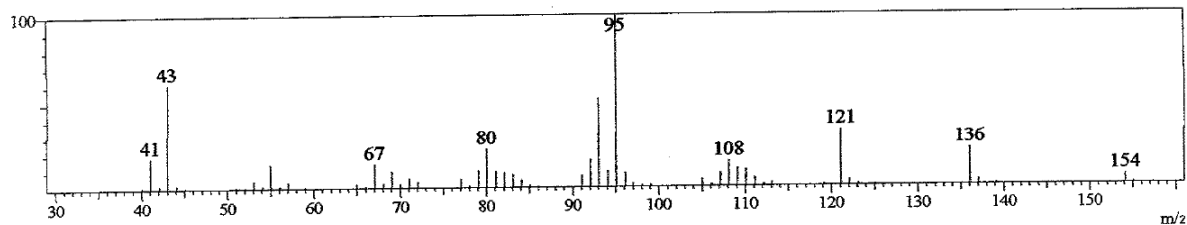
Line#8 R.Time:18.9(Scan#:1970)



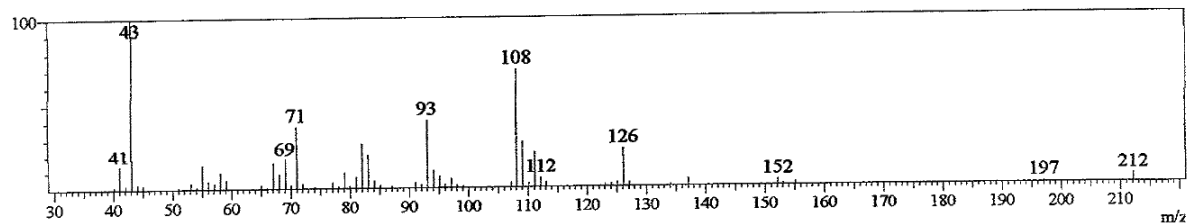
Line#9 R.Time:22.5(Scan#:2403)



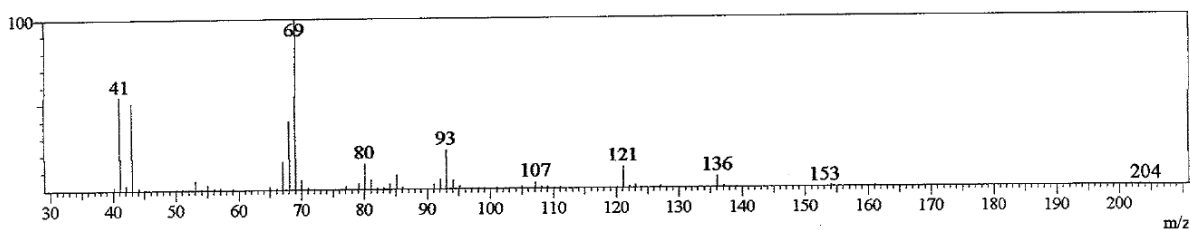
Line#10 R.Time:23.9(Scan#:2567)



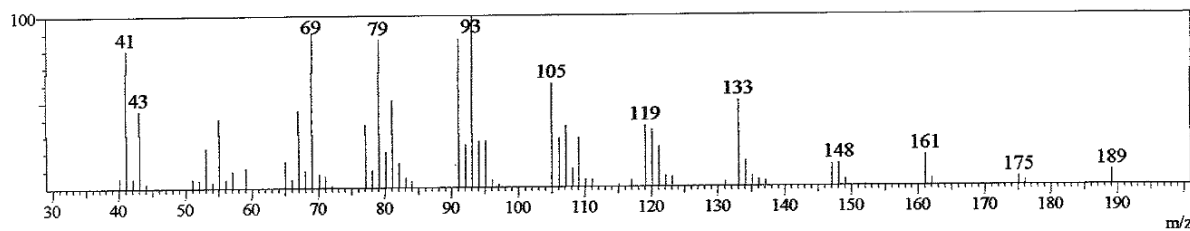
Line#11 R.Time:27.5(Scan#:3001)



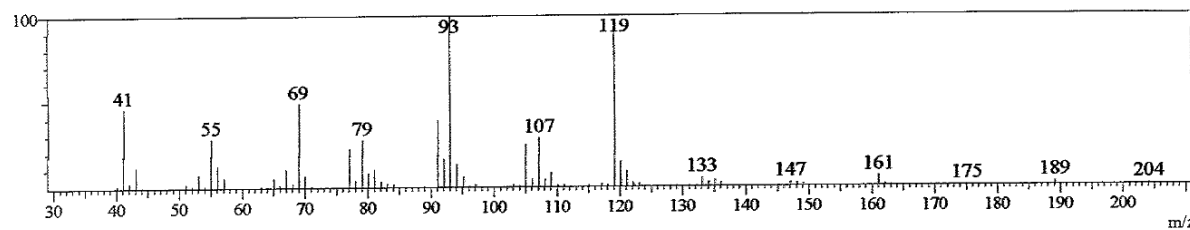
Line#12 R.Time:29.8(Scan#:3277)



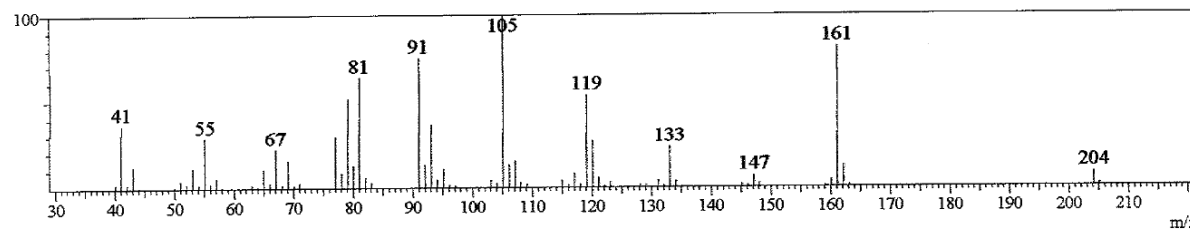
Line#13 R.Time:31.5(Scan#:3475)



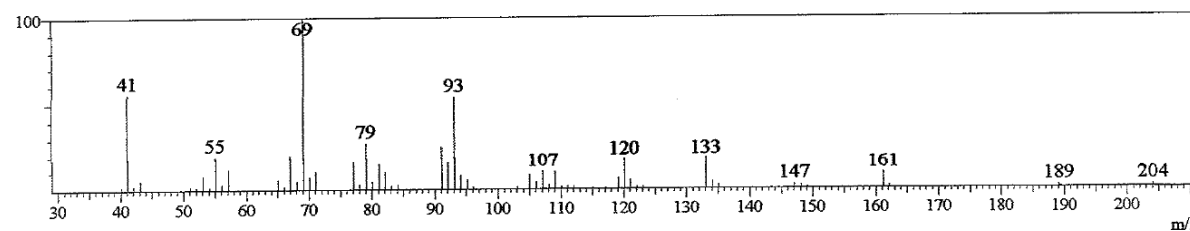
Line#14 R.Time:32.2(Scan#:3567)



Line#15 R.Time:34.6(Scan#:3859)



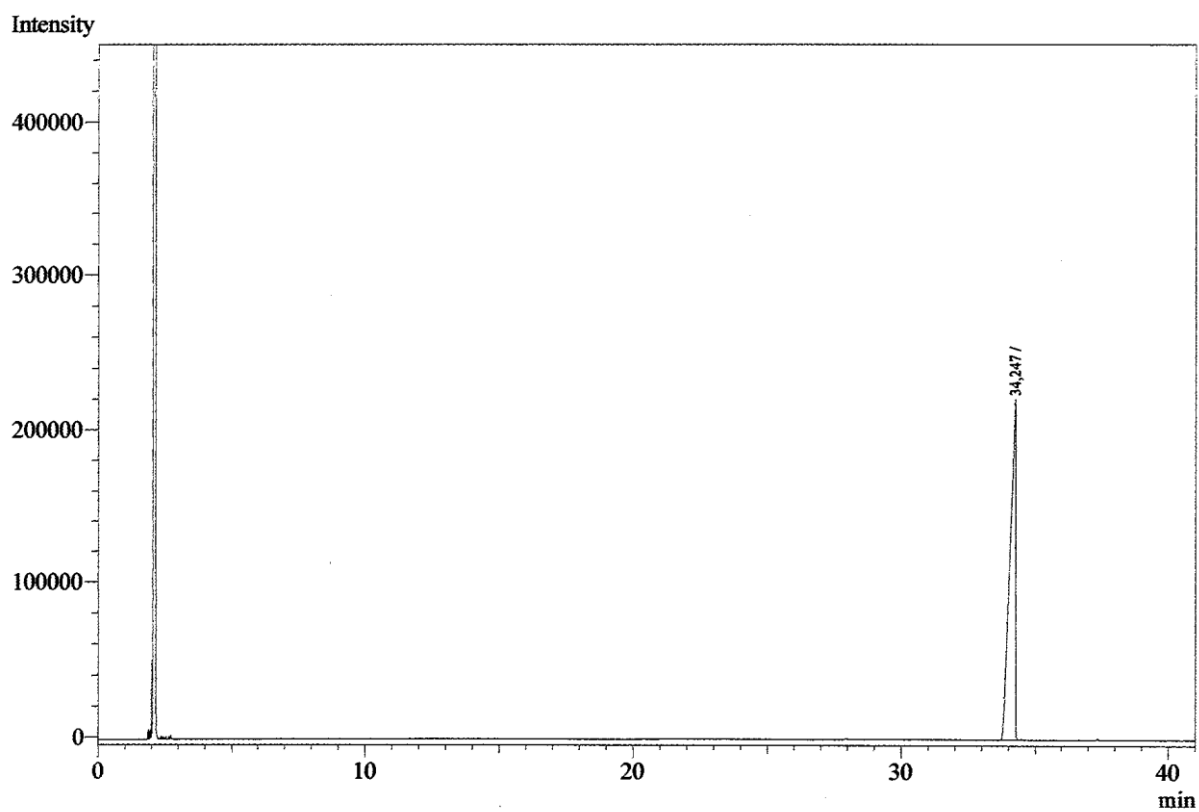
Line#16 R.Time:34.8(Scan#:3876)



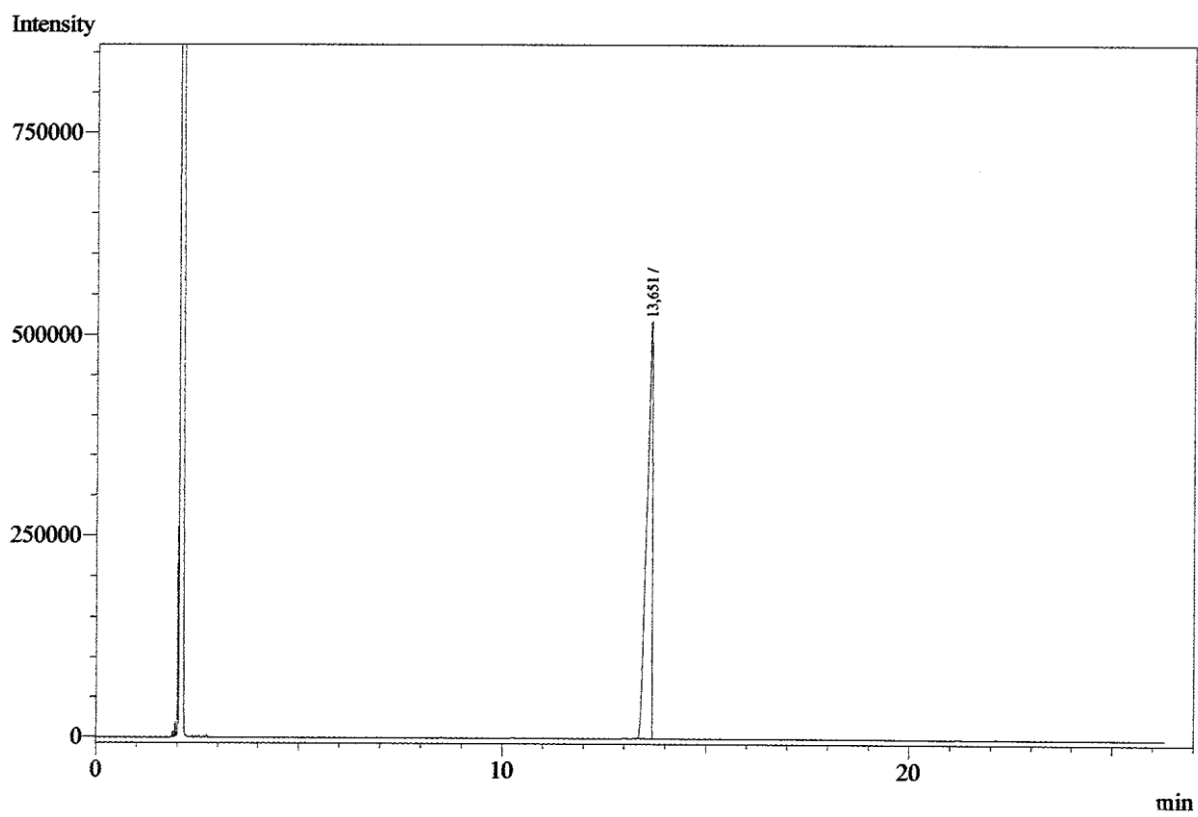
Anexo 43. Espectro de massa dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetidas ao tratamento com $100\text{Kg.NH}_4\text{ ha}^{-1}$

Anexo B – Análise cromatográfica por CG-FID de padrões e das amostras de óleo essencial analisadas

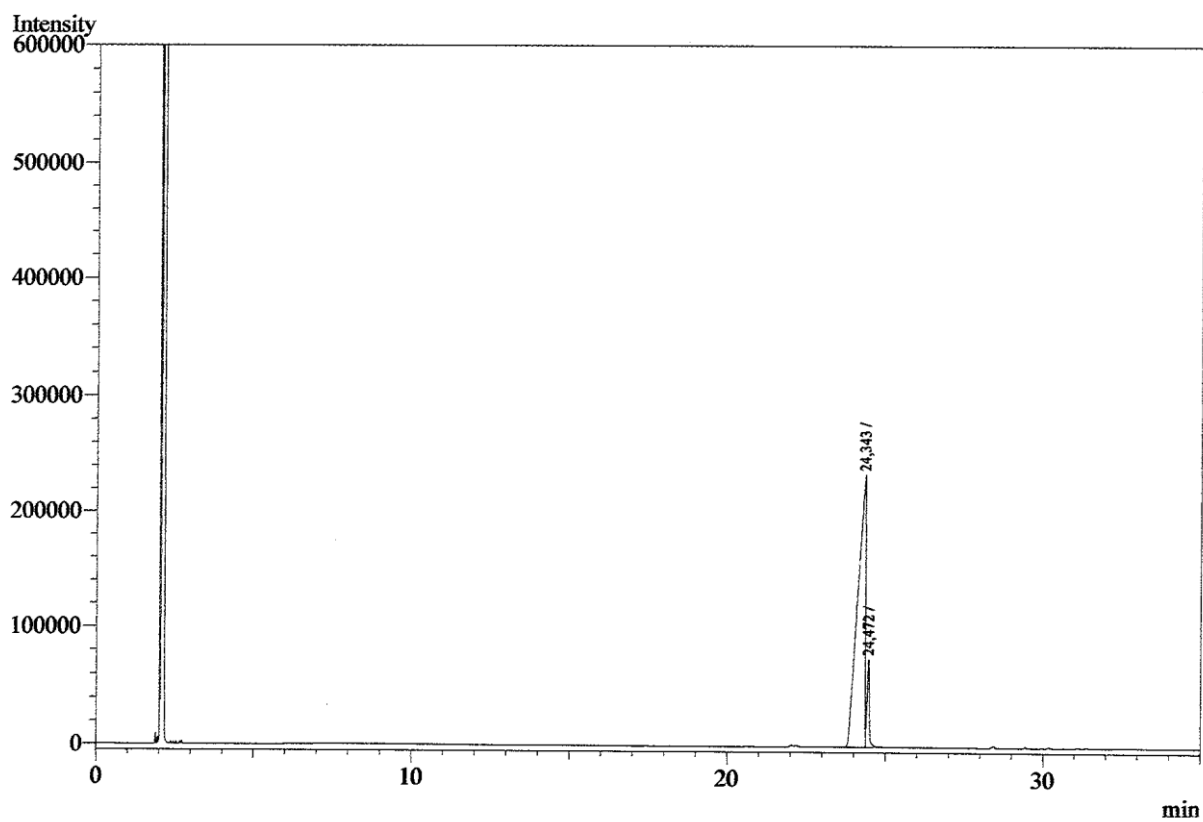
Padrões



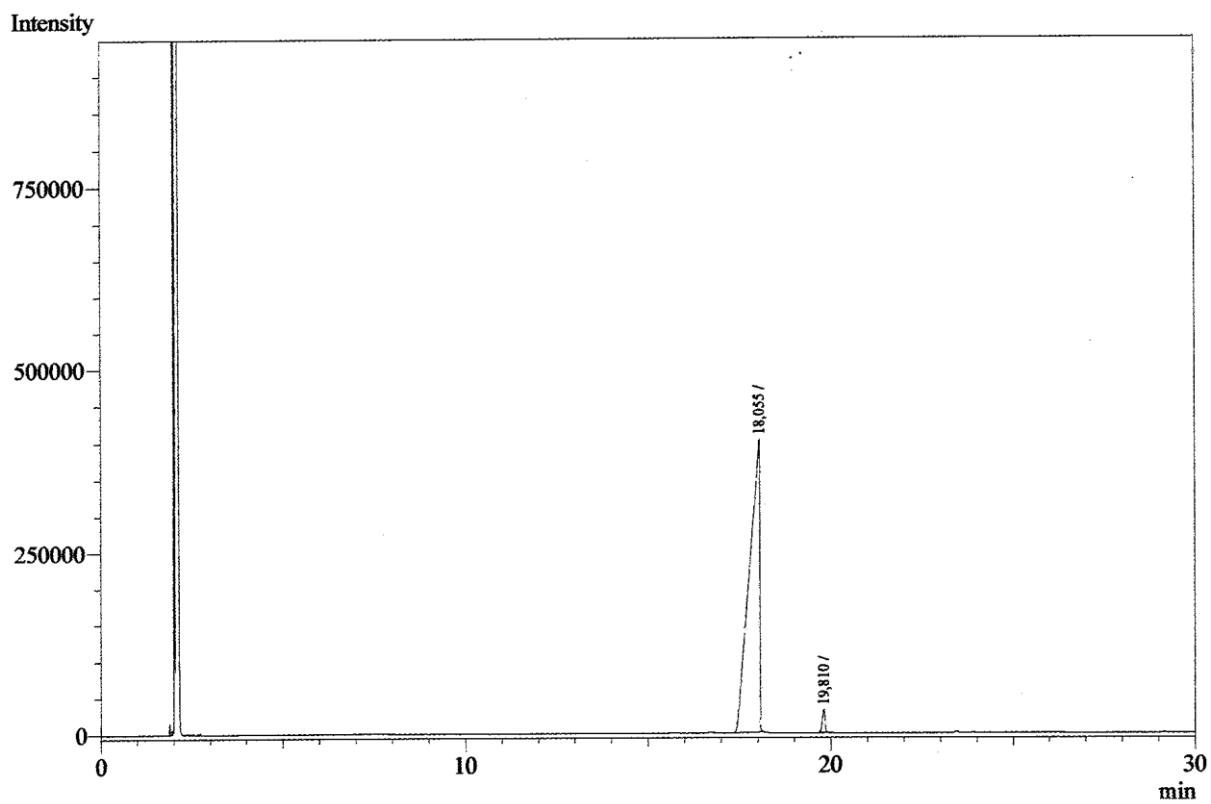
Anexo 44. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de eugenol (Sigma-Aldrich)



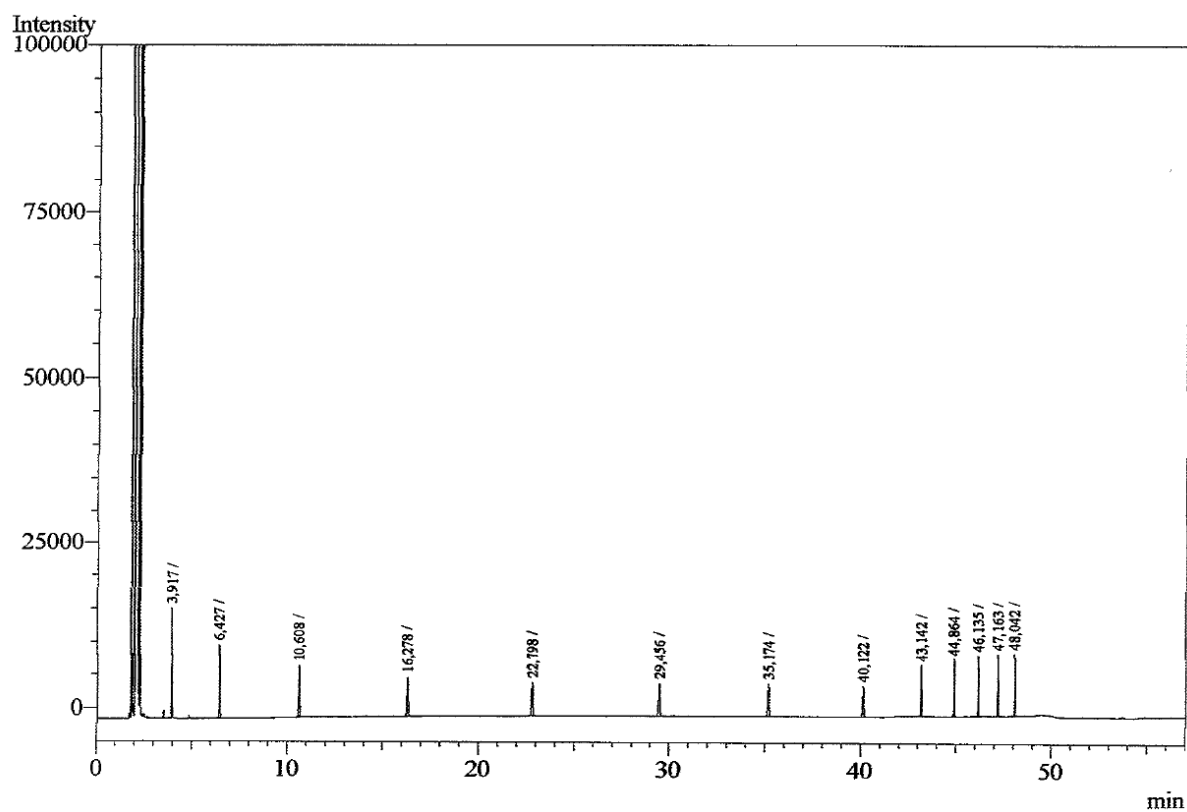
Anexo 45. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de eucaliptol (Sigma-Aldrich)



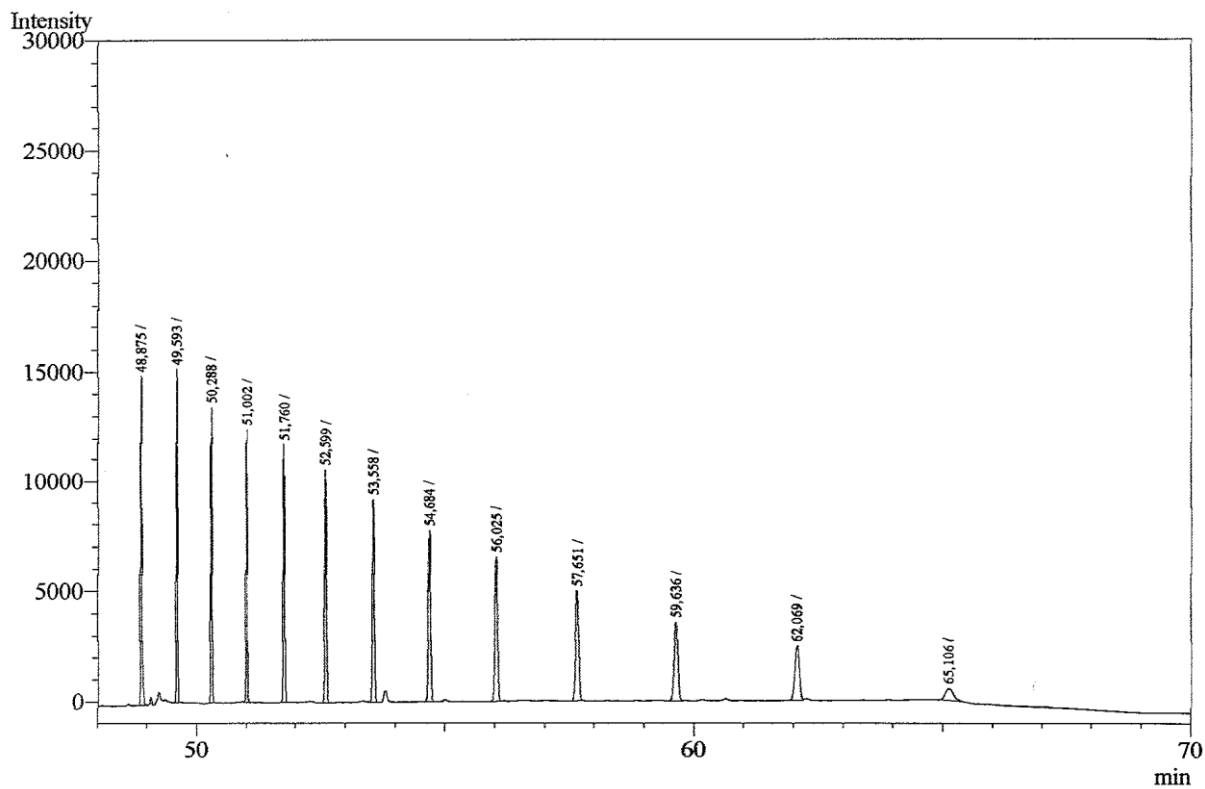
Anexo 46. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de α -terpineol (Sigma-Aldrich)



Anexo 47. Análise cromatográfica por CG-FID do padrão de linalol (Sigma-Aldrich)

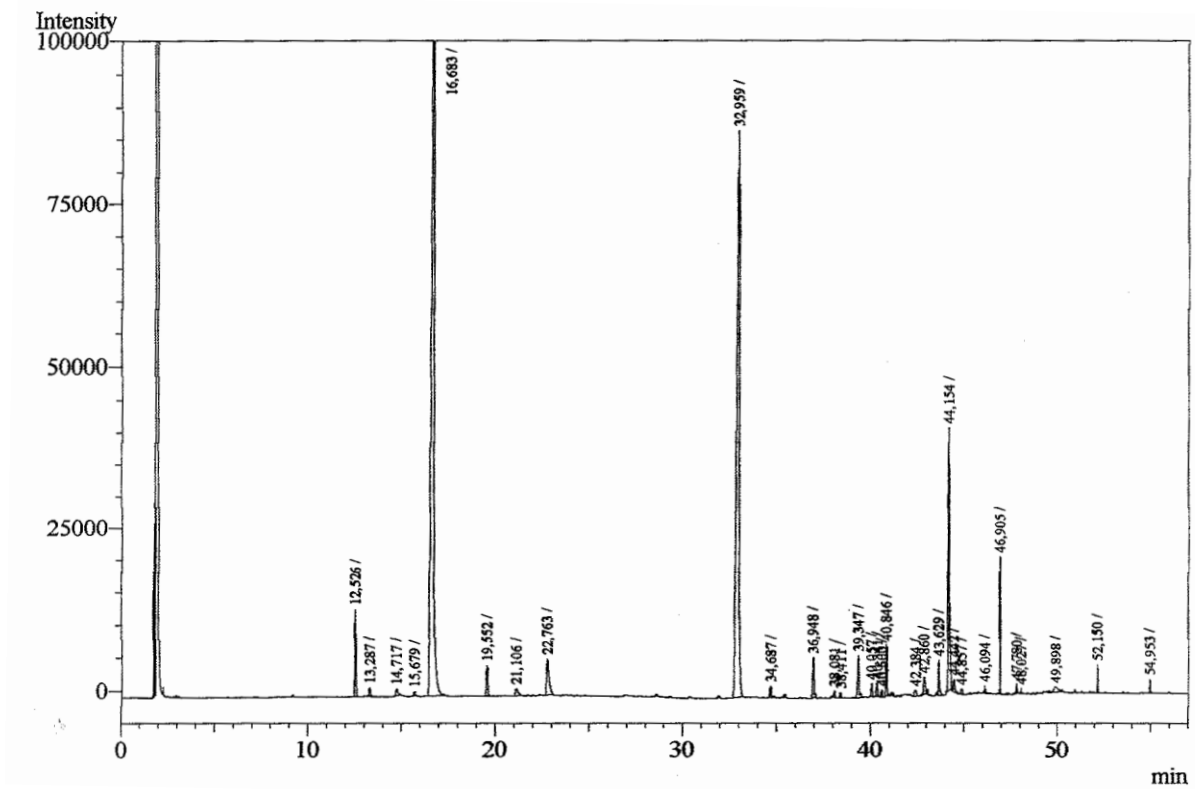


Anexo 48. Análise cromatográfica por CG-FID da série homóloga de alcanos C₈-C₂₀ (Sigma-Aldrich)

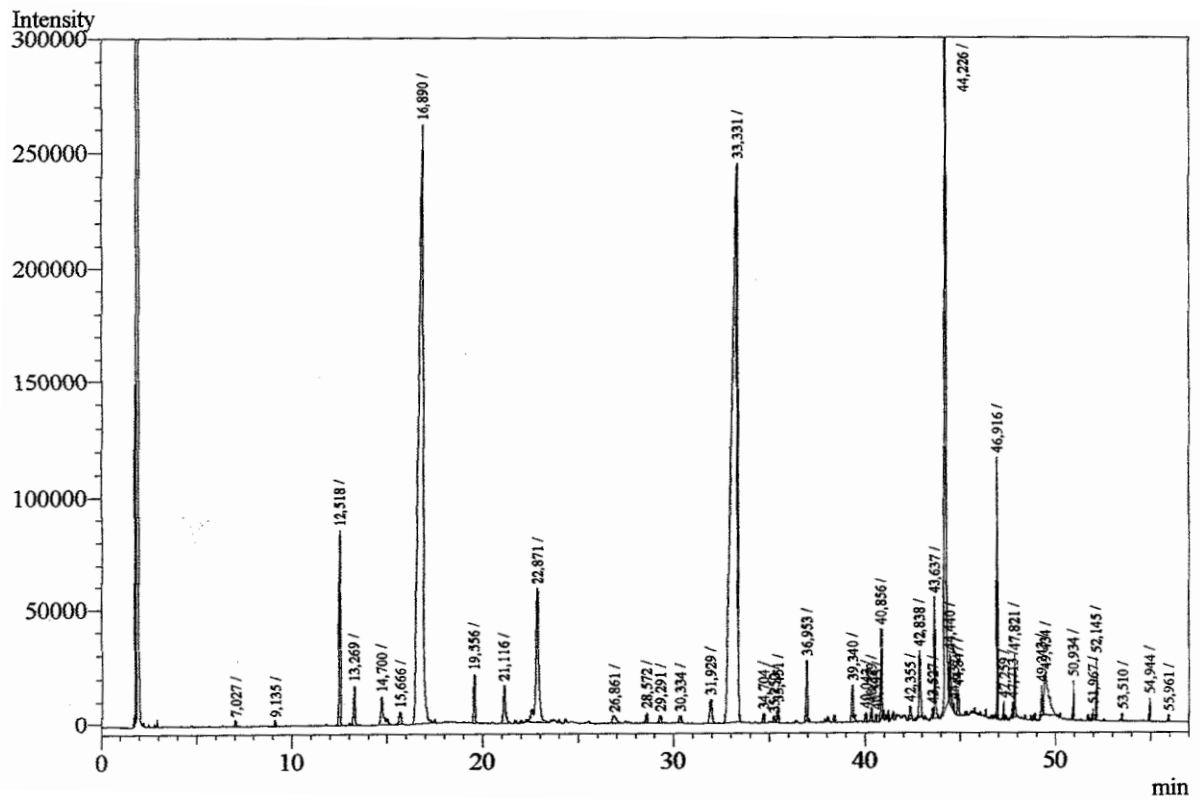


Anexo 49. Análise cromatográfica por CG-FID da série homóloga de alcanos C₂₁-C₄₀ (Sigma-Aldrich)

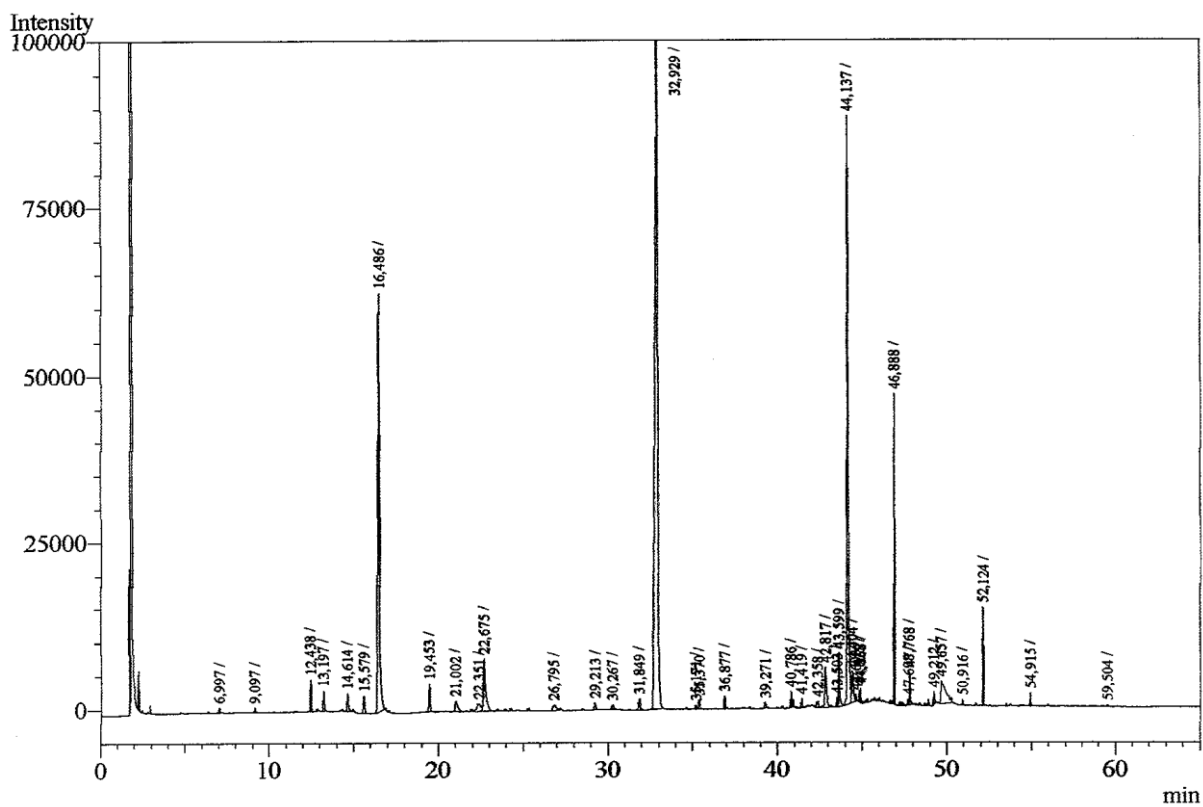
Amostras de óleo essencial de manjeriço



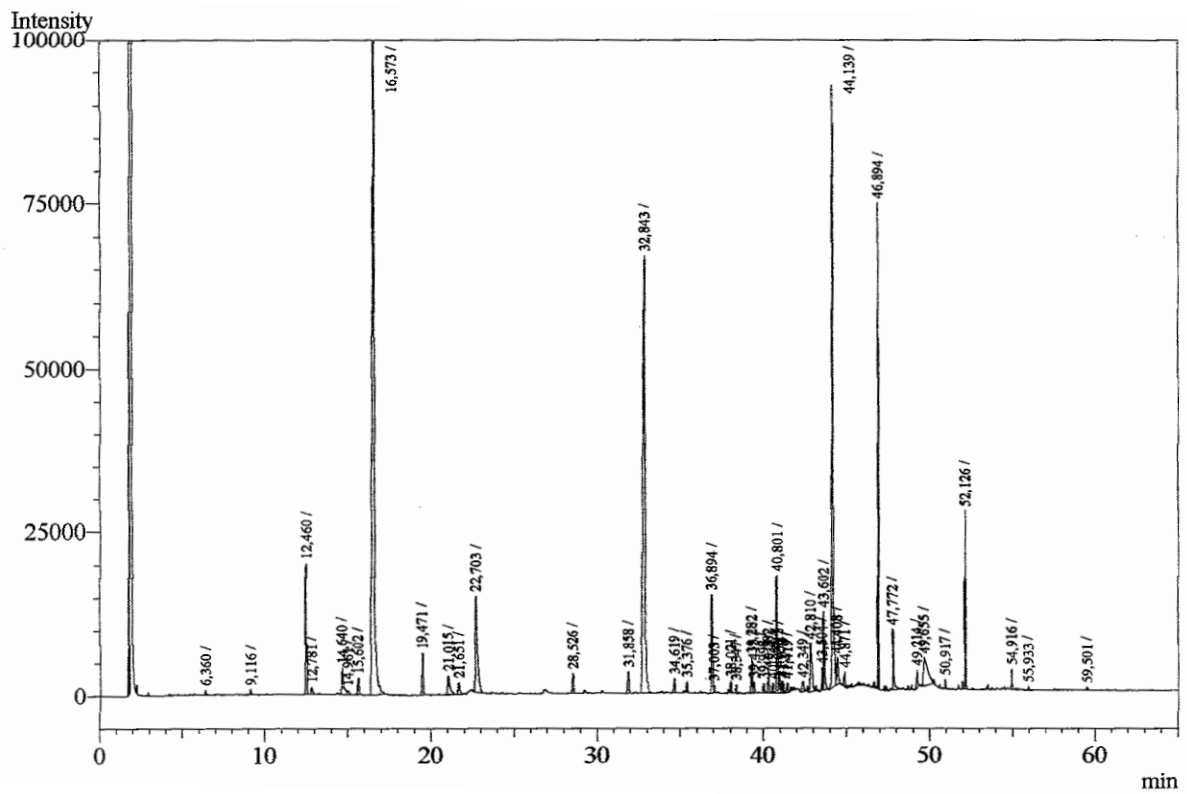
Anexo 50. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao tratamento sem suprimento de N com a co-injeção dos padrões de alcanos



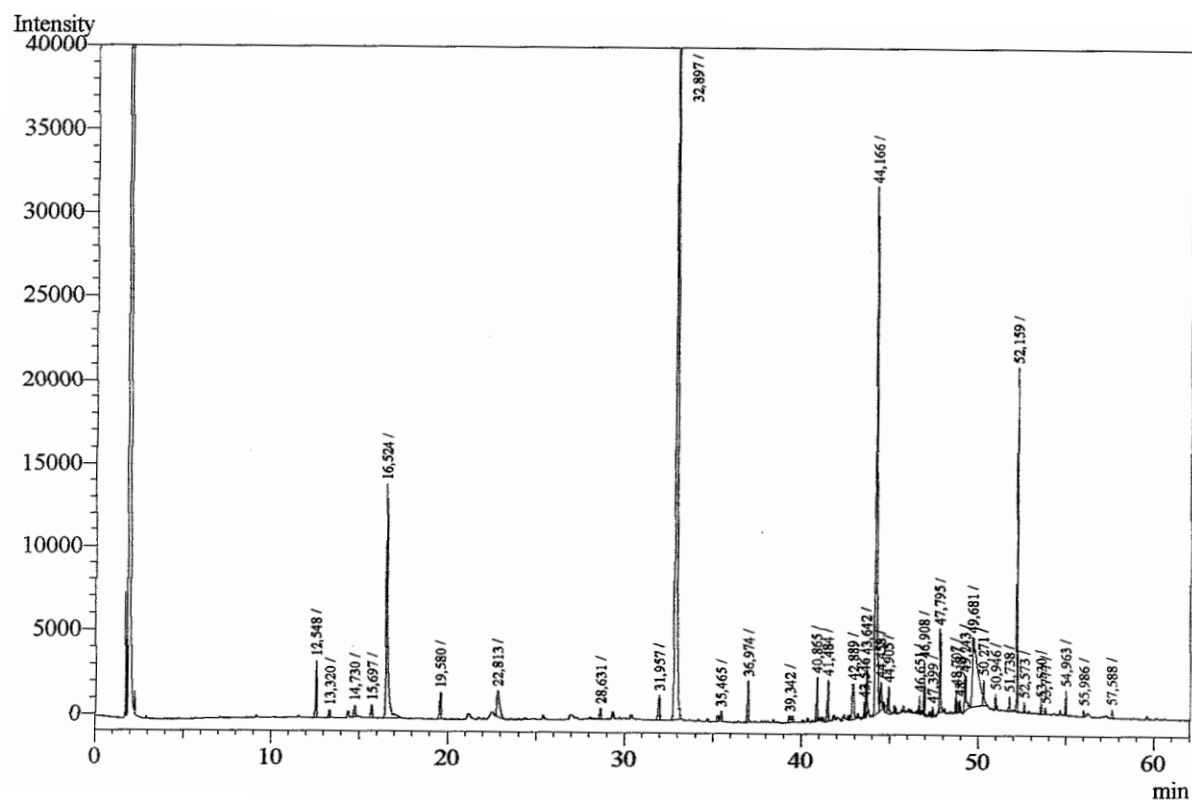
Anexo 51. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos



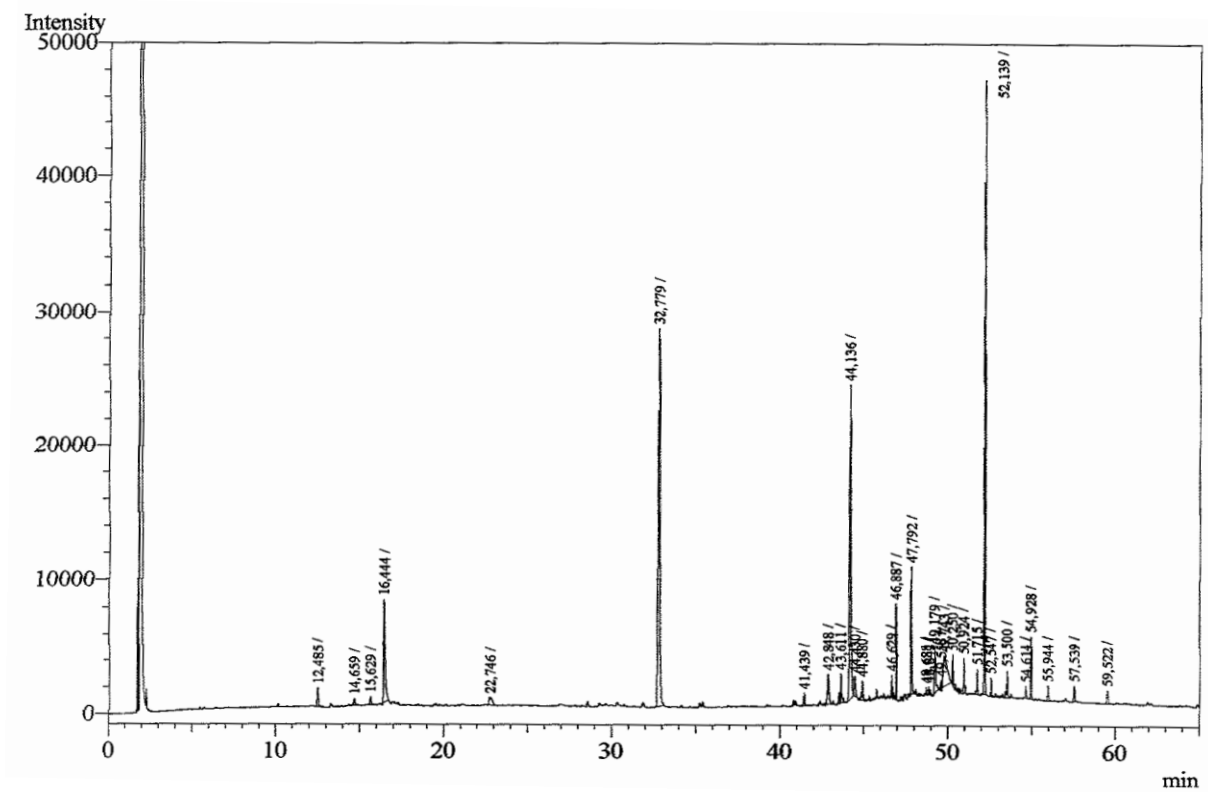
Anexo 52. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 100 Kg N.ha⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos



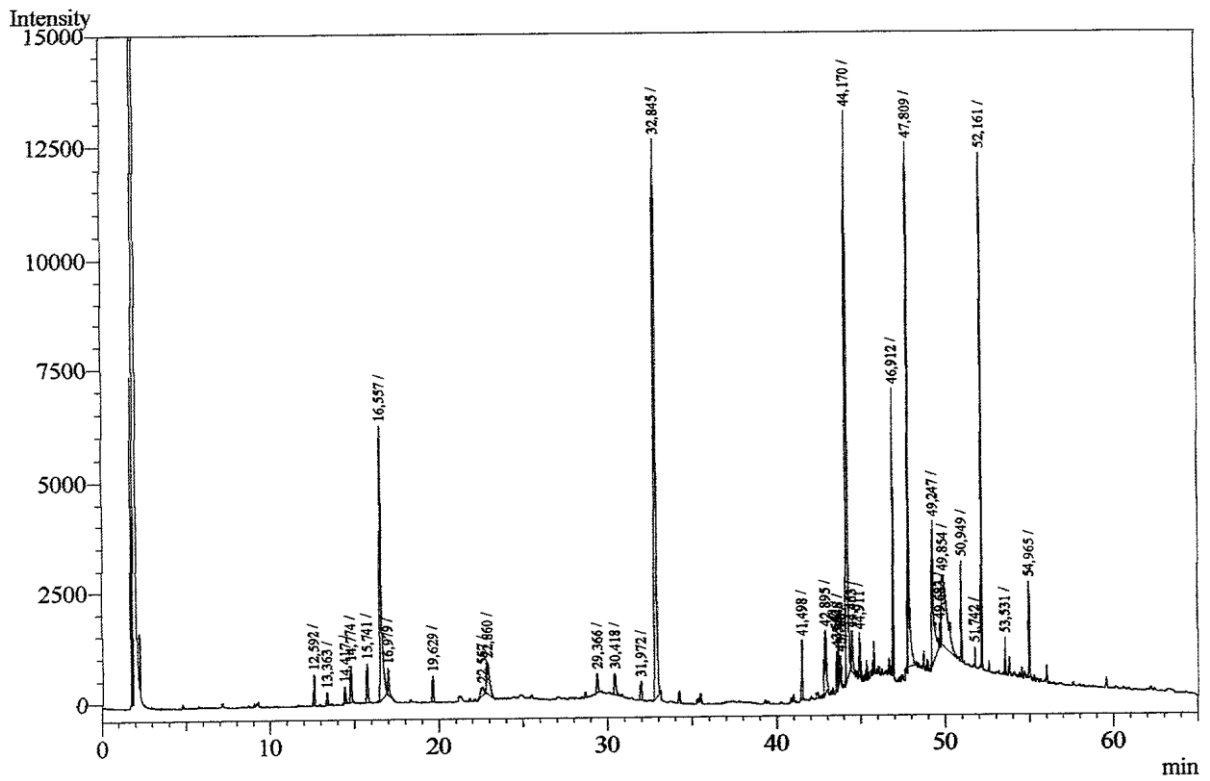
Anexo 53. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos



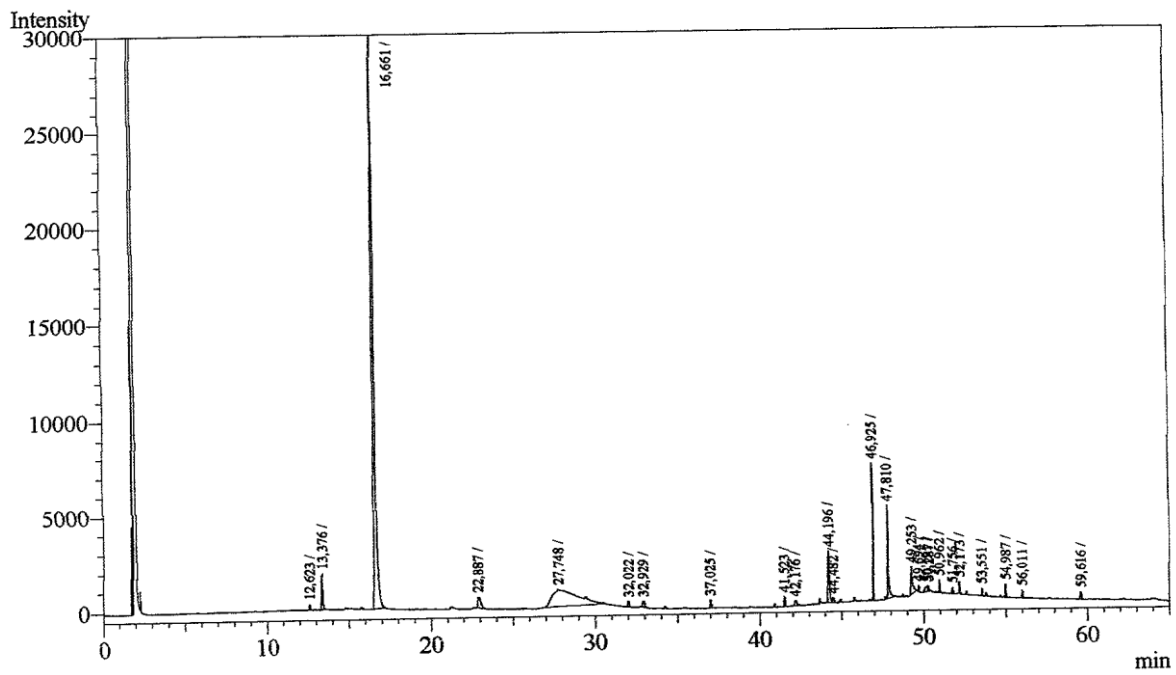
Anexo 54. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 100 Kg N.ha⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos



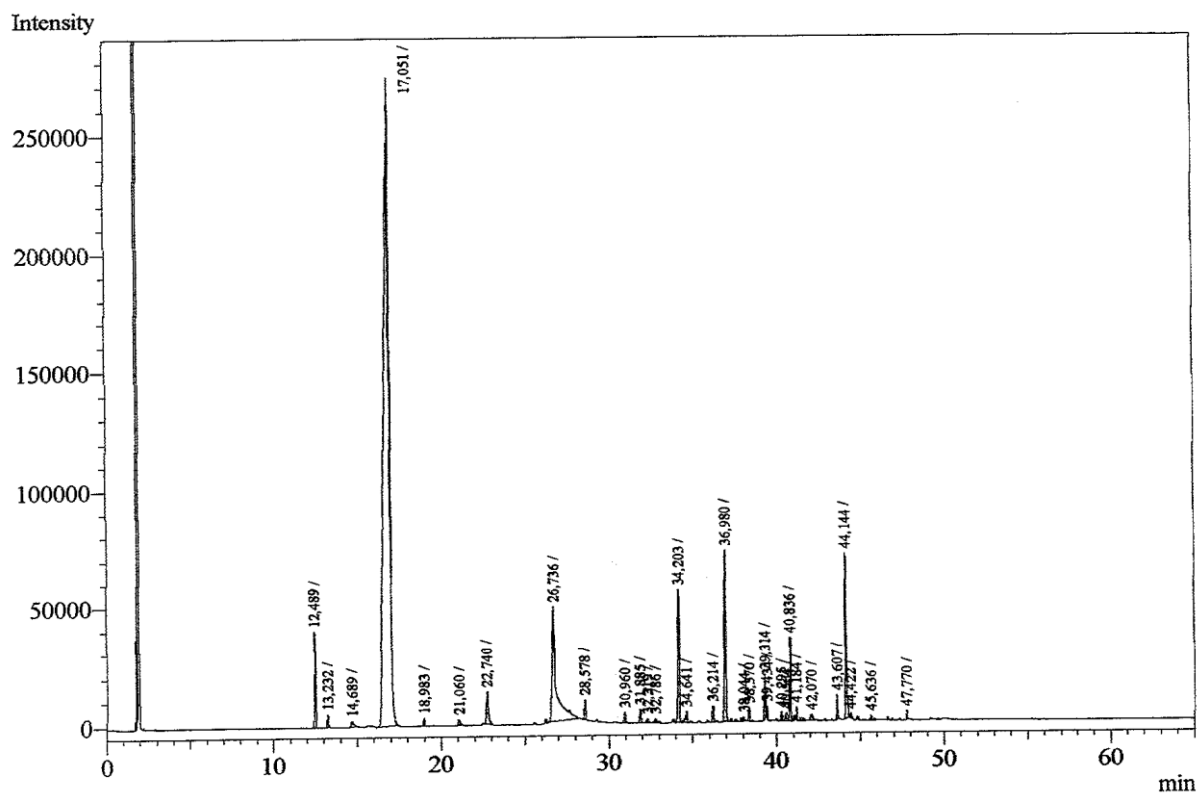
Anexo 55. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 50 Kg N.ha⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos



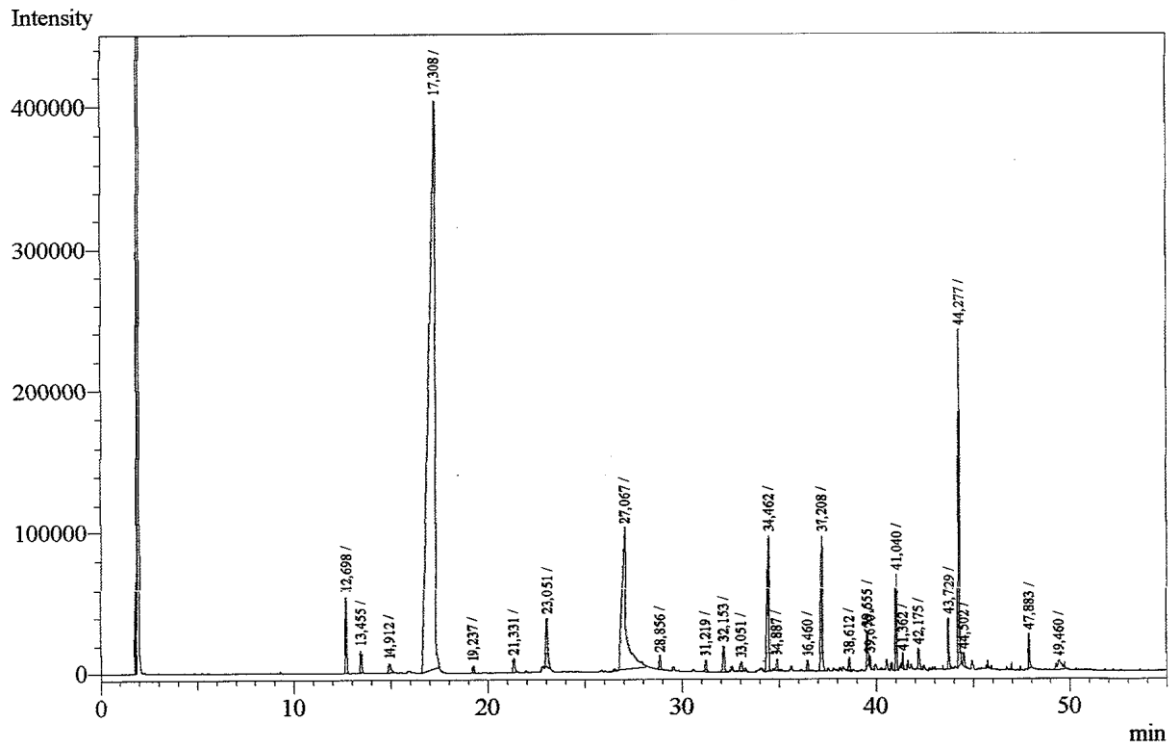
Anexo 56. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da variedade *Sweet Italian Large Leaf* submetidas ao suprimento com 100 Kg N.ha⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos



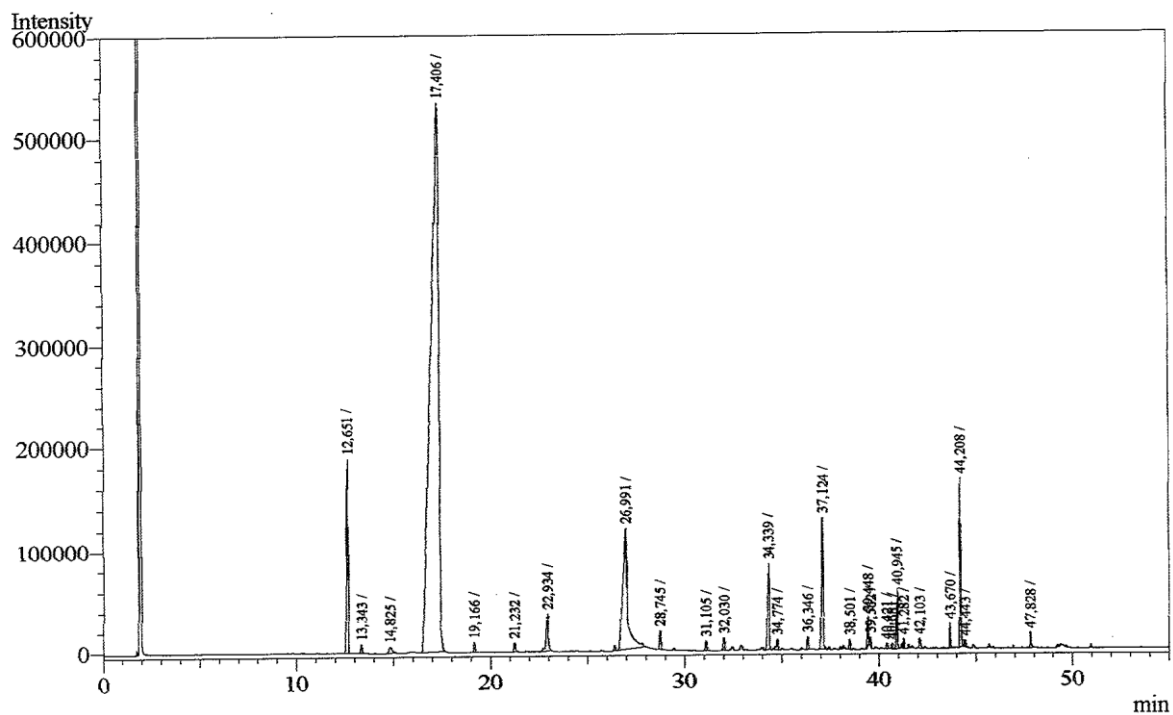
Anexo 57. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da cultivar Maria Bonita submetida ao tratamento sem suprimento de N com a co-injeção dos padrões de alcanos



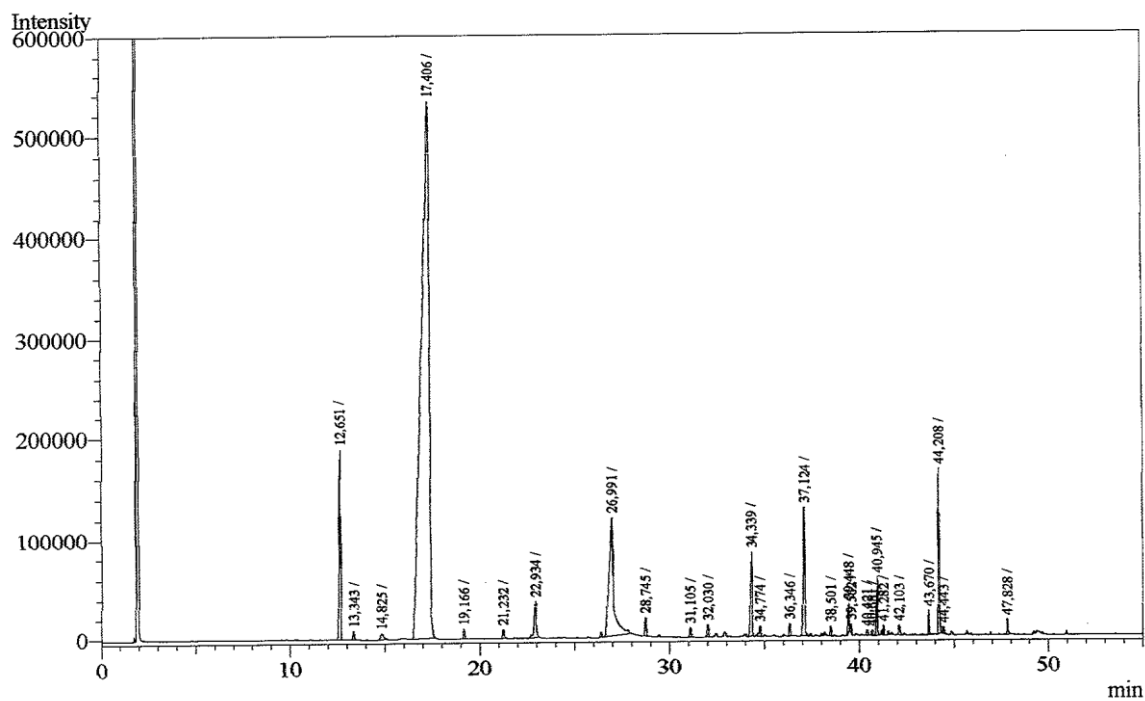
Anexo 58. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 50 Kg N.ha⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos



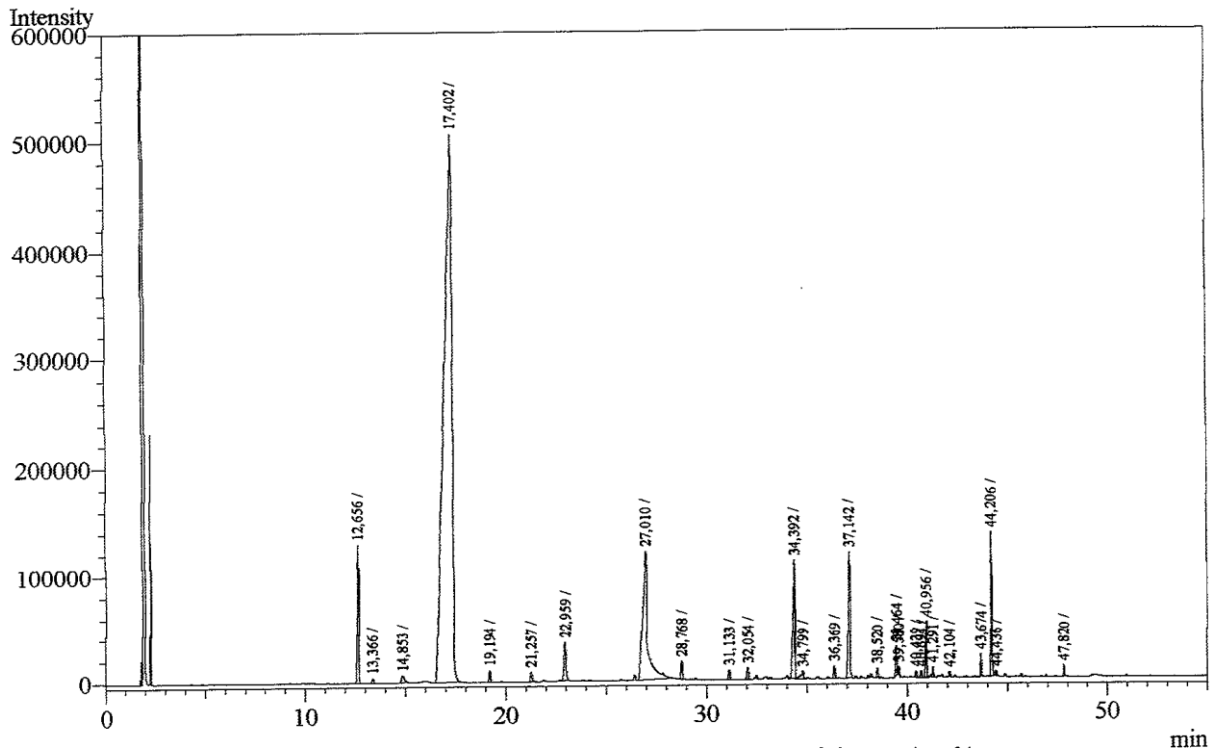
Anexo 59. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 100 Kg N.ha⁻¹ de nitrato com a co-injeção dos padrões de alcanos



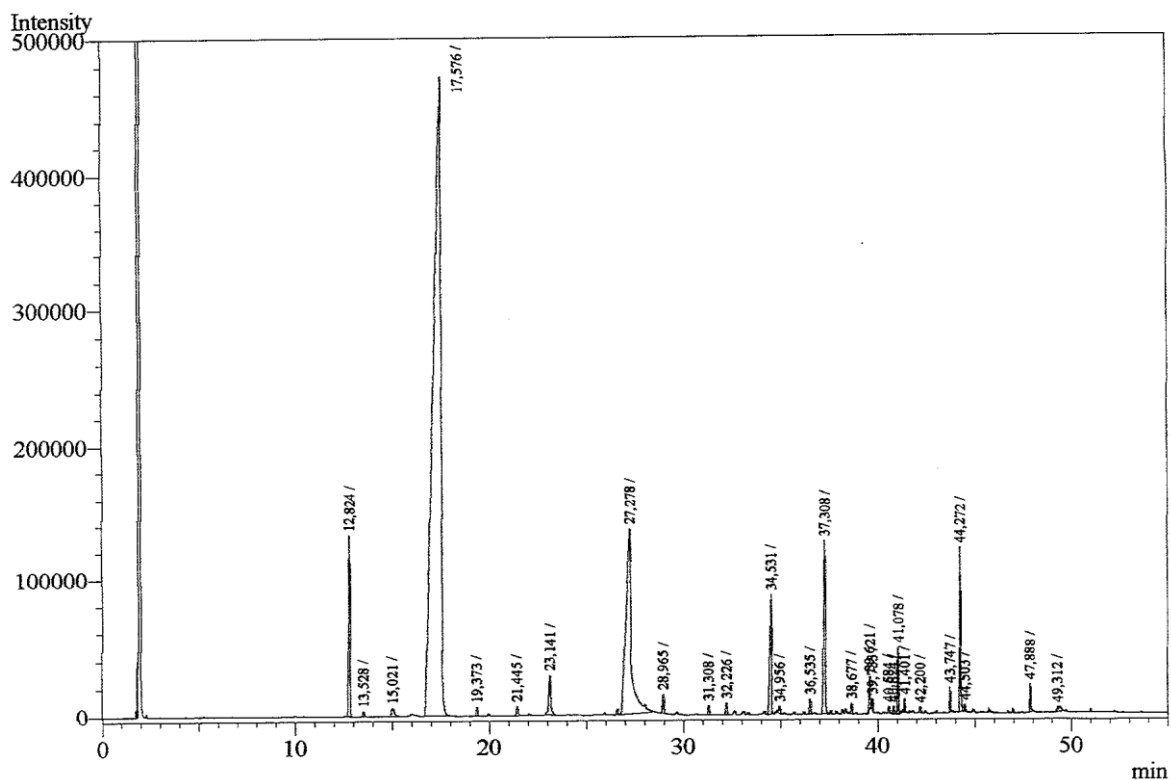
Anexo 60. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 50 Kg N.ha⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos



Anexo 61. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 100 Kg N.ha⁻¹ de nitrato de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos

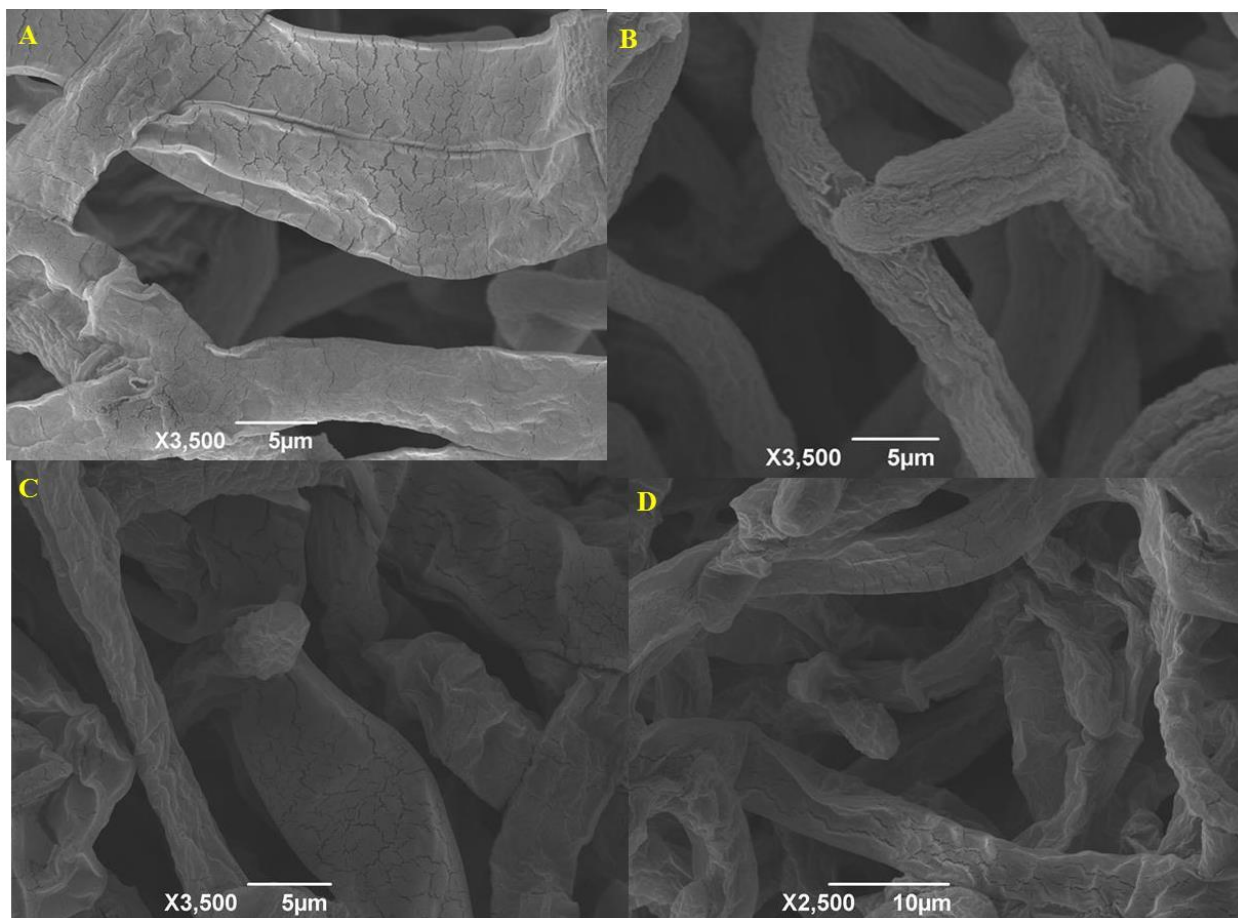


Anexo 62. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 50 Kg N.ha⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos

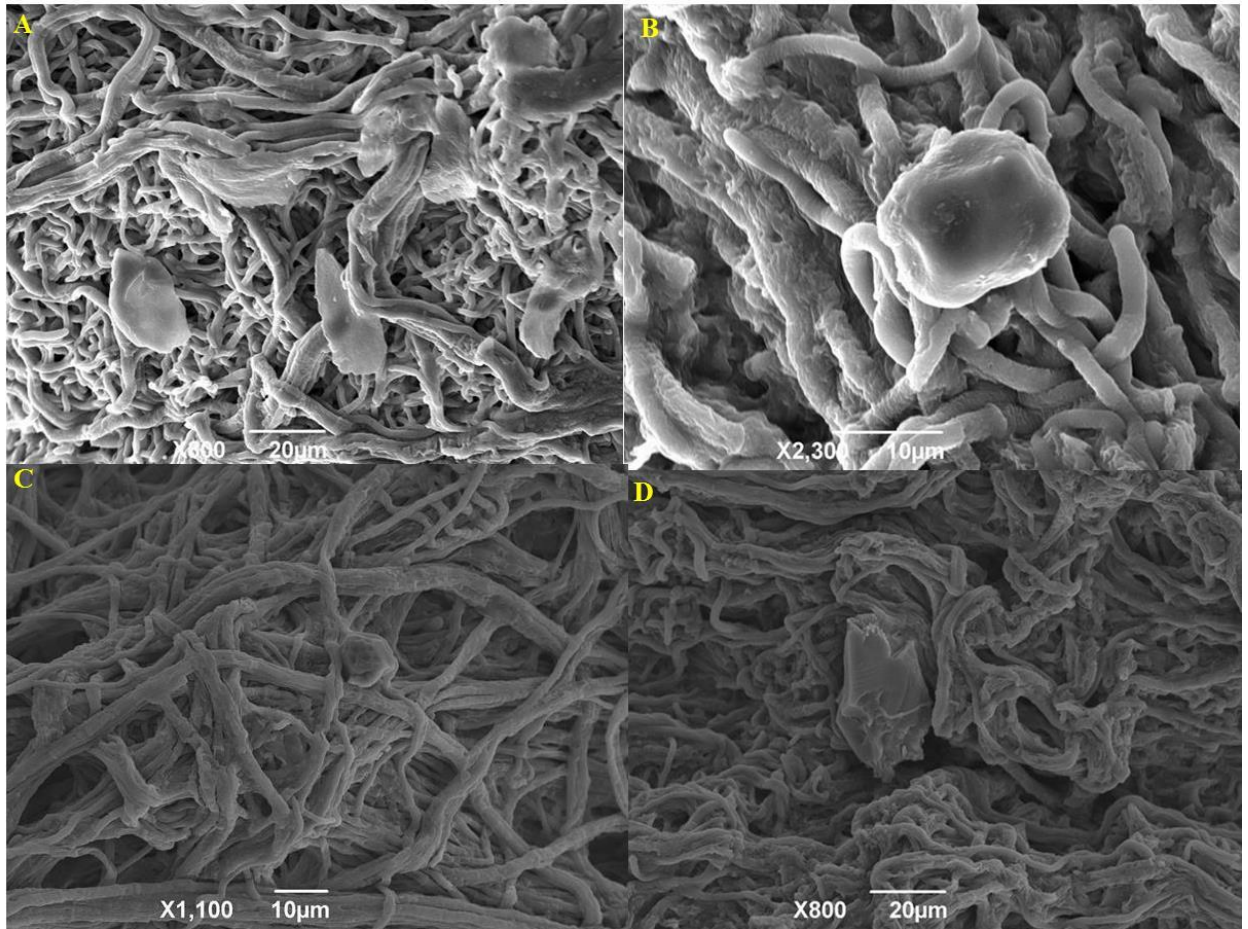


Anexo 63. Análise cromatográfica por CG-FID dos componentes do óleo essencial da Cultivar Maria Bonita submetida ao suprimento com 100 Kg N.ha⁻¹ de amônio com a co-injeção dos padrões de alcanos

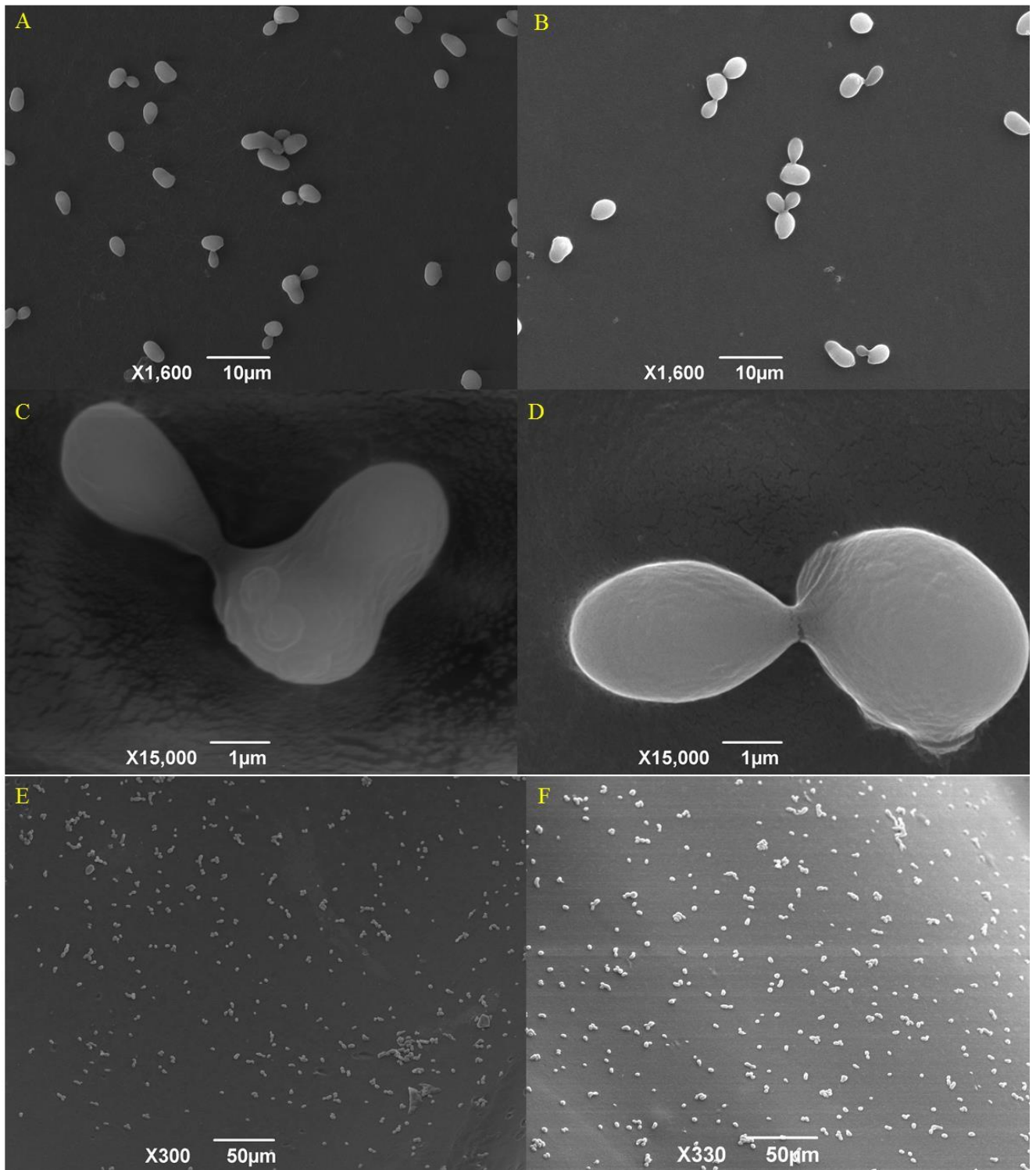
Anexo C – Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura



Anexo 64. Imagens de microscópio eletrônico de varredura no fungo *Rhizoctonia solani* com aplicação de 6 mg.mL^{-1} de linalol. A e B: Observações no segundo dia de experimento. C e D: Observações no quarto dia de experimento



Anexo 65. Imagens em microscopia eletrônica de varredura do fungo *Fusarium oxysporum* com aplicação de 6 mg.mL^{-1} de linalol. A e B: observações obtidas no segundo dia de experimento. C e D: observações obtidas no quarto e sexto dia de experimento, respectivamente.



Anexo 66. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do fungo *Sacharomyces cerevisiae*. A e C: aplicação de 0,5 mg.mL⁻¹ de óleo essencial, B e D: aplicação de 2,0 mg.mL⁻¹ de óleo essencial, E: aplicação de 6,0 mg.mL⁻¹ de óleo essencial e F: aplicação de 6,0 mg.mL⁻¹ de linalol