

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA FOLIAR, ÓLEO ESSENCIAL E 4-
NEROLIDILCATECOL DE *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.**

RAQUEL SOUZA MATTANA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Horticultura).

BOTUCATU-SP
Maio - 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA FOLIAR, ÓLEO ESSENCIAL E 4-
NEROLIDILCATECOL DE *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.**

RAQUEL SOUZA MATTANA

Orientador: Prof. Dr. Lin Chau Ming

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU - SP

Maio - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M435p Mattana, Raquel Souza, 1980-
Produção de biomassa foliar, óleo essencial e 4-Nerolidicatecol de *Pothomorphe umbellata*(L.) Miq./ Raquel Souza Mattana. - Botucatu : [s.n.], 2009.
xii, 138 f. : il., color., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2009

Orientador: Lin Chau Ming

Co-orientador: Márcia Ortiz Mayo Marques

Inclui bibliografia

1. Planta medicinal. 2. Densidade de plantas. 3. Sazonalidade. 4. Idade de colheita. 5. Secagem. I. Ming, Lin Chau. II. Marques, Márcia Ortiz Mayo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PRODUÇÃO DE BIOMASSA FOLIAR, ÓLEO ESSENCIAL E 4-NEROLIDIL-
CATECOL DE *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq."

ALUNA: RAQUEL SOUZA MATTANA

ORIENTADOR: PROF. DR. LIN CHAU MING

CO-ORIENTADOR: PROFª DRª MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

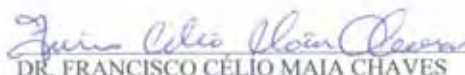
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. LIN CHAU MING



PROF. DR. LUÍS VITOR SILVA DO SACRAMENTO



DR. FRANCISCO CÉLIO MAIA CHAVES



PROF. DR. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO



DRª DÉBORA CASTELLANI

Data da Realização: 08 de maio de 2009.

DEDICO

Ao meu amor, amigo e companheiro Luis Rodrigo, quem compartilhou as alegrias e sofrimentos, trabalhou e se dedicou em cada dia do meu doutorado, sempre junto, confiante, paciente e incansável.

e

Aos meus pais, José Carlos e Regina e irmãos Débora e Davi, pelo amor, carinho, apoio confiança e compreensão em todos os momentos de minha vida.

OFEREÇO

A todos os produtores, pesquisadores e interessados em plantas medicinais, em especial em *Pothomorphe umbellata*.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas bênçãos de cada dia e pela certeza de sua presença em cada instante, por se fazer presente em minha vida, de modo especial naqueles em que as dificuldades surgiram em meu caminho, permitindo-me superá-las.

Aos amigos, orientador e co-orientadora, Dr. Lin Chau Ming e Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, pelos anos de convivência, ensinamentos, amizade, confiança, dedicação, paciência, pelo exemplo de pessoas e profissionais, de caráter, de sabedoria, de luta e, principalmente pela atenção que sempre me dispensaram.

À Dra. Shirlei Scramim, pela dedicação, paciência e auxílio no isolamento do princípio ativo.

Às pesquisadoras Sônia e Maria Rosa da EMBRAPA – Meio Ambiente pela disponibilidade e prontidão na realização das análises fitoquímicas do 4-nerolidilcatecol.

As amigas do Laboratório de Produtos Naturais do Centro P&D de Recursos Genéticos Vegetais, Maria Aparecida, Lenita e Roselaine pela disponibilidade, pelo apoio e amizade, e pelo auxílio na realização das análises fitoquímicas.

Ao amigo Chrystian pela amizade, convivência e o auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos Lívia, Jomar, Miudinha e Bacalhau pelo auxílio nas coletas do material vegetal e também aos produtores das regiões coletadas pela doação das plantas.

Aos amigos e técnicos agrícolas Marcela e Ariovaldo pelo auxílio durante toda a condução dos experimentos no campo.

Aos funcionários e docentes da FCA, que estiveram envolvidos neste trabalho, em particular à Elisabete Martins, pela amizade, disponibilidade e prontidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Horticultura) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida.

Aos meus familiares, pai, mãe, meus irmãos, avós, primos e tios, apesar da distância, pelo apoio constante e fortaleza.

Enfim, às pessoas e amigos que estiveram presentes, por curtos ou longos períodos, com dicas, experiências, convivência, testemunhos e ajuda.

A todos, Muito Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. OBJETIVO	8
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
5.1. A família Piperaceae e a espécie <i>Pothomorphe umbellata</i>	9
5.2. Fitoquímica de <i>P.umbellata</i>	14
5.3. Aspectos agrônômicos de plantas medicinais.....	19
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
6.1. Coleta de material botânico.....	23
6.2. Propagação do material vegetal.....	24
6.3. Preparo da área experimental.....	26
6.4. Plantio das mudas e condução dos experimentos.....	27
6.5. Experimento 1: Populações de plantas x Sazonalidade.....	29
6.6. Experimento 2: Espaçamento entre plantas x Idades de colheita.....	30
6.7. Experimento 3: Horários de colheita x Temperaturas de Secagem.....	33
6.8. Variáveis avaliadas.....	34
6.8.1. Variáveis biométricas.....	34
6.8.2. Variáveis fitoquímicas.....	35
6.9. Análise dos resultados.....	38
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
7.1. Experimento 1: Populações de plantas x Sazonalidade	39
7.1.1. Produção de biomassa foliar e variáveis relacionadas.....	39
7.1.2. Rendimento e composição química do óleo essencial.....	50
7.2. Experimento 2: Espaçamento entre plantas x Idades de colheita.....	63
7.2.1. Produção de biomassa foliar e variáveis relacionadas.....	63
7.2.2. Rendimento e composição química do óleo essencial.....	71
7.2.3. Rendimentos do extrato bruto foliar e do 4-nerolidilcatecol no extrato.....	79

7.3. Experimento 3: Horário de colheita x Temperatura de Secagem.....	85
7.3.1. Rendimentos do extrato bruto foliar e do 4-nerolidilcatecol.....	85
7.3.2. Rendimento e composição química do óleo essencial.....	91
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
9. CONCLUSÕES.....	100
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
11. APÊNDICE.....	121

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA	PÁG
1	<i>P. umbellata</i> cultivada (A); Detalhe do pecíolo e das inflorescências (B); Detalhe da folha (C)..... 11
2	Vias metabólicas e substâncias sintetizadas a partir da glicose, no metabolismo secundário das plantas..... 15
3	Substâncias isoladas de <i>P. umbellata</i> 17
4	Propagação das estacas em telado com 50% de sombreamento (A); Detalhe da cobertura com folhas de palmeiras (B); Detalhe da estaca no substrato com início da brotação (C)..... 25
5	Plantio das mudas de <i>P. umbellata</i> no campo. Abertura das covas (A); Adubação das covas (B); Sistema de irrigação e sombreamento das mudas plantadas (C).....28
6	Vista geral da colheita das plantas de <i>P. umbellata</i> após seis meses do plantio (A); Procedimentos durante a colheita (B); Vista geral das plantas colhidas (C).....32
7	Curva de calibração do padrão isolado 4- nerolidilcatecol.....38
8	Altura de plantas (cm) de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade..... 42
9	Número de ramos de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade..... 44
10	Número de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade..... 45
11	Biomassa fresca (gramas) de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade..... 47
12	Biomassa seca (gramas) de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade..... 48
13	Rendimento de óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade..... 51
14	Proporção média relativa das principais substâncias químicas presentes no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade 59
15	Análise de Componentes Principais (ACP) de quatro populações de plantas e quatro estações do ano baseada nas substâncias químicas do óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> . Onde: BT= Barra do Turvo, JD=Jundiaí, IP=Iporanga, PQ=Piquete, IV=inverno, PR=primavera, OU=outono, VE= verão..... 61
16	Rendimento do extrato bruto (%) nas folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita..... 80
17	Rendimento de 4-nerolidilcatecol (%) no extrato bruto das folhas de <i>P.</i> <i>umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita..... 81
18	Estrutura química da molécula de 4-nerolidilcatecol..... 89
19	Relação dos rendimentos do extrato bruto (%) e do 4- nerolidilcatecol.....90

	(%) em folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos horários de colheitas e temperaturas de secagem.....	
20	Proporções relativas (%) das substâncias <i>E</i> -cariofileno (a), <i>E</i> -nerolidol (b), α -selineno (c) e germacreno-D (d) em folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos horários de colheitas e diferentes temperaturas de secagem.....	95
21	Placa cromatográfica contendo as frações isoladas do extrato metanólico de raízes de <i>P. umbellata</i>	
22	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da substância 4-nerolidilcatecol.....	
23	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da substância 4-nerolidilcatecol identificada por Perazzo (2005).....	
24	Placa cromatográfica comparativa contendo as 12 frações coletadas em cromatografia em coluna, a fração 2A identificada na RMN e as 3 frações coletadas na cromatografia preparativa.....	
25	Espectro de massas da substância 4-nerolidilcatecol identificada por CLAE – EM.....	
26	Temperaturas mínima, média e máxima registradas (C ⁰) na Fazenda Experimental Lageado – UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008.....	
27	Precipitação pluviométrica (mm) registrada na Fazenda Experimental Lageado – UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008.....	
28	Umidade relativa (%) registrada na Fazenda Experimental Lageado – UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008.....	
29	Radiação solar (cal.cm ⁻²) registrada na Fazenda Experimental Lageado-UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008.....	

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁG
1	Análise de macronutrientes e micronutrientes do solo na área experimental localizada no pomar do Setor de Horticultura do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP/Botucatu, SP.....	26
2	Valores de F das variáveis biométricas: altura de plantas (ALT), número de folhas (NF), número de ramos (NR), área foliar (AF), biomassa fresca de folhas (BFF) e seca de folhas (BSF) de plantas de <i>P. umbellata</i> , em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	40
3	Média das variáveis: altura (cm), número de ramos e folhas, biomassa fresca e seca de folhas (gramas) de plantas de <i>P. umbellata</i> , em função de diferentes populações de plantas.....	41
4	Média da altura de plantas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	41
5	Média do número de ramos de plantas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	43
6	Média do número de folhas de plantas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	44
7	Média da biomassa fresca de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	46
8	Média da biomassa seca de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	47
9	Valores de F das variáveis fitoquímicas: rendimento de óleo essencial (ÓLEO), β -elemeno (BEL), <i>E</i> -cariofileno (ECA), germacreno-D (GED), α -selineno (ASE), γ -cadineno (GCA), <i>E</i> -nerolidol (ENE) e óxido de cariofileno (OCA), em folhas de <i>P. umbellata</i> , em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	50
10	Rendimento de óleo essencial (%) nas folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	51
11	Rendimento de β -elemeno (%) no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	54
12	Rendimento de germacreno-D (%) no óleo essencial de folhas de <i>P.umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	55
13	Rendimento de α -selineno (%) no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	56
14	Rendimento de <i>E</i> -nerolidol (%) no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da	56

	sazonalidade.....	
15	Rendimento de <i>E</i> -cariofileno (%) no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	57
16	Rendimento de óxido de cariofileno (%) no óleo essencial de folhas de <i>P.umbellata</i> em função das populações de plantas e da sazonalidade.....	57
17	Valores de F das variáveis biométricas: altura de plantas (ALT), número de folhas (NF), número de ramos (NR), área foliar (AF), biomassa fresca de folhas (BFF) e seca de folhas (BSF) de plantas de <i>P. umbellata</i> , em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	63
18	Médias das variáveis biométricas: altura de plantas em centímetros (ALT), número de folhas (NF), número de ramos (NR), área foliar em cm ² (AF), biomassa fresca (BFF) e seca de folhas (BSF) em gramas, de plantas de <i>P. umbellata</i> , em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	64
19	Média da altura de plantas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	65
20	Média do número de ramos de plantas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	66
21	Média do número de folhas de plantas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	67
22	Média da área foliar (cm ²) de plantas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	68
23	Média da massa de matéria fresca (gramas) de folhas de <i>P. umbellata</i> em função de dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	68
24	Média da massa de matéria seca (gramas) de folhas de <i>P.umbellata</i> em função de espaçamento de plantas e épocas de colheitas.....	69
25	Produção (Kg ha ⁻¹) biomassa fresca e seca de <i>P. umbellata</i> em função de dos três espaçamentos utilizados no experimento.....	69
26	Valores de F das variáveis fitoquímicas do óleo essencial, rendimento (ÓLEO) e principais substâncias: delta-elemeno (DEL), trans-cariofileno (ECA), gama-muuroleno (GMU), germacreno-D (GED), alfa-selineno (ASE), delta-cadineno (DCA), e espatulenol (ESP), em folhas de <i>P. umbellata</i> , em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	71
27	Rendimento de óleo essencial (%) nas folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheitas.....	72
28	Produção biomassa seca e óleo essencial nas folhas de <i>P. umbellata</i> (Kg ha ⁻¹) em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.....	74
29	Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> (L.) em função dos espaçamentos entre76	

	plantas.....	
30	Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> (L.) em função das idades de colheita.....	76
31	Valores de F das variáveis fitoquímicas: rendimento de extrato bruto foliar (EB) e do 4-nerolidilcatecol (4NC) no extrato bruto foliar de <i>P. umbellata</i> , em função os espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.....	79
32	Rendimento de extrato bruto (%) de folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.....	79
33	Rendimento de extrato bruto (%) de folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.....	81
34	Produção de biomassa seca, extrato e 4-nerolidilcatecol (kg.ha ⁻¹) nas folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.....	84
35	Valores de F das variáveis: rendimento de extrato foliar (EXT), 4-nerolidilcatecol (4NC), rendimento de óleo essencial (ÓLEO), trans-cariofileno (ECA), germacreno-D (GED), alfa-selineno (ASE) e trans-nerolidol (ENE), em folhas de <i>P. umbellata</i> , em função de horários de colheita e temperaturas de secagem.....	85
36	Rendimento de extrato bruto (%) de folhas de <i>P. umbellata</i> em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem.....	86
37	Rendimento de 4-Nerolidilcatecol (%) em folhas de <i>P. umbellata</i> em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem.....	87
38	Produção de 4-Nerolidilcatecol (mg/gr de extrato) em folhas de <i>P.umbellata</i> em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem.....	88
39	Rendimento de óleo essencial (%) em folhas de <i>P. umbellata</i> em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem.....	91
40	Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> (L.) em função de horários de colheitas.....	93
41	Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> (L.) em função de temperaturas de secagem.....	94
42	Rendimento dos extratos foliares de <i>P. umbellata</i> em função de tipos de solventes.....	123
43	Rendimento (%) dos extratos metanólicos de <i>P. umbellata</i> em função de quantidade de solvente, tempo e modo de extração.....	124
44	Frações 1 a 12 coletadas na coluna cromatográfica com os eluentes hexano: acetato de etila com polaridade crescente.....	129
45	Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função de horários de colheitas.....	130
46	Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função de	

	temperaturas de secagem.....	131
47	Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.....	132
48	Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> - população Piquete/SP, em função da sazonalidade.....	133
49	Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> - população Jundiaí/SP, em função da sazonalidade.....	134
50	Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> - população Iporanga/SP, em função da sazonalidade.....	135
51	Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de <i>P. umbellata</i> - população Barra do Turvo/SP, em função da sazonalidade.....	136

1. RESUMO

A espécie medicinal *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae), conhecida popularmente como pariparoba e/ou capeéba, é uma planta perene, autóctone, característica da Mata Atlântica, possui um amplo potencial medicinal e diversas atividades farmacológicas de interesse industrial, dentre elas, a ação antioxidante, atribuída à substância 4-nerolidilcatecol (4NC). O objetivo deste trabalho foi realizar estudos agronômicos e fitoquímicos, visando obter um protocolo inicial com informações sobre espaçamento de plantas, idade de colheita, variação interpopulacional, sazonalidade, horário de colheita e temperatura de secagem, para um cultivo sistematizado que assegure uma produção regular e padronizada, e dessa forma, contribua para conservação da espécie. Para tanto foram realizados três experimentos durante o período de 2006 a 2008. Experimento 1: espaçamento de plantas (0,5 x 0,5; 0,75 x 0,5; 0,5 x 1,0 metros) x idade de colheita (6 meses e 12 meses) em esquema fatorial com parcelas sub-divididas no tempo com plantas procedente de Jundiaí/SP; Experimento 2: população de plantas coletadas no Estado de São Paulo (Piquete, Iporanga, Barra do Turvo e Jundiaí) x sazonalidade (inverno/07, primavera/07, verão/08 e outono/08), com o mesmo delineamento estatístico anterior; Experimento 3: horário de colheitas (6:00; 9:00; 12:00; 15:00, 18:00 e 21:00 horas) x temperatura de secagem (folha fresca, 40°C; 60°C e 80°C) em esquema fatorial, utilizando plantas procedentes de Piquete/SP. Foram avaliadas variáveis biométricas (altura de plantas, número de ramos e folhas, área foliar, biomassa fresca e seca de folhas) e fitoquímicas (teor e composição química do óleo essencial, rendimento de extrato bruto foliar e do composto 4-nerolidilcatecol no extrato). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de

Scott-Nott. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o espaçamento de plantas não apresentou respostas significativas para nenhuma das variáveis estudadas, embora a densidade de 40.000 plantas ha⁻¹ (0,5 x 0,5m) tenha proporcionado maior quantidade de biomassa foliar, óleo essencial e extrato bruto foliar. As plantas colhidas aos 6 meses de cultivo apresentaram maiores produções de biomassa fresca e seca, óleo essencial e extrato bruto foliar; já o teor de 4-nerolidilcatecol foi maior nas plantas colhidas aos 12 meses. As proporções relativas das principais substâncias químicas do óleo essencial foram influenciadas pela idade de colheita, sendo que os teores de δ -elemeno, germacreno-D e α -selineno foram maiores nas plantas colhidas aos 6 meses, o inverso ocorreu para os compostos, γ -muuroleno, δ -cadineno e espatulenol. A população de Jundiá apresentou as maiores produções de biomassa foliar fresca e seca e os maiores teores de óleo essencial. A composição química do óleo essencial não variou entre as populações de plantas e as estações do ano, mas sua proporção relativa sim: germacreno-D foi o composto majoritário na população de Jundiá e o *E*-nerolidol nas populações de Piquete, Barra do Turvo e Iporanga. As estações do outono e verão apresentaram maiores produções de biomassa fresca e seca das folhas. Os horários de colheita e as temperaturas de secagem influenciaram as variáveis fitoquímicas estudadas na população de Piquete. O rendimento do extrato bruto foliar e o teor de 4-nerolidilcatecol foram maiores no período da tarde, enquanto que o teor do óleo essencial foi maior nos períodos da manhã e da noite. As proporções relativas dos compostos *E*-cariofileno e *E*-nerolidol foram maiores no período da manhã e o aumento da temperatura de secagem provocou uma inversão da proporção relativa desses compostos: o *E*-cariofileno diminuiu e o *E*-nerolidol aumentou. As folhas frescas apresentaram os maiores rendimentos do extrato bruto foliar e do composto 4-nerolidilcatecol, já o maior teor de óleo essencial ocorreu nas folhas secas a 40°C.

Palavras-chave: planta medicinal, densidade de plantas, sazonalidade, idade de colheita, secagem.

PRODUCTION OF LEAF BIOMASS, ESSENTIAL OIL AND 4-NEROLIDYL CATECHOL OF *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Botucatu, 2009. 138p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RAQUEL SOUZA MATTANA

Adviser: LIN CHAU MING

Co-adviser: MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

2. SUMMARY

The medicinal specie *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae), known popularly as pariparoba and/or capeéba, is a perennial plant, autochthonous and Atlantic Forest characteristic, has a large potential medicinal, with a range of pharmacological activities of industrial interest, including antioxidant activity, attributed to substance 4-nerolidylcatechol (4NC). The objective of this work was to accomplish agronomical and phytochemistry studies, to obtain a protocol with information initial spacing of plants, harvest age, interpopulation variation, seasonal variation, time harvest and drying temperature, to a culture that ensures a systematic and regular production standardized, and thus contribute to species conservation. For this three experiments were accomplished during the period 2006 to 2008. Experiment 1: plant spacing (0.5 x 0.5, 0.75 x 0.5, 0.5 x 1.0 meters) x age harvest (6 months and 12 months) in a factorial scheme with “split-plot in the time” with plants at Jundiaí/SP, Experiment 2: Plants Population (Piquete-SP, Iporanga-SP, Barra do Turvo-SP and Jundiaí-SP) x seasonality (winter/07, spring/07, summer/08 and fall/08) with the same previous statistical design; Experiment 3: Time harvest (6:00, 9:00, 12:00, 15:00, 18:00 and 21:00 hours) x drying temperature (fresh leaf, 40C, 60C and 80C) in factorial scheme, with plants at Piquete/SP. They were evaluated biometric variables (plant height, number of branches and leaves, leaf area, fresh and dry leaves biomass) and phytochemistry (yield and chemical composition of essential oil and yield crude leaf extract and the compound 4-nerolidylcatechol in extract). Data were submitted to variance analysis and Scott-Nott test. According to results, that the plants spacing showed no significant responses any variables studied, but the density of 40,000 plants.ha⁻¹ (0.5 x 0.5 m) provided the major productions of fresh and dry biomass, essential oil and crude leaf extract. Plants harvested at 6 months obtained higher yields of fresh and dry biomass, essential oil and leaf crude extract,

already the 4-nerolidylcatechol yield was higher in plants harvested at 12 months. The relative proportions chemical substances of the essential oil were influenced by the age of harvest, and the compounds δ -elemene, germacrene-D and α -selinene were higher in plants harvested at 6 months and reverse occurred for the compounds γ -muurolene, δ -cadinene and spatulenol. The Jundiaí population showed higher production fresh and dry leaf biomass, and higher yield of essential oil. The chemical composition of essential oil was not influenced by the plants populations and sazonalidade, but this relative proportions yes, the Jundiaí population presented as majority compound germacrene-D, while Piquete, Barra do Turvo, Iporanga populations presented the *E*-nerolidol. The fall and summer seasons of provided major productions fresh and dry leaves biomass. Os horários de colheita e as temperaturas de secagem influenciaram as variáveis fitoquímicas estudadas na população de Piquete. The yield crude leaf extract and 4-nerolidylcatechol content were higher in the afternoon, since essential oil yield was higher in the morning and evening. The relative proportions compounds *E*-nerolidol and *E*-caryophyllene were higher in the morning and increase drying temperature there was reversal in relative proportion these compounds: *E*-caryophyllene decreasing and *E*-nerolidol increasing. The crude leaf extract yield and compound 4-nerolidylcatechol was higher in fresh plants; while higher yield of essential oil was in leaves drying at 40°C.

Key-words: medicinal plant, density plants, seasonality, harvest age, drying.

3. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é um importante recurso terapêutico no tratamento da saúde humana, principalmente em países em desenvolvimento, cuja população utiliza-se da medicina caseira como alternativa aos medicamentos sintéticos de alto custo e segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS (2001), esse índice chega a 80% da população mundial.

O conhecimento popular é uma ferramenta na descoberta de novos fitoterápicos e medicamentos. Cerca de 75% dos principais medicamentos sintéticos comercializados foram obtidos a partir de estudos realizados sobre informações originadas da medicina popular, demonstrando ser altamente objetivo e eficaz (Ming, 1994), como é o caso dos princípios ativos emetina, vincristina, quinino, diosgenina, pilocarpina, dentre outros, que talvez não estivessem em uso na medicina moderna se não fosse o uso tradicional que comunidades locais faziam das plantas.

Os mercados nacional e internacional de plantas medicinais vêm se ampliando nos últimos anos; no Brasil, as vendas de fitoterápicos atingem US\$ 260 milhões, na Europa o mercado anual é de US\$ 6 bilhões e apenas a Alemanha responde por mais da metade desse valor e onde 80% dos médicos prescrevem fitoterápicos e 84% deles são vendidos nas

farmácias. Nos Estados Unidos, os fitoterápicos são vendidos como suplementos alimentares e representam um mercado de US\$ 5 bilhões anuais e cerca de 30% dos adultos utilizam fitoterápicos (Agnol, 2002). Países como Japão e alguns outros da Ásia também acumulam vendas e importações volumosas (Garcia et al., 2000).

Paralelamente ao crescimento do mercado consumidor, observa-se um ritmo acelerado das pesquisas na área de bioprospecção de genes e de novas moléculas, por parcerias entre instituições públicas e empresas privadas farmacêuticas, de perfumaria e cosméticos, em busca de informações sobre a química, a bioquímica e a farmacologia desses produtos naturais. Em consequência das descobertas científicas do potencial medicinal de diversas espécies vegetais, sobretudo as nativas, e do aumento do uso e comercialização do material vegetal, os recursos genéticos dessas espécies encontram-se ameaçados pelo extrativismo elevado, cuja atividade predatória tem comprometido a perpetuação e dificultado estudos relacionados à conservação e preservação dessas espécies (Vieira et al., 2002).

A maioria das plantas medicinais brasileiras é coletada em seu habitat natural, e carece de estudos científicos básicos, como é o caso de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., conhecida popularmente como pariparoba ou caapeba, espécie perene, autóctone, característica da Mata Atlântica (Reitz, 1978) e que, atualmente vem sofrendo pressão antrópica regular (Vieira et al., 2002).

O uso da pariparoba foi oficializado na primeira edição da Farmacopéia Brasileira, na qual as raízes secas foram registradas como droga. Seu potencial terapêutico está na cura de feridas e inflamações em geral. Dentre os usos etnofarmacológicos descritos para a espécie estão: tratamento de epilepsia (Coimbra, 1958), disfunção hepática, bronquite asmática, cicatrizante e antiinflamatório (De Feo, 1991), febrífugo (Di Stasi et al., 1993), sedativa e analgésica (Hammer & Johns, 1993), repelente de insetos (Chartol, 1964) e anti-malária (Amorim et al, 1988).

Estudo realizado por Mattana (2005) com o óleo essencial de *P. umbellata* demonstrou a predominância de compostos pertencentes à classe dos monoterpenos e sesquiterpenos. Estudos têm demonstrado que os óleos essenciais brutos e/ou seus constituintes apresentam importantes atividades farmacológicas, como é o caso do óleo essencial da erva-baleeira (*Cordia verbenacea* DC.), empregado na fabricação do produto comercial “Acheflan”,

indicado para tendinite crônica e dores musculares, considerado primeiro fitomedicamento 100% brasileiro registrado pela ANVISA e desenvolvido pelo Laboratório Farmacêutico Aché.

Estudos fitoquímicos de *P. umbellata* levaram ao isolamento de alguns princípios ativos, como a N-benzoilmescalina, substância com atividade contra úlcera gástrica induzida por *Helicobacter pylori* (Isobe et al., 2002) e o 4-nerolidilcatecol (Kijoa et al., 1980).

Esta última substância merece atenção especial, devido ao seu alto potencial antioxidante comprovado cientificamente. Testes *in vitro* (Barros et al., 1997) e *in vivo* (Ropke, 1999), demonstraram atividade antioxidante 2,5 vezes superior ao alfa-tocoferol (vitamina E), indicando-a como fármaco potencial para condições patológicas onde ocorra participação de estresse oxidativo (Barros et al., 1997; Desmarchelier et al., 1997) e no uso de formulações cosméticas, com o objetivo de combater os efeitos nocivos causados por radicais livres (Ropke, 2003a). Outras propriedades farmacológicas têm sido conferidas a esta substância: anti-malárica (de Ferreira-da-Cruz et al., 2000), inibitória da replicação do HIV (Gustafson et al., 1992), analgésica (Bioka & Abena, 1990) e antimicrobiana (Mongelli et al., 1999).

No entanto, apesar dos vários estudos científicos que confirmam diversas atividades farmacológicas atribuídas às substâncias presentes nesta espécie, evidenciando desta maneira, seu grande potencial medicinal, estudos na área agronômica sobre cultivo e manejo desta espécie ainda são muito incipientes.

Perante o elevado potencial medicinal atribuído a *P. umbellata*, além do grande interesse da empresa privada, e ainda, ressaltando que é uma espécie nativa, não cultivada, tornam-se necessários e urgentes estudos agronômicos conjugados aos fitoquímicos que forneçam informações relevantes para um cultivo sistematizado que assegure uma produção regular e padronizada, e dessa forma, contribua para sua conservação.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Realizar estudos agronômicos e fitoquímicos, visando obter um protocolo inicial contendo informações para um cultivo sistematizado de *Pothomorphe umbellata* L. que assegure uma produção regular e padronizada, e dessa forma, contribua para sua conservação e/ou exploração.

4.2. ESPECÍFICOS

1. Avaliar a produção de biomassa foliar, teor e composição química do óleo essencial, rendimento de extrato bruto de folhas e do composto 4-nerolidilcatecol no extrato em função de espaçamentos de plantas e idades de colheita;
2. Avaliar a produção de biomassa foliar, teor e composição química do óleo essencial em função de diferentes populações de plantas e da sazonalidade;
3. Avaliar o teor e composição química do óleo essencial, rendimento de extrato bruto de folhas e do composto 4-nerolidilcatecol no extrato em função do horário de colheita e de secagem das folhas.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1. A família Piperaceae e a espécie *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.

A família Piperaceae foi descrita em 1829 pelo botânico J.H.F. Link, compreende representantes herbáceos, arbóreos e algumas epífitas e sua distribuição geográfica ocorre por todo o globo terrestre, na faixa compreendida entre os Trópicos de Câncer e de Capricórnio (Yuncker, 1973). No Brasil está representada pelos gêneros *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia*, *Pothomorphe* e *Sarcorrhachis*, com um total aproximado de 460 espécies (Barroso et al., 2004), sendo *Piper* e *Peperomia* os mais representativos.

O gênero *Pothomorphe* foi estabelecido por Miquel em 1840 e é constituído por duas espécies, *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Pothomorphe peltata* (L.) Miq., que se diferenciam macroscopicamente pela presença de folhas peltadas em *P. peltata* (Yuncker, 1973). Este gênero é caracterizado por plantas providas de folhas largas de contorno arredondado, base cordiforme ou peltada e ápice acuminado. As flores são reunidas em inflorescências densas espiciformes e situadas nas axilas dos pecíolos dilatados em bainhas (Reitz, 1978). *Pothomorphe* se distingue de *Piper* por possuir inflorescências compostas de 3-7 espigas reunidas, axilares às folhas e pelo hábito subarbustivo, ao contrário do gênero *Piper*, cujas inflorescências são solitárias, simples, terminais, opostas às folhas e possui hábito tanto arbustivo quanto arbóreo (Boza, 1998; Gentry, 1993; Moraes, 1983; Moraes et al., 1986/1987).

A espécie *P. umbellata* (sinónimas *Piper umbellatum* L. e *Heckeria umbellata* L.) é um subarbusto perene, ereto, multicaule com os ramos angulosos, nodosos de cor marrom esverdeado, medindo quando adulto de 1-3 m de altura (Figura 1A). As folhas são grandes, de consistência herbácea, arredondadas, rugosas com margens inteiras, ápice subagudo e base cordiforme (Figura 1C), dotadas de glândulas translúcidas, medindo em torno de 14-24 cm de comprimento e 17-25 cm de largura; possui pecíolo puberulento, sulcado longitudinalmente, medindo de 11-22 cm de comprimento e terminando em bainha alargada que envolve o nó (Reitz, 1978; Moraes et al., 1986/1987). As inflorescências são axilares com um pedúnculo comum de 10-15 cm de comprimento, formando espigas dispostas em umbelas, medindo 6 a 9 cm de comprimento (Figura 1B) com grande número de flores pequenas congestionadas possuindo 2 estames (Peckolt & Peckolt, 1896). O fruto é glabro do tipo drupa com 0,5-0,6 mm de comprimento. Floresce nos meses de março a junho e de outubro a dezembro (Reitz, 1978). A raiz se apresenta de diferentes espessuras (5 mm a 3 cm de diâmetro), de cor pardacenta, estriada longitudinalmente com saliências verrucosas. É lenhosa, tortuosa e aromática quando fresca (Silva, 1926).

Esta espécie é típica da Mata Atlântica e ocorre nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e sul da Bahia (Riedel, 1941). Seu habitat natural é sob a sombra de grandes árvores e nas orlas das matas, as quais contribuem para seu crescimento em plenitude; é considerada esciófita seletiva (Mattana, 2005).

Popularmente, é conhecida como “caapeba”, porém este nome é indiferentemente empregado para diversas piperáceas (Riedel, 1941). No entanto, na Farmacopéia Brasileira, esta espécie está descrita como pariparoba, sendo esta denominação também atribuída a outras espécies vegetais do gênero *Piper* e *Pothomorphe*. É comum se chamar de pariparoba a espécie *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. var. *regnelli* (Pio Correa, 1926; Yunker, 1973; Machado et al., 1995). Riedel (1941) chama a atenção para o fato de inúmeras plantas serem denominadas de caapeba, plantas estas pertencentes às famílias mais diversas como: Malphigiaceae, Aristolochiaceae e, especialmente, Piperaceae.

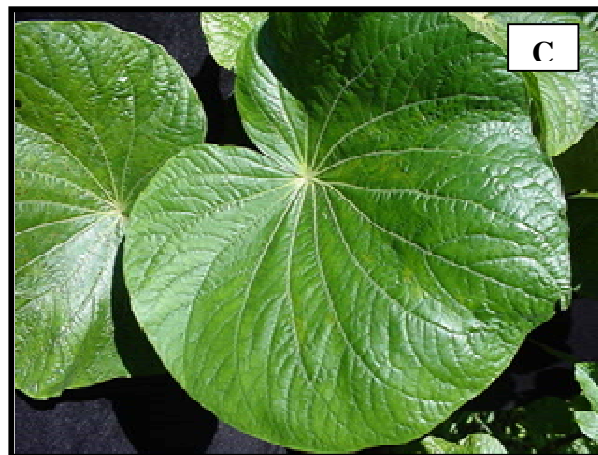


Figura 1. *Pothomorphe umbellata* cultivada em Botucatu-SP (A); Detalhe do pecíolo e das

inflorescências (B); Detalhe da folha (C).

Fotos: J.A.Marchese.

Oliveira et al. (1997), trabalhando com a identificação de plantas medicinais, afirmam que os nomes vulgares são causas de equívocos, pois, é comum designar-se mesmo nome para plantas diferentes e a mesma planta com diversos nomes em diferentes regiões.

Salatino & Silva et al. (1975) estudaram a anatomia das folhas e a química de óleo essencial de *Piper regnellii* e encontraram 0,6% de teor, sendo a composição química predominante: cariofileno, limoneno, geraniol e linalol. Estes autores alertam para o fato de esta espécie ser usada para falsificar *P. umbellata*, que é a droga oficial recomendada por Silva (1929) na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira, assim como *P. peltata* que também é confundida com *P. umbellata*.

O nome pariparoba significa “amargo que acaba com as feridas”, sendo a expressão derivada do Tupi Pari através de perebi, que significa ferida, Pa= acabar; Rob= amargo. Caapeba, por sua vez, deriva de caa= vegetal e peba= plano, como denominavam os índios as *Pothomorphe*, por terem folhas largas ou chatas (Riedel, 1941).

A parte da pariparoba que consta na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira é a raiz, fresca ou seca (Silva, 1926), porém, a folha, o caule e o fruto também apresentam propriedades farmacológicas comprovadas cientificamente. O infuso das raízes e folhas de pariparoba estimula funções estomacais e hepáticas e também é considerado diurético. O decocto de caules e folhas alivia febres e afecções nas vias respiratórias e serve para limpar feridas e banhos contra hidroxia e doenças do útero. O cataplasma das folhas age contra queimaduras superficiais, furúnculos e dores de cabeça, além de indicações para icterícia, hepatite, cólicas, hemorróidas, amenorréias, úlceras, etc. (Freize, 1933; Stellfeld, 1938; Founque, 1980; Moraes, 1986; Vieira, 1991; Di Stasi et al., 2002; Lorenzi & Matos, 2002).

As folhas da pariparoba são empregadas na medicina popular na forma de suco para o tratamento de hemoptises (expectorações sanguíneas), de coqueluche, de tosses rebeldes e de bronquites asmáticas. Tópicamente, o suco das folhas misturado com vinagre e sal é utilizado pelos sertanejos como curativo de queimaduras e em forma de loções nas contusões. As folhas frescas aquecidas agem sobre úlceras sifilíticas, o cataplasma, obtido pelo cozimento das

folhas frescas com óleo de amêndoas, é empregado nas afecções do fígado e do baço e também em obstruções das vísceras abdominais, lavagens de feridas ulcerosas, inflamações gerais, no tratamento da hepatite, cicatrizações e hidropisias (Riedel, 1941; Ming, 1995).

As sementes também têm aplicação na medicina. O pó, misturado com óleo de linhaça, é aplicado em forma de cataplasma, nas costas, na região dos pulmões para tratar pleurites (inflamação da membrana que reveste o pulmão). A mesma mistura se aplica também sobre furúnculos, para ajudar e apressar o processo maturativo. A raiz é sudorífera, antiblenorrágica, tônica, estimulante, estomáquica, diurética e febrífuga. Emprega-se por decoção, nas moléstias do fígado e do baço, na icterícia, na opilação (Berg, 1993).

Além das diversas indicações populares de uso medicinal de *P. umbellata*, a partir de 1980, iniciaram-se os estudos científicos das atividades farmacológicas já citadas empiricamente, além de novas pesquisas de possíveis atividades farmacológicas ainda não estudadas.

Pupo et al. (1988) comprovaram o efeito analgésico e sedativo dos extratos das folhas desta espécie. Kashima et al. (1998), estudando o efeito do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *P. umbellata* frente a diferentes cepas de *Micobacterium tuberculosis*, verificaram uma atividade antimicobacteriana do extrato. Os dados deste experimento indicam uma fonte potencial de novos princípios ativos no combate à doenças, como no caso da tuberculose e da AIDS. Em 2000, Mors et al. constataram efeito antiofídico na fração esteroideal dessa planta.

Trabalhos realizados *in vitro* e também em ratos mostraram atividade antimalárica nas folhas de *P. umbellata*, tanto para o protozoário *Plasmodium berghei* (Amorim et al., 1988; Ferreira-da-Cruz et al., 2000) quanto para *P. falciparum* (Adami et al., 1998). Antidehou et al. (2004) também comprovaram que as folhas desta espécie apresentam efeitos tóxicos para *Trypanosoma bruceirhodesiense* causador da doença do sono.

Perazzo et al. (2005) comprovaram que o extrato bruto das folhas de *P.umbellata* possui efeito analgésico e antiinflamatório e Braga et al. (2007) constataram que as folhas desta espécie possuem, além de atividades antifúngicas contra *Candida albicans*, efeitos contra *Leishmania amazonensis*, um dos causadores da leishmaniose.

Diante do exposto é notável que a espécie *P. umbellata* possui um forte potencial medicinal para o combate de várias moléstias de elevada importância para os humanos.

5.2. Fitoquímica de *Pothomorphe umbellata*

As espécies que compõem a família Piperaceae apresentam vários grupos de metabólitos secundários que são de grande importância econômica para as indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos (Gottlieb et al., 1981; Achenbach et al., 1984/1986). Na família Piperaceae é são encontradas diversas classes químicas como flavonóides, alcalóides pirrolidínicos e piperidínicos (Gibbs, 1974; Wu et al., 1997), benzopiranos, fenilpropanóides (Baldoqui et al., 1999), pironas, terpenos (Parmar et al., 1997), amidas (Alécio et al., 1998), lignóides (Jensen et al., 1993), óleos voláteis e lignanas (Evans, 1996).

Os metabólitos secundários correspondem a um grupo de compostos químicos formados a partir da biossíntese dos produtos provenientes do metabolismo primário, e são caracterizados por apresentarem baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas, sendo encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (Simões et al., 2007); Estes compostos atuam na defesa do vegetal, na proteção contra raios UV, na atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, além de ter efeito alelopático (Mann, 1994).

Segundo Trap & Croteau (2001), os metabólitos secundários são controlados geneticamente, porém, a quantidade e concentração variam em função de fatores ambientais, tanto bióticos quanto abióticos, dentre eles, podem-se destacar a luz (intensidade e fotoperíodo), a latitude, a temperatura (mínima, máxima e média), o solo (propriedades físicas e químicas), os ventos, a disponibilidade de água, ou mesmo, a interação entre esses fatores. Esses fatores apresentam influências distintas nas espécies sendo, portanto, necessário considerar as condições ambientais ideais para obtenção da máxima produção desses compostos em cada espécie (Palevitch, 1987).

Os principais metabólitos secundários que compõem quimicamente *P. umbellata*, são os terpenos provenientes do óleo essencial, sendo que os sesquiterpenos ocorrem em maior proporção (Mattana, 2005); também os fenilpropanóides, flavonóides e esteróides (Hammer & Jonhs, 1993).

Os fenilpropanóides são compostos aromáticos com uma cadeia lateral composta por três átomos de carbono, ligada ao anel aromático, tendo como precursor o ácido cinâmico, formado a partir do ácido chiquímico, a partir da eliminação de uma molécula de

amônia pela ação da fenilalanina amonialiase (PAL). A formação dos isoprenóides procede a partir de duas vias independentes (Figura 2). A biossíntese dos esteróides, dos triterpenos e dos sesquiterpenos ocorre a partir da via acetato/mevalonato e a via alternativa do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato origina os carotenóides, os mono e diterpenos (Figura 2). Ambas as vias utilizam o acoplamento de isopentenil-PP e dimetilalil-PP como precursores dos compostos formados (Dewick, 2002; Lichtenthaler, 1999).

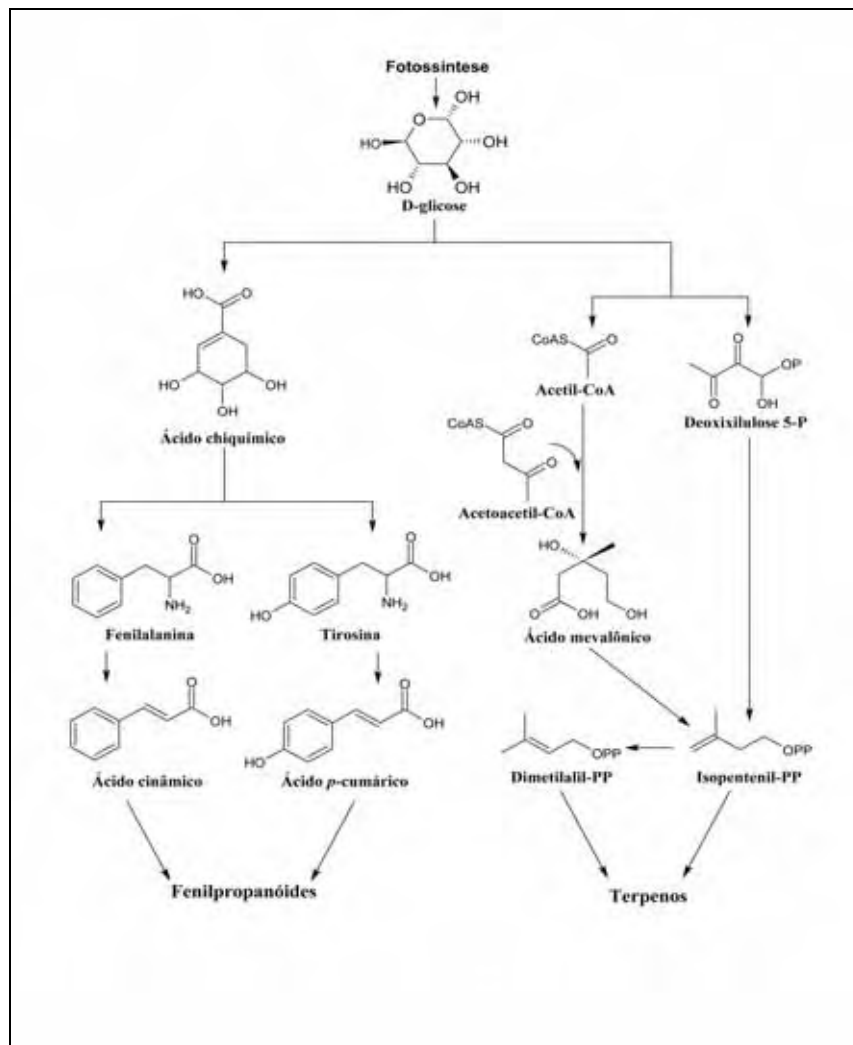


Figura 2. Vias metabólicas e substâncias sintetizadas a partir da glicose, no metabolismo secundário das plantas (Dewick, 2002).

Os carotenóides, os quais são muitos utilizados em medicamentos, cosméticos e alimentos para propiciar coloração vermelha, amarela, marrom ou violeta, também são metabólitos secundários encontrados nos cloroplastos das folhas de *P. umbellata*. Moraes et al. (1994) isolaram o prolicopeno nas folhas desta espécie, sendo este um isômero do licopeno.

A primeira substância isolada desta espécie, citada na literatura foi um fenilpropanóide denominado de 4-nerolidilcatecol (Kijoa et al., 1980) que é encontrado nas raízes e folhas, provavelmente, responsável pelas atividades anti-malária (Amorim et al., 1988), anti-plaquetária (Januário et al., 1992), anti-bacteriana (Kashima et al., 1998), inibidora da replicação do HIV (Gustafson et al., 1992) e analgésica (Bioka & Abena, 1990).

Bastos et al. (1998) isolaram um flavonóide denominado 2-hidroxi-5,7-dimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavonol das folhas de *P. umbellata*. Mais tarde foi isolado o alcalóide N-benzoilmescalina, que possui atividade antibacteriana significativa contra o *Helicobacter pylori* (Isobe et al., 2002). Outras substâncias também foram isoladas por Bergamo (2003), entre as quais duas amidas (arboeumina e arboeumina glicosilada), cinco flavonas (vitexina 2''-O- β -glucopiranosídeo, apigenina 8-C- β -D-glucopiranosídeo, orientina 8-C- β -D-glucopiranosídeo, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavona e velutina), duas lignanas (sesamina e diidrocubebina) e outro fenilpropanóide (ácido *p*-cumárico). Perazzo (2005) isolou também, além do 4-nerolidilcatecol, as substâncias oxiranemetanol, hinoquinina e os fitoesteróides, estimasterol, β -sistosterol e campesterol. Na Figura 3, observa-se a estrutura química de algumas das substâncias isoladas nesta espécie.

Dentre as substâncias isoladas em *P. umbellata*, a substância 4-nerolidilcatecol merece atenção especial, por apresentar dentre as atividades farmacológicas já citadas, a atividade antioxidante (Barros et al., 1996), que despertou interesse de diversos pesquisadores e de indústrias farmacêuticas e de cosméticos, devido à possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos e/ou cosméticos para a prevenção de fotoenvelhecimento, fator preocupante em um país tropical como o Brasil, onde a incidência de radiação ultravioleta torna-se cada vez maior, bem como o índice de câncer de pele.

A atividade antioxidante dessa substância é considerada como um "scavenger", isto é, um receptor de elétrons, superior ao de grupos bem conhecidos com a vitamina E e C ou catequinas, utilizadas como controle positivo (Perazzo, 2006). Este composto isolado ou o extrato metanólico, rico em compostos fenólicos, é apto a neutralizar radicais, tais

como, peroxil e hidroxil, reduzindo o estresse oxidativo que induz a peroxidação de lipídeos e alteração do ácido desoxiribonucléico (Desmachelier et al, 1997).

A atividade antioxidante no extrato de *P. umbellata* foi constatada tanto *in vitro* (Barros et al., 1997), quanto *in vivo* (Röpke et al., 1999, 2003a), sendo superior ao α -tocoferol, além da atividade fotoprotetora. Com relação a essa atividade, estudos constataram que o extrato de raízes padronizado protegeu e reduziu a incidência de alterações de pele de ratos submetidos à radiação solar UVB (Ropke et al., 2005). Esta substância isolada também se mostrou eficiente na inibição da atividade de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, enzimas responsáveis pela formação das rugas típicas do fotoenvelhecimento cutâneo (Ropke et al., 2006; Almeida et al., 2008). Os autores recomendam o uso desta planta para atenuação das radiações UVB solares que induzem a carcinogênese de pele. Após esta constatação e sugestão dos autores, surgiram outros trabalhos a respeito do extrato bruto padronizado de raízes, em formulações cosméticas, bem como a estabilidade química dessas formulações contendo o extrato bruto e/ou a substância isolada (Röpke et al., 2002; Silva et al., 2005; Noriega et al., 2008).

Foi demonstrada ainda, a citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol como composto bioativo antitumoral, extraído das folhas de *P. peltata*, (Mongelli et al., 1999).

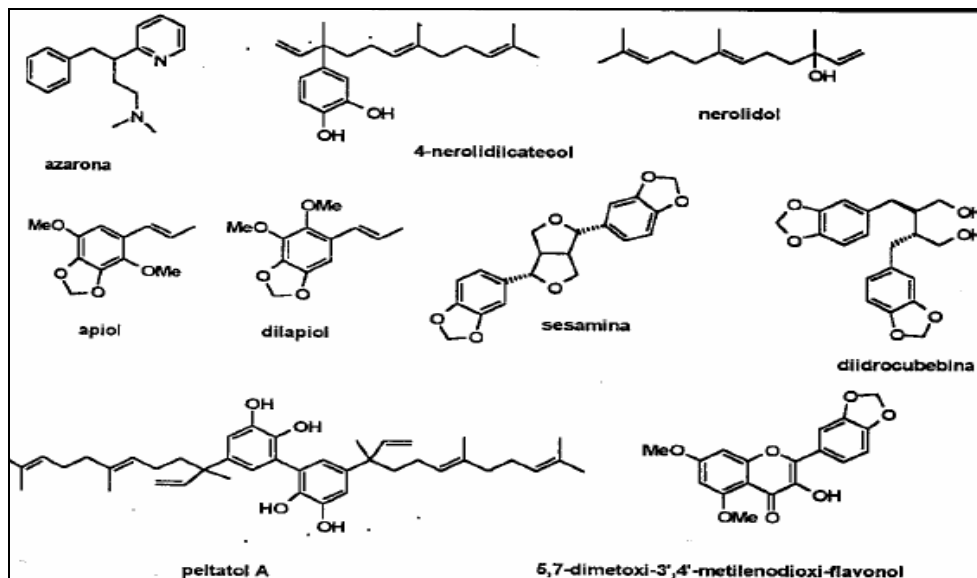


Figura 3. Substâncias isoladas de *P. umbellata*. Fonte: Rezende (2002).

Os óleos essenciais também são muito estudados em *P. umbellata*, porém, mais em relação à caracterização química propriamente dita e ao rendimento, que na atividade farmacológica atribuída a eles. No entanto, sabe-se que várias atividades farmacológicas das espécies medicinais, tais como, carminativa, antiespasmódica, estimulante do sistema digestivo, cardiovascular, secretolítica, antiinflamatória, anti-séptica, estimulante ou depressiva do sistema nervoso central e anestésica local, são atribuídas aos óleos essenciais (Simões & Spitzer, 2007). Em vista disso, eles constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas para as indústrias alimentícias, de perfumaria, farmacêuticas e afins.

Martins et al. (1998) estudando quatro espécies de Piperaceae das Ilhas de San Tomé e Príncipe na África, caracterizaram seus constituintes químicos e as substâncias encontradas em maior quantidade no óleo essencial de *P. umbellata* foram β -pineno (26,8%), α -pineno (17,6%) e *E*-nerolidol (12,4%). Luz et al. (1999) também estudaram o óleo essencial de plantas de *P. umbellata* coletadas na Universidade de São Paulo, porém identificaram as substâncias β -cariofileno (14,8%), germacreno-D (27,4%), biciclogermacreno (11,5%) e α -cadineno (13,3%), como sendo as majoritárias. Outro trabalho, também realizado com a caracterização do óleo essencial desta espécie, coletada no Parque Estadual do Rio Doce-MG (Mesquita et al., 2005), apresentou os constituintes germacreno-D (8,6%), biciclogermacreno (10,1%), *E*-cariofileno (12,0%) e *E*-nerolidol (7,0%).

Com relação ao rendimento do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* observa-se nos trabalhos realizados também com as folhas desta espécie, que há uma variação em torno de 0,1 a 0,6% no teor: 0,1% (Martins, 1998), 0,2% (Moraes, 1983), 0,4% (Luz et al., 1999), 0,3% (Mesquita et al., 2005), 0,2-0,6% (Mattana, 2005).

As variações encontradas na composição química e no rendimento dos óleos essenciais das folhas de *P. umbellata* nos diversos trabalhos citados podem estar relacionadas com diversos fatores, principalmente pelo genético (Trap & Croteau, 2001) e por ser uma espécie silvestre, essas variações podem ser bem discrepantes. Porém, a quantidade e a concentração das substâncias também podem variar em função de fatores ambientais e técnicos, ou mesmo, a interação entre esses fatores (Palevitch, 1987).

5.3. Aspectos agronômicos de plantas medicinais

Todas as literaturas citadas anteriormente fazem menção somente a atividades farmacológicas de extratos e substâncias químicas na espécie *P. umbellata*; trabalhos relacionados à área agronômica são escassos. Diante do potencial medicinal atribuído à espécie e do interesse das indústrias em desenvolver produtos farmacêuticos e cosméticos de origem vegetal e da flora nativa, a tendência é sua exploração predatória dos recursos genéticos, visto que é uma espécie nativa e não existem informações agronômicas de cultivo, o que também ocorre com a maioria das espécies medicinais nativas.

No levantamento de campo realizado em Barra do Turvo na região do Vale do Ribeira/SP, foi identificado apenas um produtor de plantas medicinais que cultivava esta espécie para comercialização por meio de um convênio chamado “Terra Medicinal” (CTM), segundo relatos do mesmo, iniciou o cultivo auxiliado pela empresa de quem era fornecedor.

Na literatura, foram encontradas poucas referências ligadas ao cultivo desta espécie. Marchese et al. (2004) e Mattana (2005) estudaram os efeitos do sombreamento e constataram que as plantas cultivadas com 30% de sombreamento obtiveram maiores valores de biomassa vegetal, óleo essencial, taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e transpiração, além de observarem que as plantas cultivadas a pleno sol apresentavam sintomas de clorose e necrose. Os autores recomendam o cultivo de *P. umbellata* juntamente com outras espécies de maior porte ou o seu manejo em sub-bosques.

A abordagem referencial sobre os aspectos agronômicos pesquisados neste trabalho foi embasada em trabalhos realizados com outras espécies medicinais referentes aos assuntos pertinentes, devido ao fato de possuir pouca literatura sobre aspectos agronômicos envolvendo a espécie,

O cultivo e/ou o manejo sustentado é de extrema importância, tanto para preservação e conservação, quanto para atingir qualidade satisfatória de princípios ativos e de biomassa vegetal das plantas medicinais. Segundo Marchese & Figueira (2005) a obtenção dessa qualidade ocorre durante todo o processo produtivo desde a identificação botânica, escolha do material vegetal, época e local de plantio, tratamentos culturais, determinação da época de colheita e cuidados na colheita e pós-colheita.

No entanto, nem sempre as condições ideais para produção de biomassa são as mesmas para produção de princípios ativos. Muitas espécies produzem maior quantidade de substâncias ativas quando são submetidas às condições de estresse, mas geralmente existe uma boa adaptação às situações que se assemelham com seu local de origem; *Achyrocline satureioides* e *Bacharis trimera* se desenvolvem melhor em solos ácidos e com pouca fertilidade (Côrrea Junior et al, 1994), *Pothomorphe umbellata* e *Piper cernum* que desenvolvem-se melhor sob sombreamento (Mattana, 2005; Reis et al., 2007), já *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Cynaras scolymus* adaptam-se melhor em condições de pleno sol, condições encontradas nos locais de origem das espécies citadas (Reis et al., 2007).

Além da adaptação das espécies ao local de cultivo, fatores como horário e época ideal para colheita são importantes para obtenção da qualidade química do produto vegetal. Em geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípios ativos no seu tecido e essa variação pode ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano.

Martins et al. (1995) mencionam que, de acordo com a substância ativa da planta, existem horários em que a concentração é maior. No período da manhã é recomendada colheita de plantas produtoras de óleos essenciais e no período da tarde de plantas com glicosídeos. Silva et al. (2003) estudando os efeitos de duas épocas e dois horários de colheitas observaram que em janeiro e no período da manhã há maior produção de óleo essencial de *Ocimum basilicum*, Fonseca et al. (2007) recomendam colher *Porophyllum ruderale* na parte da manhã para obtenção de maior teor de óleo essencial, e no final da tarde, para obtenção de maior teor de tanino.

As épocas do ano influenciam na produção e concentração de princípios ativos das espécies medicinais por meio das condições ambientais que as caracterizam como temperatura, precipitação umidade relativa e intensidade de luz. Esse conjunto de fatores é denominado de sazonalidade (Palevitch, 1987; Simões & Spitzer, 2000).

Vários autores já constataram efeitos da sazonalidade na produção de princípios ativos de plantas medicinais; Silva et al. (2006) observaram que em *Lippia Alba* o rendimento do óleo essencial foi semelhante nas estações da primavera, verão e outono, variando de 0,19 a 0,17%. Andrade & Gomes (2000) observaram que folhas de *Eucalyptus citriodora* coletadas no outono proporcionaram maiores rendimentos em óleo essencial, comparadas com as

coletadas no verão. Haber (2008) observou influência da sazonalidade na proporção relativa dos constituintes majoritários do óleo essencial de *Lychnophora pinaster*, obtendo-se uma maior proporção relativa média do trans-cinamato de metila no outono e do trans-cariofileno no verão.

Após a determinação da época e do horário ideal de colheita, o processo de secagem é uma etapa importante que demanda cuidados especiais, pois cada espécie responde de forma diferente, devido ao tipo de princípio ativo produzido, às estruturas secretoras, e sua localização dentro dos tecidos. É considerada um dos métodos mais utilizados para a preservação da qualidade não só de espécies medicinais, mas de produtos agrícolas de uma forma geral, sendo a principal vantagem, o seu baixo custo e a sua simplicidade de operação (Martinazzo et al. 2007). A secagem consiste na remoção de grande parte da água contida no produto e tem a função de estabilizar o metabolismo da planta, imobilizando a ação enzimática degradadora dos princípios ativos existentes (Corrêa Jr. et al., 1991; Hertwig, 1991).

No entanto, a temperatura ideal para a secagem do material vegetal varia conforme o órgão da planta e o princípio ativo de interesse. Segundo Corrêa Junior et al. (1994), para secagem de folhas e flores a temperatura deve estar em torno de 38°C, bem como para óleo essenciais; para cascas e raízes até 60°C. Trabalhos realizados com temperaturas de secagem no rendimento e composição química de óleos essenciais de diversas espécies mostram resultados variáveis.

Buggle et al. (1999) estudaram a influência de temperaturas de secagem na produção de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e obtiveram teores semelhantes entre as temperaturas de 30°C a 50°C, recomendando a temperatura de 50°C devido ao tempo de secagem mais rápido, Martins et al. (2000), estudando a mesma espécie, observaram que o teor de óleo essencial aumentou conforme o aumento da temperatura até 60°C, sendo que os autores atribuíram esse resultado à lignificação das paredes internas das células armazenadoras e à localização interna. Rocha et al. (2000) estudando a espécie *C. winterianus* observaram diminuição do teor de óleo essencial em temperaturas acima de 60°C.

Em relação a outras espécies produtoras de óleos essenciais, estudos realizados com *Mentha piperita* mostraram que a secagem acima de temperaturas de 40°C é altamente prejudicial ao rendimento e composição química do seu óleo essencial (Blanco et al., 2000), os mesmos autores estudando alecrim (*Rosmarinus officinalis*) observaram que temperaturas até 60°C não influenciaram na composição química, porém o teor do óleo essencial

foi reduzido acima de 40°C (Blanco et al., 2000a). Já, Borsato et al. (2005) alegam que temperaturas entre 35 e 50°C, são insuficientes para secagem de flores de camomila (*Chamomilla recutita*), além de não impedirem a perda de óleo essencial e recomendam temperatura de 80°C. Como se observa, há necessidade de estudos específicos de temperatura de secagem ideal para cada espécie.

Diante dos trabalhos apresentados, nota-se que cada espécie medicinal e aromática se comporta de forma diferenciada e específica, conforme o manejo ao qual é submetida. No caso de espécies silvestres esse fator é mais acentuado, portanto trabalhos envolvendo todos os fatores ambientais e técnicos são essenciais para se obter sucesso na produção de biomassa e princípios ativos de plantas medicinais.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Foram elaborados três experimentos de campo com material botânico de *Pothomorphe umbellata* de diferentes procedências. A metodologia utilizada para a propagação das mudas, plantio e condução no campo foi padronizada para todos os experimentos, alterando apenas os tratamentos utilizados.

6.1. Coleta de material botânico

Durante os meses de agosto e setembro de 2006, foram realizadas quatro coletas de material vegetal em quatro populações distintas de *P. umbellata*, com o intuito de estabelecer os estudos em campo, partindo de mudas propagadas por estacas.

No mês de agosto de 2006, foram coletadas duas populações nos municípios de Iporanga e Barra do Turvo, pertencentes à região do Vale do Ribeira no Sul do Estado de São Paulo; em ambos locais as plantas foram coletadas em capoeiras. No mês de setembro de 2006, foram realizadas mais duas coletas de material vegetal nos municípios de Piquete, na região do Vale do Paraíba no Estado de São Paulo, onde plantas foram coletadas em uma encosta de morro parcialmente sombreadas e, no município de Jundiaí no interior do Estado, foram coletadas nas bordas de uma mata na orla de uma estrada vicinal.

O material vegetal coletado em cada população foi colocado em sacos de polietileno umedecidos com água, para manutenção da umidade, transportado ao Laboratório de Plantas Medicinas do Departamento de Produção Vegetal da UNESP/Botucatu e acondicionado

em câmara fria a 5°C, até o momento do plantio. O período entre a coleta e a propagação do material vegetal não ultrapassou 48 horas.

6.2. Propagação do material vegetal

As mudas de pariparoba foram obtidas após cada coleta realizada, nos meses de agosto e setembro, por meio de estaquia no viveiro do Setor de Horticultura do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas-UNESP/Botucatu.

Estacas de caule de aproximadamente 10 cm foram retiradas da porção mediana dos ramos das plantas matrizes coletadas nos seus habitats naturais, em seguida, acondicionadas em sacos de polietileno de dimensões 10 x 13 cm, previamente preenchidos com substrato composto por solo (Latosolo vermelho distrófico), esterco bovino, substrato comercial (Plantimax) e vermiculita, na proporção 3:1:1:1 (Figura 4A e 4B). No início do processo de enraizamento as estacas foram cobertas com folhas de palmeira para evitar luz direta e também manutenção da umidade do substrato (Figura 4C).

As estacas permaneceram sob sombreamento de 50% e irrigadas diariamente através de sistema automático de aspersão, a cada 12 horas, durante 5 minutos, por um período de 120 dias, tempo que foi necessário para o enraizamento e desenvolvimento das mudas, até serem transplantadas para a área experimental no pomar do Setor de Horticultura do da UNESP/Botucatu, cujas plantas apresentavam-se com altura de 30 cm em média.

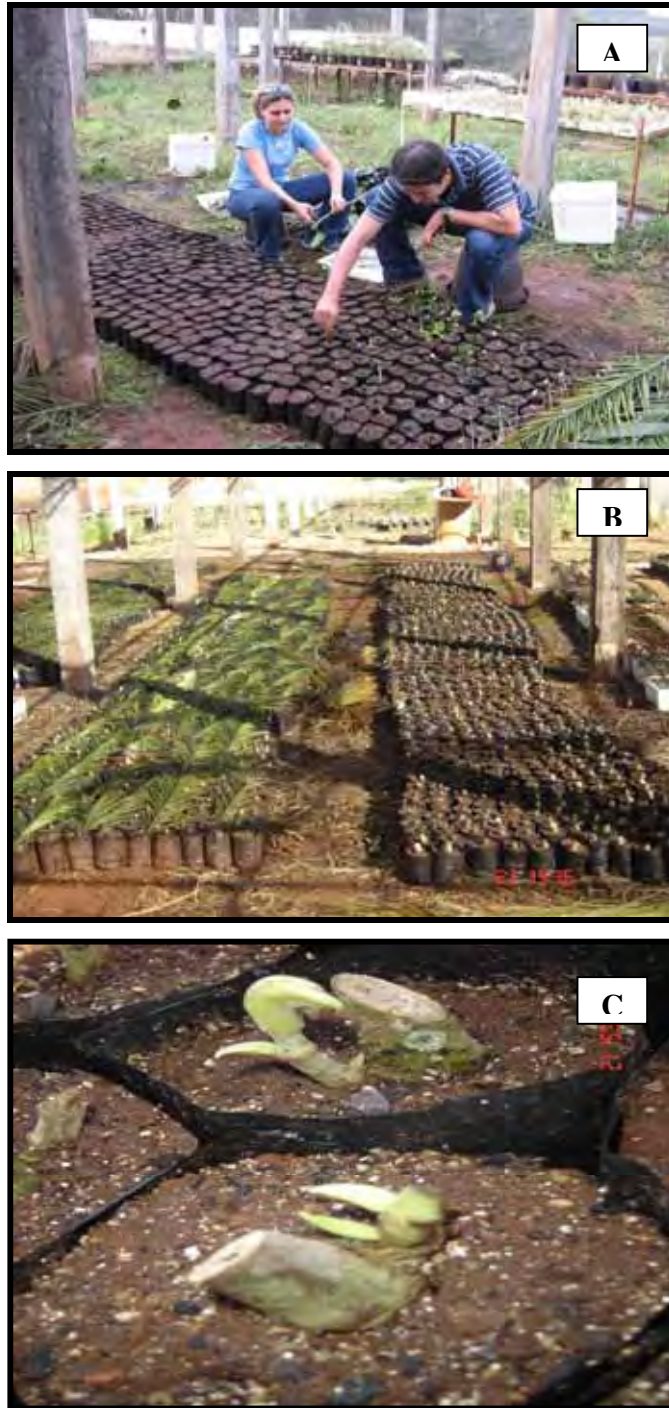


Figura 4. Propagação das estacas em telado com 50% de sombreamento (A); Detalhe da cobertura com folhas de palmeiras (B); Detalhe da estaca no substrato com início da brotação (C).

6.3. Preparo da área experimental

Os experimentos foram conduzidos em uma área de aproximadamente 500 m², localizada no pomar do Setor de Horticultura do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP/Botucatu, que apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 22°51'S, 48°26'WO e 786 m de altitude. Os dados meteorológicos de temperatura (máxima, mínima e média), precipitação, umidade relativa e radiação solar do período em que o experimento foi mantido em campo, estão expostos respectivamente nas figuras 26 a 29 do apêndice 6.

Foram coletadas amostras de solo da área experimental (profundidade de 20 cm) e enviadas para o Laboratório de Solos do Departamento de Recursos Naturais – Setor de Ciência do Solo para análise química e posterior correção da acidez do solo (Tabela 1). A partir dos resultados dessa análise, o solo foi calcareado recebendo a dose de 2,6 t/ha de calcário dolomítico, sendo posteriormente preparado com arado e grade rotativa.

Tabela 1. Análise química do solo na área experimental localizada no pomar do Setor de Horticultura do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP/Botucatu/SP.

pH	M.O.	P _{resina}	K	Ca	Mg	Al ⁺³	H+Al	CTC	SB	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	-----mmol/dm ³ -----					-----		%	-----mg/dm ³ -----				
4,4	22	3	3,1	12	6		48	70	21	30	0,28	0,9	46	20,6	7,1

M.O: matéria orgânica; SB: soma de bases; H+Al: acidez potencial; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação de bases.

Com o objetivo de proporcionar sombreamento durante o cultivo das plantas de *P. umbellata*, cuja espécie é considerada esciófita (Mattana, 2005; Marchese et al. 2004), foi realizada a semeadura da espécie *Cajanus cajan* L., conhecida popularmente como feijão guandu, entre as linhas de *P. umbellata*, com espaçamento de 2,5 metros entre linhas x 0,5 metro entre plantas, três meses antes do plantio das mudas.

Esta espécie foi escolhida devido à facilidade de aquisição de sementes e, principalmente, por ser considerada fornecedora de sombra para outras espécies susceptíveis a radiação solar (Lunz & Frank, 1997, Moraes et al., 2003, Loss, 2007).

O feijão guandu (*Cajanus cajan*) é uma leguminosa tropical fixadora de grande quantidade de N atmosférico, se adapta à diferentes condições ambientais e é utilizada

amplamente como adubo verde, com o potencial produtivo de 6,5 a 9,5 t.ha⁻¹ de massa seca na parte aérea e, ainda como quebra-ventos, forragem e alimento humano (Fernandes et al. 1999). Possui um porte arbustivo ereto, com a altura variando entre 2 e 3 m e um ciclo de vida de 3 a 4 anos. A espécie tem rápido crescimento com elevado aumento da biomassa no estágio inicial e ciclo de vida curto, o que dificulta a competição com espécies invasoras (Beltrame & Rodrigues, 2007). Trata-se de uma espécie amplamente difundida em pequenos estabelecimentos rurais no Brasil, oferecendo a possibilidade tanto de consumo dos grãos como de comercialização em mercados locais. Torna-se, assim, uma espécie adequada para integrar sistemas de produção de hortaliças com base agroecológica (Alves et al., 2004).

6.4. Plantio das mudas e condução dos experimentos

As mudas de *P.umbellata* foram levadas para campo nos meses de dezembro de 2006 e janeiro de 2007, após 120 dias aproximadamente, período suficiente para o enraizamento e formação das mudas, cujas plantas apresentavam-se com altura de 30 cm em média.

Foram abertas covas (15 cm x 15 cm) com espaçamento de 0,5 m entre linhas nas ruas formadas entre as plantas de feijão guandu (2,5 metros); em cada rua de 2,5 metros foram plantadas 4 linhas de plantas, considerando-se as exteriores como bordaduras, e as interiores como fileiras úteis (Figura 5A). No momento do plantio foi realizada uma adubação com meio litro de esterco comercial de galinha curtido por cova (Figura 5B).

Foi instalado na área experimental, um sistema de irrigação por gotejamento; no início, as plantas foram irrigadas diariamente, durante meio período; após o pegamento das mudas (aproximadamente 20 dias), foi adotado um procedimento de irrigação em dias alternados (Figura 5C).

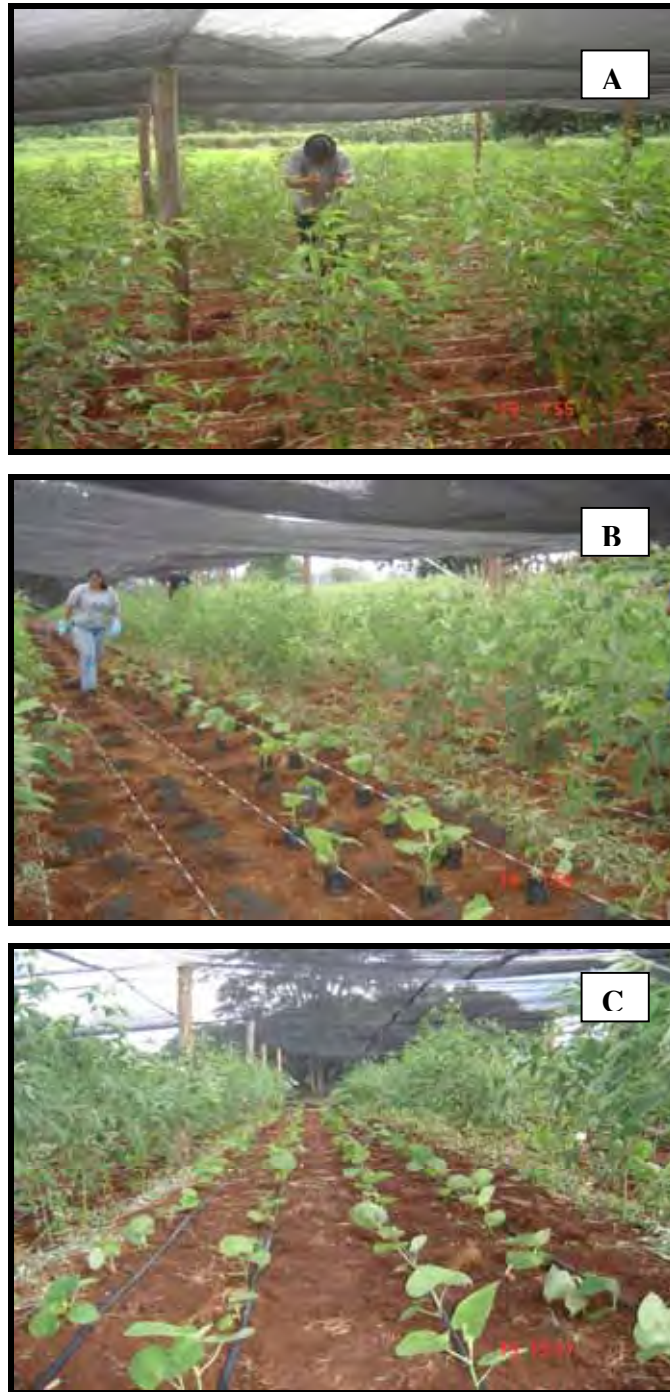


Figura 5. Plantio das mudas de *P.umbellata* no campo. Abertura das covas (A); Adubação das covas (B); Sistema de irrigação e sombreamento das mudas plantadas (C).

O sombrite de 50% de sombreamento instalado na área experimental (Figuras 5A e 5C) foi retirado, assim que o sombreamento com as plantas de feijão guandu ficou adequado às mudas de pariparoba, após 30 dias aproximadamente.

Durante a condução dos experimentos foram realizadas capinas manuais, poda dos ramos laterais das plantas de guandu, adubação de cobertura das plantas de pariparoba, com meio litro de esterco de galinha comercial após seis meses do plantio.

6.5. Experimento 1: Populações de plantas x Sazonalidade

Este experimento foi conduzido com as mudas procedentes de plantas coletadas nos municípios de Piquete, Iporanga, Barra do Turvo e Jundiaí todas pertencentes ao Estado de São Paulo, conforme relatado no item 6.1.

As mudas foram transplantadas no mês de janeiro de 2007 no espaçamento de 0,5 x 0,75 m (26.666 plantas/ha). Foram avaliadas plantas cultivadas a partir de ramos de plantas matrizes coletadas em quatro diferentes locais de acesso (Piquete, Iporanga, Barra do Turvo e Jundiaí) e colhidas nas quatro estações do ano (inverno, primavera, verão e outono). O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso com parcelas subdivididas no tempo, sendo as parcelas populações de plantas e as sub-parcelas as 4 estações do ano, com 4 repetições de 6 plantas úteis cada.

No momento de cada colheita (julho/07, outubro/07, janeiro/08 e abril/08), foram tomados a altura das plantas e o número de folhas e ramos emitidos, para o acompanhamento do re-estabelecimento das plantas entre uma colheita e outra (intervalo de três meses); as folhas foram acondicionadas em sacos de polietileno e transportadas para o Laboratório de Plantas Medicinais da FCA-UNESP/Botucatu para determinação da massa da matéria fresca de todas as folhas de uma planta e, em seguida, acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufas de secagem a 40°C, até a obtenção de valores de massa constantes, que se deu em 72 horas. Após esse período, foi realizada a determinação da massa de matéria seca das mesmas e então, foi armazenada em câmara seca até o momento das análises fitoquímicas.

Os dados biométricos e fitoquímicos avaliados neste experimento constaram de: altura de plantas, número de folhas e de ramos emitidos, área foliar, biomassa fresca

e seca de folhas, rendimento e composição química do óleo essencial de folhas (itens 6.8.1 e 6.8.2).

6.6. Experimento 2: Espaçamento entre plantas x Idades de colheita

Para este experimento foram utilizadas mudas provenientes das plantas coletadas no mês de setembro de 2006 no município de Jundiaí/SP, cujo transplântio ocorreu no mês de dezembro do mesmo ano. O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso com parcelas subdivididas no tempo (sendo a parcela, densidade de plantas e as sub-parcelas, idades de colheitas) com 4 repetições, contendo 9 plantas úteis cada.

Os tratamentos adotados constaram de 3 espaçamentos de plantas: 0,5 m entre as linhas e variando o espaçamento entre de plantas: 0,5 m, 0,75 m e 1,0 m que corresponderam a 40.000, 26.666 e 20.000 plantas por hectare; e duas idades de colheitas nas mesmas parcelas: aos 6 meses após o plantio no campo e, aos doze meses de transplântio.

A primeira colheita foi realizada no mês de junho de 2007 e a segunda colheita no mês de dezembro de 2007 nas mesmas plantas da primeira colheita. As plantas tiveram as folhas retiradas (como se colhe couve-folha) (Figura 6B). Este modo de colheita foi observado em visita realizada a um produtor de *P. umbellata*, na região do Vale do Ribeira - SP.

Em cada colheita, foram tomados os dados de altura das plantas e o número de folhas e ramos emitidos até aquele momento (item 6.8.1). As folhas colhidas foram acondicionadas em sacos de polietileno (Figura 6B) e transportadas para o Laboratório de Plantas Medicinais da FCA-UNESP/Botucatu, onde foi realizada a medida de área foliar (aparelho digital Automatic Área Meter – Model AAM-7 - Hayashi Denkoh Co. LTD-Tokyo/Japan) e determinação da massa de matéria fresca.

As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufas de secagem a 40°C, até a obtenção de valores de massa constantes, que se deu em 72 horas. Após esse período foi realizada a determinação da massa de matéria seca e, em seguida, foi armazenado em câmara seca e escura até o momento das análises fitoquímicas.

Os dados biométricos e fitoquímicos avaliados neste experimento constaram de: altura de plantas, número de folhas e de ramos emitidos, área foliar, biomassa fresca e seca de folhas, rendimento e composição química do óleo essencial de folhas, rendimento do

extrato bruto de folhas e quantificação da substância 4-nerolidilcatecol no extrato (itens 6.8.1 e 6.8.2).

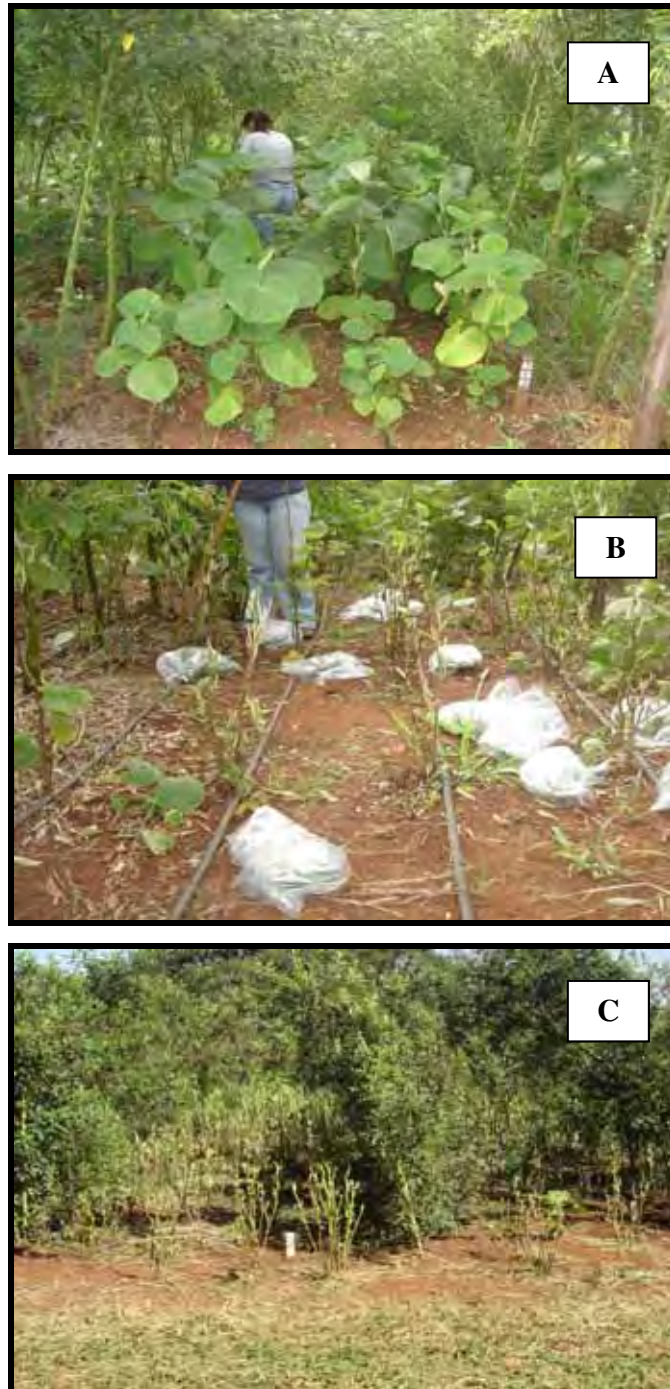


Figura 6: Vista geral da colheita das plantas de *P. umbellata* após seis meses do plantio (A); Procedimentos durante a colheita (B); Vista geral das plantas colhidas (C).

6.7. Experimento 3: Horários de colheita x Temperaturas de secagem.

Para este experimento foram utilizadas mudas provenientes do material coletado no mês de setembro de 2006 no município de Piquete/SP e o plantio no campo ocorreu no mês de janeiro de 2007. A metodologia adotada para propagação das mudas, bem como para o plantio e condução do experimento no campo está relatada no item 6.4.

As mudas foram plantadas em um espaçamento de 0,5 m x 0,75 m. Os tratamentos adotados constaram de seis horários de colheita, com intervalos de três horas (6:00; 9:00; 12:00; 15:00, 18:00 e 21:00 horas) e três temperaturas de secagem (40°C; 60°C e 80°C) e uma testemunha *in natura* (planta fresca). O delineamento experimental estabelecido foi de blocos ao acaso, no esquema fatorial 6 x 4 (horários de colheita x temperatura de secagem) e 3 repetições com 6 plantas úteis cada.

A colheita das folhas ocorreu no mês de outubro de 2007, após nove meses do plantio. As folhas foram cortadas, acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados e transportadas para o Laboratório de Plantas Medicinais da FCA-UNESP/Botucatu, onde foram colocadas em três estufas de secagem com diferentes temperaturas: 40°C, 60°C, e 80°C até a estabilização total da massa e, em seguida, estocadas em câmara seca para posteriores análises fitoquímicas (item 6.8.2.). As folhas frescas foram colocadas em sacos polietileno e armazenadas em freezer a -18°C.

Os dados fitoquímicos avaliados neste experimento foram: rendimento e composição química do óleo essencial de folhas, rendimento do extrato bruto de folhas e quantificação da substância 4-nerolidilcatecol no extrato (item 6.8.2).

6.8. VARIÁVEIS AVALIADAS

6.8.1. VARIÁVEIS BIOMÉTRICAS

6.8.1.1. Altura de plantas

A altura de cada planta foi medida no momento da colheita, utilizando régua graduada em centímetros, partindo-se do solo até o ápice caulinar na última folha totalmente expandida.

6.8.1.2. Número de ramos e folhas

O número de folhas e ramos por planta foi obtido no momento de cada colheita, contando-se as unidades. Consideraram-se nesta contagem as folhas completamente expandidas.

6.8.1.3. Área foliar

A área foliar total de cada parcela (9 plantas), contendo todas as folhas de uma planta inteira, foi determinada através do aparelho de medição de área foliar que expressa a área em cm² (aparelho digital - Automatic Área Meter – Model AAM-7 da Hayashi Denkoh Co. LTD-Tokyo/Japan). A área foliar medida incluiu o pecíolo.

6.8.1.4. Biomassa Foliar

A biomassa foliar de cada parcela foi obtida através da pesagem total das folhas frescas e secas. As folhas foram consideradas secas quando, depois de colocadas em estufa elétrica de circulação forçada de ar a uma temperatura constante de 40° C, a massa se manteve constante após 3 determinações que se deu em média após 72 horas após o início do período de secagem.

6.8.2. VARIÁVEIS FITOQUÍMICAS

6.8.2.1. Extração e análise da composição química do óleo essencial.

As extrações dos óleos essenciais das folhas de *P.umbellata* colhidas em todos os experimentos foram realizadas no Laboratório de Plantas Medicinais do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP-Botucatu, enquanto que, a análise da composição química dos mesmos foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas - IAC/SP.

Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger, utilizando-se amostras de 50,0 gramas de folhas secas amostrados de cada parcela (200,0 gramas, no caso do material fresco), rasuradas manualmente e, em seguida, colocadas em balões de 2000 mL, preenchidos com água destilada até a metade do seu volume e mantidos sobre manta aquecedora até o término da extração. Após o término da hidrodestilação, que se deu em um período de três horas, os óleos essenciais foram recolhidos em frascos âmbar, previamente pesados e identificados e em seguida, realizado o cálculo do rendimento e, posteriormente armazenados em freezer (-18°C) para a análise da composição química. O cálculo do rendimento da extração dos óleos essenciais foi baseado na massa da matéria seca das folhas.

A análise da composição química dos óleos essenciais extraídos foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas (Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25um), hélio como gás de arraste (1,0mL/min), com injetor a 240°C e detector 230°C seguindo a programação: 60°C-125°C a 6°C/minuto; 125°C-175°C, 3°C/minuto; 175°C-240°C, 6°C/minuto; split 1/20. Os óleos essenciais foram solubilizados em acetato de etila e injetado no volume de 1µL de solução.

A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação de seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib), literatura (McLafferty e Stauffer, 1989) e índice de retenção (Adams, 1995).

Os índices de retenção de Kovats (IR) das substâncias foram obtidos através da co-injeção do óleo essencial com uma mistura padrão de n-alcanos (C₉-C₂₄), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (Van den Dool e Kratz, 1963).

6.8.2.2. Preparo do extrato bruto e quantificação do 4-nerolidilcatecol.

Os extratos brutos foram preparados no Laboratório de Plantas Medicinais do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP-Botucatu, e a quantificação da substância 4-nerolidilcatecol foi realizada em Jaguariúna/SP, na unidade Embrapa - Meio Ambiente.

Para otimização do rendimento dos extratos foram realizados alguns testes para estabelecimento do solvente mais adequado, modo e tempo de extração e relação solvente:material vegetal. Para tanto, foram executados alguns procedimentos baseados em referências de literatura descritos no Apêndice 1, a fim de estabelecer um protocolo para extração.

Desta forma, amostras representativas das folhas de *P.umbellata* de cada parcela dos tratamentos dos devidos experimentos supracitados foram pulverizadas em moinho de facas tipo “Wiley” e submetidas a tamisação em malha 22 mesh. Alíquotas de 5,00 gramas do material pulverizado foram acondicionadas em erlenmeyers, devidamente identificados e vedados com alumínio (proteção contra luz), juntamente com 50,0 mL de metanol (P.A. marca “Synth”) e colocados em mesa agitadora em temperatura ambiente, com rotação de 150 rpm, por um período de uma 60 minutos.

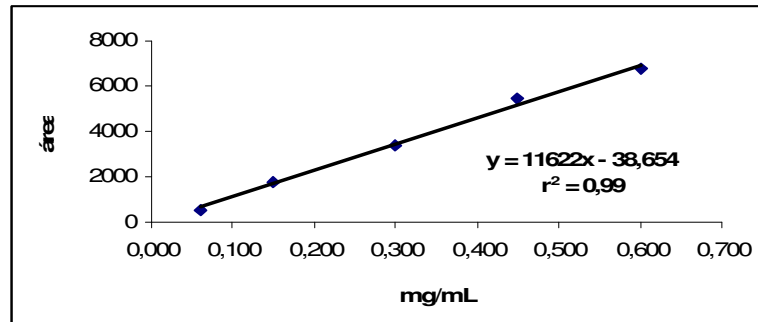
Os extratos metanólicos foram filtrados em funil contendo papel filtro e recolhidos em frascos âmbar de 50,0 mL, previamente pesados e identificados; em seguida esses extratos (nos próprios frascos âmbar) foram concentrados em rotaevaporador, com pressão reduzida e temperatura a 40°C, até a evaporação total do solvente. Os frascos contendo os extratos brutos foram colocados em dessecador a vácuo em temperatura ambiente para retirada do restante de umidade. Após esta etapa, esses frascos foram pesados em balança analítica para cálculo do rendimento, em seguida, foram armazenados em freezer (-18°C) até a análise de quantificação da substância 4-nerolidilcatecol.

Para a quantificação dessa substância, os extratos brutos foram ressuspendidos em 10 mL de metanol, grau CLAE, em seguida diluídos em fase móvel acetonitrila:água (80:20), utilizando-se 0,5 mL em um balão de 5mL. A solução foi filtrada em membranas filtrantes (0,45 µm Alltech) para frascos de 1,5 mL.

A quantificação da substância 4-nerolidilcatecol nos extratos foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Agilent) acoplado ao detector Ultra-violeta visível (CLAE-UV) e injetor automático. A coluna utilizada foi Supelcosil™ LC18 (4,6mm x 250mm, partículas de 5µm, Supelco). A fase móvel empregada consistiu de acetonitrila: água (85:15) de forma isocrática por 10 min; com volume de injeção das amostras de 20 µL e o fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min, a detecção a 282nm. O metanol grau CLAE (Merck) foi filtrado antes de ser utilizado no sistema cromatográfico e a água destilada e deionizada foi purificada pelo sistema Millipore Milli-Q.

Para a quantificação do composto 4-nerolidilcatecol foi construída a curva padrão, utilizando-se a substância isolada previamente, conforme protocolo de isolamento apresentado no Apêndice 2. Para a realização da curva, utilizou-se o padrão de 4-nerolidilcatecol contendo 60 mg do analito, dissolvido em 10 mL de metanol grau CLAE, com sucessivas diluições em fase móvel acetonitrila:água (80:20). As concentrações do analito utilizadas estão expostas na figura 7.

A curva de calibração foi determinada por regressão linear, relacionando a área dos picos com as concentrações do padrão (Figura 7). A linearidade do método foi verificada através do coeficiente de regressão (R^2) da curva obtida na análise de regressão. A identificação de 4-nerolidilcatecol nas amostras foi baseada no tempo de retenção. A concentração de 4-nerolidilcatecol (µg/mL) nos extratos foi estimada por meio da equação da reta da curva padrão: $Y = 11622X - 38,654$, onde $Y =$ concentração e $X =$ área, $r^2 = 0,99$.



mg/ml	Area
0,600	6750
0,450	5467
0,300	3392
0,150	1769
0,060	560

Figura 7. Curva de calibração do padrão isolado de 4-nerolidilcatecol de raízes de *P. umbellata*.

6.9. Análise dos resultados

Todos os dados experimentais foram submetidos à análise de variância, e ao teste de Scott-Nott, com nível de significância $P < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Experimento 1: Populações de plantas x Sazonalidade

7.1.1. Produção de biomassa foliar e variáveis relacionadas

A análise de variância (Tabela 2) mostra as respostas das variáveis biométricas estudadas, em função dos tratamentos populações de plantas e sazonalidade, bem como a interação dos mesmos. Os resultados demonstraram através do teste F, que a maioria das variáveis estudadas sofreu forte influência das populações de plantas, com exceção, da biomassa fresca de folhas, já a sazonalidade influenciou significativamente todas as variáveis biométricas estudadas. Com relação à interação, as variáveis número de ramos e de folhas não foram afetados pela influência mútua dos fatores.

Tabela 2. Valores de F das variáveis biométricas: altura de plantas (ALT), número de ramos (NR), número de folhas (NF), biomassa fresca (BFF) e seca de folhas (BSF) de *P. umbellata*, em função das populações de plantas e sazonalidade. UNESP-Botucatu/SP, 2009.

Causas de variação	GL	ALT	NR	NF	BFF	BSF
Populações (P)	3	9,952*	10,4827*	7,900*	3,548 ^{ns}	5,509*
Blocos	3	2,058 ^{ns}	0,413 ^{ns}	0,1397 ^{ns}	0,489 ^{ns}	0,547 ^{ns}
Resíduo (e)	9	---	---	---	---	---
Sazonalidade (S)	3	84,761*	20,441*	14,622*	6,224*	19,906*
Interação P x S	9	7,494*	1,023 ^{ns}	0,895 ^{ns}	3,176*	2,846*
Resíduo (c)	36	---	---	---	---	---
C.V. p (%)	---	16,73	21,62	32,47	42,43	39,30
C.V. e (%)	---	12,98	21,95	25,35	30,00	32,11
Média geral	---	67,52	2,35	14,45	61,34	13,15

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A Tabela 3 mostra as médias gerais das variáveis estudadas em função de diferentes populações e sazonalidade. A população de Jundiá obteve os melhores resultados, diferenciando significativamente em relação às demais populações, cujas plantas apresentaram maior altura, maior número de ramos, apesar de não terem se diferenciado da população de Barra do Turvo e, também, maiores valores de número de folhas e de biomassa fresca e seca de folhas.

As plantas colhidas no período do outono apresentaram resultados significativamente superiores do restante das estações, proporcionando maiores valores de altura, número de folhas e biomassa seca de folhas; o número de ramos também foi maior no período do outono, mas não se diferenciou expressivamente das estações da primavera e do verão. Já a biomassa fresca de folhas apresentou diferença significativa entre as estações do outono e verão, obtendo maiores valores no verão.

Tabela 3. Média das variáveis: altura (cm), número de ramos e folhas, biomassa fresca e seca de folhas (gramas) de *P. umbellata*, em função de diferentes populações de plantas e da sazonalidade.

Populações de plantas	ALT	NR	NF	MFF	MSF
Piquete	65,38B	2,18B	11,64B	50,25B	10,82B
Barra do Turvo	58,80B	2,47A	14,67B	55,24B	12,14B
Iporanga	66,00B	1,89B	12,49B	61,50B	13,11B
Jundiaí	79,96 ^a	2,85A	19,01 ^a	73,39A	17,96 ^a
Sazonalidade	ALT	NR	NF	MFF	MSF
Inverno	65,45B	1,48B	10,09C	50,38B	10,28B
Primavera	42,21C	2,63A	15,29B	52,76B	10,29B
Verão	71,21B	2,63A	13,88B	73,39A	12,95B
Outono	91,22 ^a	2,67A	18,55 ^a	68,86A	20,52 ^a

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

7.1.1.1. Altura de plantas

Os maiores valores da altura ocorreram nas plantas provenientes de Jundiaí, nos períodos do inverno de 2007 (101 cm) e do outono de 2008 (105 cm), diferenciando significativamente, das demais populações, cujas alturas das plantas não se distinguiram entre si, principalmente nas estações da primavera de 2007 e verão de 2008, que não influenciaram a altura das plantas provenientes de todas as populações (Tabela 4). O período da primavera foi o que apresentou os menores valores de altura em todas as populações estudadas.

Tabela 4. Média da altura de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	57,92Bd	40,18Ac	75,01Ab	88,19Ba	65,38B
Barra do Turvo	45,92Bc	35,91Ac	69,22Ab	84,13Ba	58,80B
Iporanga	56,44Bb	45,08Ab	75,29Aa	87,15Ba	66,00B
Jundiaí	101,50Aa	47,64Ac	65,31Ab	105,39Aa	79,96 ^a
Média	65,45B	42,21C	71,21B	91,22A	----

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Após a primeira colheita, no período entre o inverno e a primavera, as plantas tiveram um decréscimo na altura, este fenômeno ocorreu, possivelmente por alguns fatores. Pela condição climática peculiar compreendida pelo intervalo entre estas estações (julho a outubro), período caracterizado por temperaturas mais amenas e menor intensidade de chuvas, o que favorece a queda do metabolismo vegetal. Muitas espécies vegetais apresentam esse comportamento de diminuição do metabolismo durante o período do inverno (Larcher, 2000), por ser uma época de dias mais curtos, mais secos e mais frios. Autores como Correa Junior (2003), Guerreiro (2006) e Alves (2008), também observaram redução na altura de plantas de *Pfaffia glomerata* após a primeira colheita.

Outros dois fatores a serem considerados são: o estresse ocasionado pela primeira colheita das folhas, pois a partir da segunda colheita, as plantas recuperaram o crescimento novamente e, a priorização de formação de ramos laterais e novas folhas, conforme se observa nas Tabelas 5 e 6 e Figuras 8 e 9, onde o número de ramos e folhas foram maiores na primavera.

Observa-se na Figura 8, que depois da primavera as plantas retomam seu crescimento, aumentando em média 30 cm até a estação do verão; nota-se que é a fase de maior aumento da altura das plantas. Nestas duas estações, as plantas apresentam respostas bem similares, não se diferenciando significativamente. Entre o verão e o outono, as plantas de Jundiaí, tiveram um crescimento bem mais acelerado em relação às outras populações, divergindo das demais.

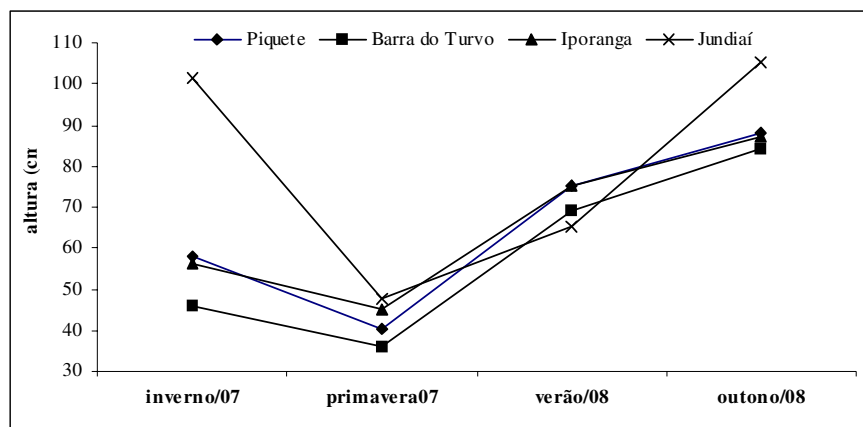


Figura 8. Altura de plantas (cm) de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

7.1.1.2. Número de ramos

O número de ramos, de modo geral, foi superior nas populações de Jundiá e Barra do Turvo, respectivamente, se diferenciando das plantas procedentes de Piquete e Iporanga, principalmente nas estações da primavera e verão; logo na época do inverno não houve variação entre as populações estudadas, contudo, o número de ramos nessa estação foi significativamente inferior que as demais estações (Tabela 5), como na época do inverno foi realizada a primeira colheita, é compreensível que a quantidade de ramos ainda seja inferior nesta época. Segundo Metcalfe & Chalk (1986) e Cutter (1986), a espécie prioriza a formação de folhas nos estágios iniciais do desenvolvimento para acelerar e aumentar a atividade fotossintética, para depois, aumentar sua sustentação através dos tecidos lignificados do caule.

Tabela 5. Média do número de ramos de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	1,32Ab	2,34Ba	2,17Ba	2,88Aa	2,18
Barra do Turvo	1,68Ab	2,89Aa	3,00Aa	2,33Bb	2,47
Iporanga	1,08Ab	2,19Ba	2,19Ba	2,11Ba	1,89
Jundiá	1,82Ab	3,07Aa	3,34Aa	3,18Aa	2,85
Média	1,48b	2,63 ^a	2,63a	2,67a	----

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Observa-se na Figura 9 que houve um aumento no número dos ramos da estação do inverno para a primavera, certamente devido à colheita das folhas, incluindo as apicais, o que provavelmente estimulou o desenvolvimento lateral, com a emissão de novos ramos. Chaves (2000), também constatou este fenômeno em *Ocimum gratissimum*, cuja produção de caules foi inferior na primeira colheita, neste caso, na época do outono, com um significativo aumento linear da produção entre a estação do inverno até o verão.

A partir da primavera, nota-se que o aumento da quantidade de ramos emitidos já é bem menor, chegando, em algumas populações como Barra do Turvo e Iporanga, a decair do verão para o outono. Segundo Alves (2008) o maior número de caules, favorece a produção de estacas, assim, dependendo do objetivo, as plantas que produzem mais caules são aquelas de maior interesse.

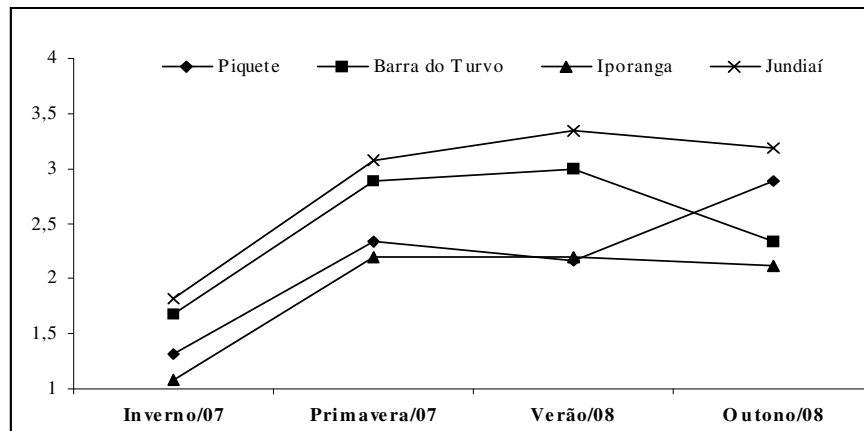


Figura 9. Número de ramos de *P.umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade

7.1.1.3. Número de folhas

A maior quantidade de folhas ocorreu na população de Jundiaí, em quase todas as estações do ano, somente no outono, as plantas procedentes de Barra do Turvo apresentaram número igual de folhas. Esta estação foi a que proporcionou mais folhas em relação às demais épocas do ano, de uma forma geral, e o inverno, foi a estação em que as plantas obtiveram menor número de folhas (Tabela 6). Estes dados corroboram com o número de ramos que também foi inferior no inverno, certamente, devido ao período de tempo entre o plantio e a primeira colheita, cujas plantas estavam a seis meses no campo.

Tabela 6. Média do número de folhas em *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	8,65Ba	12,53Ba	10,73Ba	14,63Ba	11,64
Barra do Turvo	7,96Bc	15,58Bb	13,77Bb	21,37Aa	14,67
Iporanga	9,08Bb	11,88Bb	11,65Bb	17,35Ba	12,49
Jundiaí	14,68Ab	21,16Aa	19,38Aa	21,37Aa	19,01
Média	10,09	15,29	13,88	18,55	----

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Na Figura 10, nota-se que a produção de folhas teve um acréscimo da estação do inverno para primavera, aumentando em média 5 folhas, após esse período, houve uma pequena queda na época do verão, ou seja, as plantas praticamente mantiveram a quantidade das folhas colhidas anteriormente; já da estação do verão para o inverno houve uma recuperação.

As diferenças apresentadas do número de ramos e folhas, superior na população de Jundiá, provavelmente são devidas à variabilidade genética das populações estudadas, o que permite conhecer a existência de materiais com características de interesse para a propagação vegetativa por estaquia.

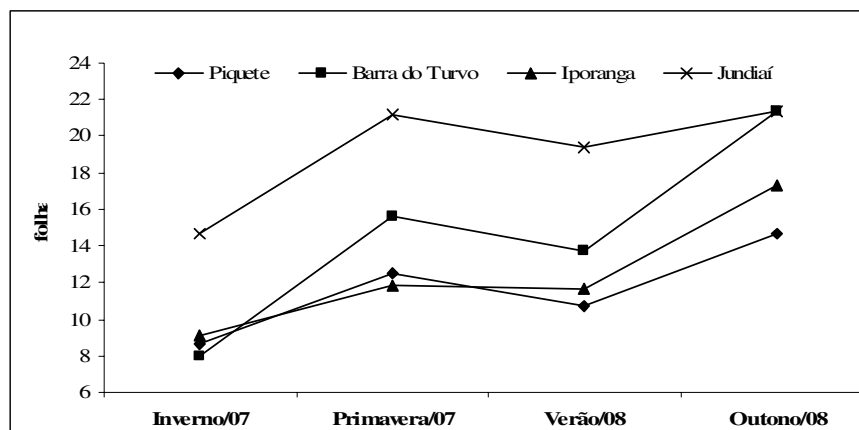


Figura 10. Número de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

7.1.1.4. Biomassa foliar

As populações de plantas não se diferenciaram significativamente, em relação à biomassa fresca das folhas, embora a população de Jundiá tenha sobressaído somente no inverno, com maior quantidade de biomassa fresca em relação às demais, porém no decorrer das estações houve um equilíbrio dos valores (Tabela 7). Nota-se que a produção de biomassa fresca aumentou gradativamente com o passar das estações, até o verão de 2008, cujos valores foram significativamente superiores comparados à primavera e ao inverno; após essa época até o outono, houve um pequeno declínio na biomassa fresca, porém não significativo (Figura 11).

Tabela 7. Média da biomassa fresca de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	29,71Ba	49,00Aa	66,80Aa	55,51Aa	50,25A
Barra do Turvo	36,26Ba	50,38Aa	69,23Aa	65,14Aa	55,24A
Iporanga	32,89Bb	59,16Aa	80,53Aa	73,41Aa	61,50A
Jundiáí	102,69Aa	52,16Ab	76,99Aa	81,38Aa	78,39A
Média	50,38b	52,76b	73,39a	68,86a	----

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Observa-se na Tabela 7, que as populações procedentes de Piquete e Barra do Turvo têm desempenhos similares, ou seja, as estações do ano não influenciaram a produção de biomassa fresca das folhas, apesar de haver um aumento progressivo até a estação do verão, conforme mostra a Figura 11.

Alguns autores, com Czapak (1998) e Chaves (2000) também constataram que no período do inverno a produção de biomassa de folhas de *Mentha arvensis* e *Ocimum gratissimum*, respectivamente, foi menor, já na primavera e verão estas plantas tiveram aumentos significativos, segundo os autores foi devido ao aumento de temperatura, umidade relativa e pluviosidade que proporcionou melhores condições para o desenvolvimento das espécies estudadas. Figueiredo et al. (2006) também averiguaram maior produção de biomassa em *Cymbopogon citratus* na estação do verão, alegando que não somente a época do ano, mas também a frequência dos cortes influenciaram.

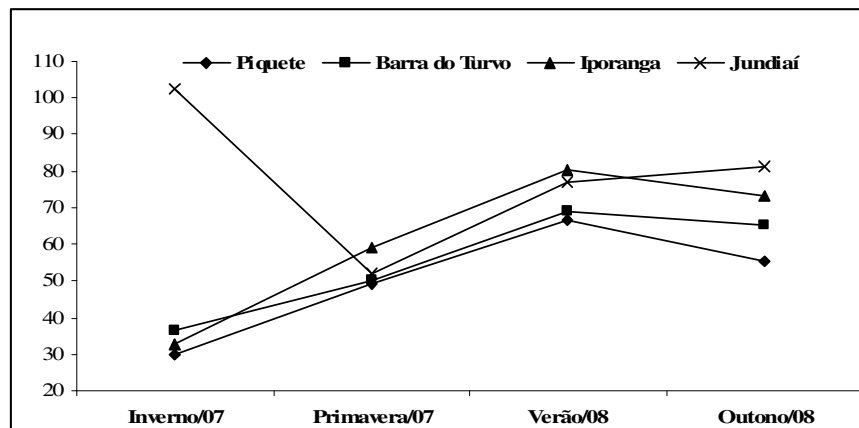


Figura 11. Biomassa fresca (gramas) de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e sazonalidade.

A produção de biomassa seca das folhas apresentou a mesma resposta que a biomassa fresca na média das diferentes populações de plantas estudadas, ou seja, não houve diferença estatística entre elas, apesar das plantas procedentes de Jundiá terem alcançado maiores valores, principalmente na época do inverno (Tabela 8). Já, em relação à sazonalidade, pode-se notar um aumento progressivo da biomassa seca das folhas até a estação do outono (Figura 12), ao contrário da biomassa fresca, que teve um pequeno decréscimo nesta época, todavia ambas as variáveis não diferiram estatisticamente nestas estações.

Tabela 8. Média da biomassa seca de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	5,75Bb	8,92Ab	10,92Ab	17,67Aa	10,82A
Barra do Turvo	6,86Bb	9,15Ab	12,05Ab	20,51Aa	12,14A
Iporanga	5,79Bc	10,54Ab	14,01Ab	22,80Aa	13,11A
Jundiá	22,72Aa	12,54Ab	14,80Ab	21,80Aa	17,96A
Média	10,28b	10,29b	12,95a	20,52a	----

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Uma hipótese considerável para essa diferença ocorrida entre a biomassa fresca e seca das folhas nas estações do verão e outono, apesar de não significativa, é a presença de maior quantidade de água nas folhas frescas durante o verão. Devido à maior pluviosidade nesta época, as plantas podem absorver maior quantidade de água, já na estação do outono a precipitação diminui e, certamente a biomassa fresca também. Este fenômeno também foi observado por Blank et al. (2007) em *Cymbopogon winterianus*. Os autores também alegaram que a maior produção de biomassa fresca no verão e seca no outono está relacionada com as condições climáticas das respectivas estações. Castro et al. (2008) estudaram a produção de óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* em diferentes localidades de Minas Gerais, e constatou que as folhas apresentaram maiores teores de umidade no mês de fevereiro em relação às folhas colhidas no mês de agosto, e o autor relaciona este resultados com o índice pluviométrico dessas estações (207 mm no mês de fevereiro e 33 mm no mês de agosto).

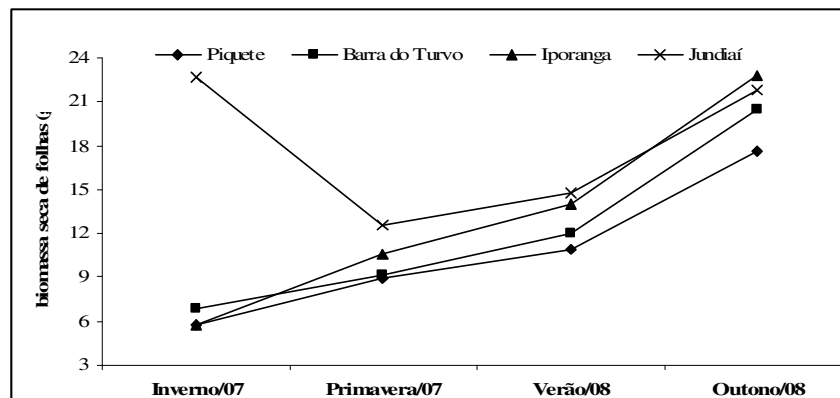


Figura 12. Biomassa seca (gramas) de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Relacionando todas as variáveis biométricas estudadas em função das populações de plantas e da sazonalidade, pode-se notar que, apesar da população de Jundiaí apresentar maiores valores de altura de plantas, número de folhas e ramos, a produção de biomassa foliar, tanto fresca quanto seca, foi semelhante estatisticamente para todas as populações. Supõe-se então, que as plantas procedentes de Jundiaí são mais altas, com mais ramos e com folhas menores, pois dividindo o número de folhas por ramos, tem-se em média 9 folhas por ramo, enquanto que as demais populações têm em média 6,5 folhas.

Uma hipótese provável para esses resultados é que a espécie *P. umbellata* apresenta um genótipo marcante para característica biomassa foliar e, portanto, todas as populações estudadas neste trabalho são promissoras para produção de biomassa foliar. No entanto, a seleção de materiais vegetais, a partir de características morfológicas de interesse, é importante para programas de melhoramento genético. Neste caso, as plantas procedentes de Jundiá são as mais promissoras, pois apesar de não terem se diferenciado estatisticamente das demais populações para produção de biomassa, foi a população que produziu maiores números, de uma maneira geral.

Avaliando a sazonalidade sobre as características biométricas estudadas, o outono foi a época mais adequada para obtenção de biomassa foliar em todas as populações estudadas, devido à evolução das variáveis com o decorrer das estações, com exceção do número de ramos, que teve um desenvolvimento bem mais lento da estação da primavera em diante. No entanto, a sazonalidade está relacionada diretamente com a idade das plantas, no inverno as plantas estavam com 6 meses, na primavera com 9 meses, no verão com 12 e no outono com 15 meses. É possível relacionar o aumento dos valores das características avaliadas à medida com que as plantas foram se desenvolvendo.

Existem alguns trabalhos que abordam a produção de biomassa vegetal conforme a idade das plantas. Leal et al. (2003) avaliaram a biomassa seca de *Cymbopogon citratus* dos 60 aos 120 dias após o plantio e observaram um incremento gradual linear da biomassa ao longo do período avaliado. Costa et al. (2007) estudaram *Ocimum selloi* em oito épocas de colheita (45; 60; 75; 90; 105; 120; 135 e 150 dias após o transplante das mudas) e constataram que a massa seca das folhas apresentou uma resposta quadrática, atingindo o máximo da produção aos 115 dias.

Como se pode notar, cada espécie responde de forma diferente, tanto à sazonalidade quanto à idade de corte. May et al. (2008) estudaram intervalos de cortes em duas espécies de *Cymbopogon*, para *C. flexuosus*, maiores intervalos entre cortes proporcionaram maior massa seca acumulada ao longo do ciclo de cultivo, já *C. citratus* apresentou resposta linear decrescente da massa seca acumulada da parte aérea, devido ao maior intervalo entre cortes utilizado, corroborando com Figueiredo et al. (2006) que observaram um decréscimo da biomassa foliar de *C. citratus* com o aumento da frequência de cortes, devido às características de uma maior demora para a recomposição dos órgãos vegetais retirados durante os cortes.

7.1.2. Rendimento e composição química do óleo essencial

Os resultados apresentados na Tabela 9 apontam forte influência das populações e sazonalidade nas variáveis fitoquímicas estudadas, cujos valores de F foram significativos. O rendimento de óleo essencial foi influenciado tanto pelas populações quanto pela sazonalidade, bem como a interação dos tratamentos. As substâncias químicas presentes no óleo essencial não diferiram na composição em função das populações de plantas e da sazonalidade, apresentando as mesmas substâncias (Tabelas 47 a 50), entretanto, o rendimento de cada substância variou em função dos tratamentos estudados isolados e em conjunto, somente o composto germacreno-D não demonstrou diferença significativa na interação.

Tabela 9. Valores de F das variáveis fitoquímicas: rendimento de óleo essencial (ÓLEO), β -elemeno (BEL), *E*-cariofileno (ECA), germacreno-D (GED), α -selineno (ASE), γ -cadineno (GCA), *E*-nerolidol (ENE) e óxido de cariofileno (OCA), em folhas de *P. umbellata*, em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Causas de variação	GL	ÓLEO	BEL	ECA	GED	ASE	GCA	ENE	OCA
Populações (P)	3	16,199*	8536*	13,895*	60,905*	4,454*	4,206*	85,190*	39,026*
Blocos	3	1,991 ^{ns}	1,380 ^{ns}	0,446 ^{ns}	0,082 ^{ns}	1,537 ^{ns}	0,372 ^{ns}	1,109 ^{ns}	0,563 ^{ns}
Resíduo (e)	9	---	---	---	---	---	---	---	---
Sazonalidade (S)	3	9,426*	47,741*	66,305*	19,270*	63,264*	6,549*	28,852*	11,072*
Interação P x S	9	2,396*	2,500*	10,168*	9,986 ^{ns}	2,644*	2,429*	5,839*	3,498*
Resíduo (c)	36	---	---	---	---	---	---	---	---
C.V. p (%)	---	21,32	26,48	25,08	19,44	13,04	22,20	23,91	20,25
C.V. s (%)	---	30,11	22,98	9,16	15,40	10,92	21,62	27,93	15,82
Média geral	---	0,16	2,91	12,48	20,27	8,98	5,85	12,14	3,65

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

7.1.2.1. Rendimento do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial foi maior nas plantas provenientes de Jundiá na media geral das populações (0,21%), apesar de, somente no inverno, ter sido estatisticamente superior às demais populações (0,31%). Ao contrário dos resultados das variáveis biométricas, cujos valores foram menores no inverno, esta estação foi a que proporcionou maior rendimento de óleo essencial de uma maneira geral (0,19%), embora estatisticamente semelhante às estações do verão e outono (0,17%). Já a primavera, foi a estação que rendeu o menor rendimento do óleo (0,08%) em todas as populações estudadas,

principalmente às plantas procedentes de Jundiaí e Barra do Turvo que foram estatisticamente influenciadas pelas estações do ano (Tabela 10).

Tabela 10. Rendimento de óleo essencial (%) em folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno	Primavera	Verão	Outono	
Piquete	0,15Ba	0,10Aa	0,17Aa	0,19Aa	0,15B
Barra do Turvo	0,16Ba	0,08Ab	0,15Aa	0,18Aa	0,14B
Iporanga	0,13Ba	0,11Aa	0,13Aa	0,14Aa	0,13B
Jundiaí	0,31Aa	0,13Ac	0,21Ab	0,18Ab	0,21A
Média	0,19a	0,10b	0,17a	0,17a	-----

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Observa-se na Figura 13, que o rendimento do óleo essencial de todas as populações estudadas declinou entre as estações do inverno e primavera recuperando-se após esse período, com um aumento gradativo, com exceção da população de Jundiaí que, cujo rendimento de óleo teve um decréscimo entre o verão e o outono.

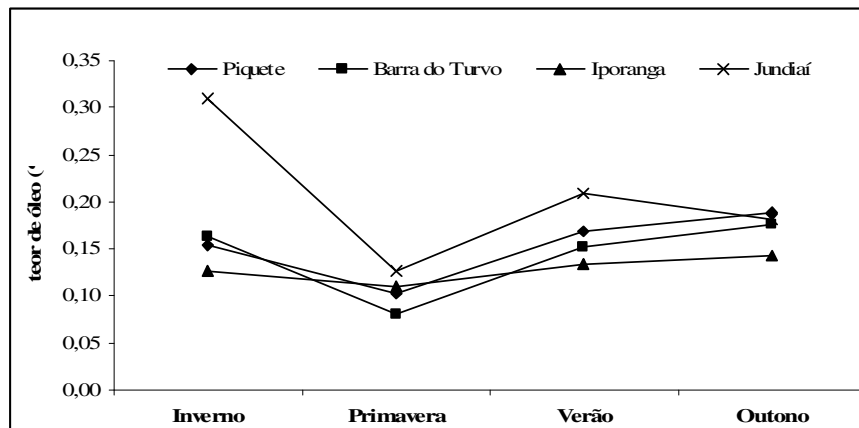


Figura 13. Rendimento de óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

A influência sazonal e populacional na produção de óleos essenciais de plantas medicinais e seus constituintes são temas bastante estudados por diversos pesquisadores e o que se analisa nos trabalhos realizados é que cada espécie apresenta um perfil diferente, não

existindo um padrão de resposta. No entanto, para a espécie *P. umbellata*, ainda não existem relatos na literatura sobre o tema em questão, apenas para a espécie *P. peltata*, pertencente ao mesmo gênero (Moraes et al, 2004).

Além da semelhança morfológica, ambas as espécies parecem ter a mesma resposta do óleo essencial frente às variações sazonais, Moraes et al. (2004) averiguaram que o maior rendimento do óleo essencial de *P. peltata* (0,2%) ocorreu nos períodos de julho de 1997 e abril de 1998, Mattana (2005) avaliou *P. umbellata* com 15 meses e 27 meses de idade (abril de 2003 e de 2004) e observou uma média no rendimento de 0,4%, valor bem acima que o encontrado neste trabalho, média de 0,17% na estação do outono.

Esta variação ocorrente entre os rendimentos da mesma espécie pode estar relacionada com diversos fatores, tais como: a idade da planta, a forma de propagação, material genético. Mattana (2005) propagou as plantas a partir de sementes provenientes de Adrianópolis/PR, no caso do presente trabalho, as plantas foram propagadas vegetativamente a partir de estacas coletadas nos diferentes locais de acesso do estado de São Paulo já citados anteriormente, portanto as idades das plantas eram diferentes, bem como a procedência do material genético.

Não existe um consenso na literatura com relação à melhor época de produção de óleos essenciais em espécies medicinais. Alguns autores alegam que a diminuição da temperatura e da pluviosidade, características das estações outono e inverno, estão relacionados com o aumento do rendimento de óleo essencial de algumas espécies medicinais, devido ao estresse o que ocasiona o aumento desse metabólito secundário, provavelmente o ocorrido neste experimento.

Figueiredo et al. (2006) constataram aumento do rendimento do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na época do inverno (1º.corte) e o menor rendimento no verão (4º.corte), os autores relacionam os resultados à frequência de cortes. Carreira (2007) estudou o rendimento do óleo essencial de *Baccharis trimera* nas diferentes épocas do ano e constatou que os menores rendimentos ocorreram na época do verão, Souza (2007) estudando *B. dracunculifolia* observou que o período de fevereiro a abril foi o mais produtivo para o rendimento de óleo essencial (1%) e também constatou que nem todas as populações avaliadas foram viáveis para cultivo. Nagao et al. (2004) alegam que o baixo rendimento de óleo essencial registrado em plantas de *Lippia alba* durante a estação chuvosa está ligada a diminuição da

radiação solar, característica dessa época.

Blank et al., (2007) constataram que no período do inverno foi verificado o menor rendimento de óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, segundo os autores o aumento das chuvas e o começo do período vegetativo pode ter respondido por estes resultados, vale ressaltar que este estudo foi conduzido em Sergipe, região de inverno chuvoso.

Outros autores reportam a maior produção de óleo essencial em épocas quentes e úmidas como é o caso de *Ocimum gratissimum*, (Chaves, 2000), *Piper aduncum* (2002) e diversas espécies e variedades de *Mentha* (Dechamps, 2008).

Castro et al. (2008) também encontraram maior rendimento de óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*, no mês de fevereiro, porém outros autores trabalhando com a mesma espécie, constataram maiores rendimentos nos meses de agosto (Vitti & Brito, 1999; Andrade & Gomes, 2000) e consideraram que nesse período essa concentração é maior em função do menor teor de umidade nas folhas.

Dentro deste contexto, avaliando os trabalhos mencionados e o presente trabalho, pode-se afirmar que as épocas do ano e as características ambientais que as envolvem, tais como temperatura, precipitação e radiação solar são fatores ambientais relevantes e influenciadores dos metabólitos secundários, neste caso dos óleos essenciais, e cada espécie medicinal se comporta diferentemente a essas variáveis.

7.1.2.2. Composição química do óleo essencial

As Tabelas 47 a 50 apresentam a proporção relativa média de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial em função das populações de plantas e sazonalidade estudadas. Foram identificadas 34 substâncias, perfazendo em média 95% do total identificado. A principal classe de compostos presente no óleo essencial são os terpenóides, em sua maioria os sesquiterpenos e alguns monoterpenos como α -pineno e β -pineno, também foram identificados dois aldeídos, decanal e octadecanal.

A composição química do óleo essencial não foi influenciada pelas populações de plantas e pela sazonalidade, sendo identificadas as mesmas substâncias em ambos os fatores estudados, porém a proporção relativa média das principais substâncias variou conforme os tratamentos (Tabelas 11 a 16).

Para análise da comparação de médias das substâncias presentes no óleo

essencial, foram selecionadas aquelas que apresentavam uma média mínima de 3% em pelo menos um dos tratamentos. Dentre elas estão β -elemeno, *E*-cariofileno, germacreno-D, α -selineno, *E*-nerolidol e o óxido-cariofileno, totalizando em média 67% do total das substâncias presentes no óleo essencial.

A composição química do óleo essencial da espécie estudada no presente trabalho se assemelha à estudada por Mattana (2005), cujos compostos majoritários foram os mesmos, com exceção do espatulenol que neste experimento apareceu em pequenas quantidades, além de outros compostos em comum como monoterpenos. Vale ressaltar que no trabalho de Mattana (2005) as plantas, apesar de serem de procedências diferentes, foram também cultivadas no município de Botucatu/SP.

As Tabelas 11 a 16 e a Figura 14 apresentam a média da proporção relativa das principais substâncias químicas identificadas no óleo essencial das folhas de *P. umbellata* em função das populações e das estações do ano avaliadas. Cada substância apresentou uma resposta distinta frente aos tratamentos estudados.

O rendimento de β -elemeno foi significativamente maior na estação do outono nas populações de Barra do Turvo e Iporanga (3,23 e 3,51%), por outro lado a primavera foi a estação que proporcionou menores rendimentos (1,50%). Observa-se na Figura 14 um decréscimo desta substância entre as estações do inverno para primavera, em seguida um aumento gradativo até a estação do outono, principalmente nas populações de Barra do Turvo e Iporanga, cujo rendimento foi bastante similar (Tabela 11).

Tabela 11. Rendimento de β -elemeno (%) no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	2,75Aa	1,22Ab	3,14Aa	3,41Ba	2,63B
Barra do Turvo	3,37Ab	1,52Ac	2,96Ab	5,07Aa	3,23A
Iporanga	3,29Ab	1,80Ac	3,43Ab	5,51Aa	3,51A
Jundiaí	1,60Bb	1,46Ab	2,73Aa	3,27Ba	2,26B
Média	2,75b	1,50c	3,08b	4,31a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Mattana (2005) trabalhando com a mesma espécie em função dos níveis de sombreamento constatou que esta substância está diretamente relacionada com o aumento do sombreamento. É possível relacionar a temperatura como o fator de influência em ambos os casos, pois no outono e em locais mais sombreados tem-se uma temperatura mais amena.

No caso da substância germacreno-D, ocorreu o inverso, foi estatisticamente superior na população de Jundiaí em todas as estações e com maior quantidade na estação da primavera, já no restante das populações os maiores valores ocorreram nas estações da primavera e verão, o que acarretou nos maiores rendimentos nestas estações (Tabela 12).

Tabela 12. Rendimento de germacreno-D (%) no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	10,52Bb	8,35Cb	21,36Ba	22,52Ba	15,69B
Barra do Turvo	13,91Bb	12,70Bb	21,43Ba	20,54Ba	17,14B
Iporanga	12,44Bb	13,76Bb	20,06Ba	19,65Ba	16,47B
Jundiaí	28,73Ab	40,02Aa	27,96Ab	30,36Ab	31,77A
Média	19,22b	15,88c	22,70a	23,27 ^a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Observa-se na Figura 14 um desempenho bem distinto desta substância; entre as estações do inverno e primavera, sua quantidade diminuiu na população de Jundiaí e aumentou nas demais populações de plantas, e o inverso ocorreu entre a primavera e o verão.

A resposta da substância α -selineno foi similar ao β -elemeno, ou seja, seu rendimento foi significativamente maior na estação do outono nas populações de Barra do Turvo e Iporanga, enquanto que a primavera proporcionou menores rendimentos (Tabela 13). A Figura 14 evidencia estes resultados, porém com algumas distinções, a substância α -selineno, nas populações de Barra do Turvo e Iporanga, tendeu a uma estabilização a partir do verão, já o rendimento de β -elemeno nessas populações tendeu a um aumento gradativo.

Tabela 13: Rendimento de α -selineno (%) no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	8,39Aa	4,79Bb	10,26Aa	9,35Ba	8,20B
Barra do Turvo	9,33Ab	6,11Ac	10,71Aa	11,65Aa	9,45A
Iporanga	9,05Ab	6,77Ac	10,46Aa	11,74Aa	9,50A
Jundiaí	8,96Aa	7,33Ab	9,16Aa	9,65Ba	8,77B
Média	8,93b	6,25c	10,15a	10,60a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Na população de Piquete obteve-se o maior rendimento de *E-nerolidol*, seguida pelas populações de Iporanga e Barra do Turvo que não se diferenciaram entre si, e Jundiaí que foi estatisticamente inferior (Tabela 14). Com relação à sazonalidade, a primavera se destacou com o maior rendimento dessa substância, principalmente na população de Piquete, logo a população de Jundiaí não foi influenciada.

Tabela 14. Rendimento de *E-nerolidol* (%) no óleo essencial de folhas de *P.umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	16,22Ab	30,25Aa	12,99Ab	11,99Ab	17,87A
Barra do Turvo	12,23Ab	23,51Ba	10,73Aa	10,47Aa	14,23B
Iporanga	12,45Ab	20,41Ba	11,46Ab	11,70Ab	14,01B
Jundiaí	0,50Ba	1,59Ca	2,21Ba	5,48Ba	2,41C
Média	10,36b	18,94 ^a	9,35b	9,91b	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

A população de Jundiaí também obteve os menores rendimentos de *E-cariofileno*, diferenciando-se significativamente das demais, e não foi influenciada pelas estações do ano como o ocorrido com a substância *E-nerolidol*; já populações de Piquete, Barra do Turvo e Iporanga obtiveram maior rendimento no inverno decrescendo gradualmente até a estação do outono (Tabela 15, Figura 14).

Tabela 15. Rendimento de *E*-cariofileno (%) no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	17,96Aa	14,67Ab	13,37Ab	11,13Ac	14,28A
Barra do Turvo	18,65Aa	11,58Bb	11,81Ab	11,21Ab	13,31A
Iporanga	18,86Aa	13,84Ab	12,18Ac	11,80Ac	14,17A
Jundiaí	8,03Ba	8,05Ca	7,76Ba	8,77Ba	8,15B
Média	15,87 ^a	12,03b	11,28c	10,73c	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Observa-se a mesma resposta para o óxido de cariofileno em relação às populações, cujo rendimento foi significativamente inferior na população de Jundiaí que foi influenciada pelas estações do ano, obtendo os maiores rendimentos na primavera e verão. Os maiores rendimentos ocorreram na primavera (Tabela 16). Na Figura 14 verifica-se que a população de Jundiaí se diferenciou das demais, pois enquanto o rendimento de óxido de cariofileno nas populações de Piquete e Barra do Turvo aumentou entre o inverno e a primavera, houve um decréscimo nas plantas de Jundiaí e o inverso ocorreu entre as estações da primavera e verão e do verão para o outono.

Tabela 16. Rendimento de óxido de cariofileno (%) no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

Populações	Sazonalidade				Média
	Inverno/07	Primavera/07	Verão/08	Outono/08	
Piquete	4,56Aa	5,12Aa	3,33Ab	4,25Aa	4,32A
Barra do Turvo	4,54Ab	5,45Aa	3,60Ac	3,66Ac	4,31A
Iporanga	4,46Aa	4,31Ba	3,52Aa	3,97Aa	4,06A
Jundiaí	1,35Bb	2,34Ca	2,47Ba	1,55Bb	1,93B
Média	3,72b	4,30 ^a	3,23c	3,36c	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

A partir da representação gráfica das respostas das principais substâncias químicas do óleo essencial em função das populações de plantas e da sazonalidade (Figura 14), é possível fazer uma análise global e alguns resultados bem interessantes podem ser visualizados.

Os compostos do óleo essencial da população de Jundiáí têm uma resposta bem diferente em relação aos das populações de Piquete, Barra do Turvo, Iporanga, principalmente as substâncias germacreno-D, *E*-cariofileno, óxido de cariofileno e *E*-nerolidol. Constata-se também, que as populações de Barra do Turvo e Iporanga apresentam uma forte relação, talvez por serem populações muito próximas geograficamente, é provável que tenham um parentesco genético próximo. Todavia seriam necessários estudos moleculares para comprovação desta afirmação.

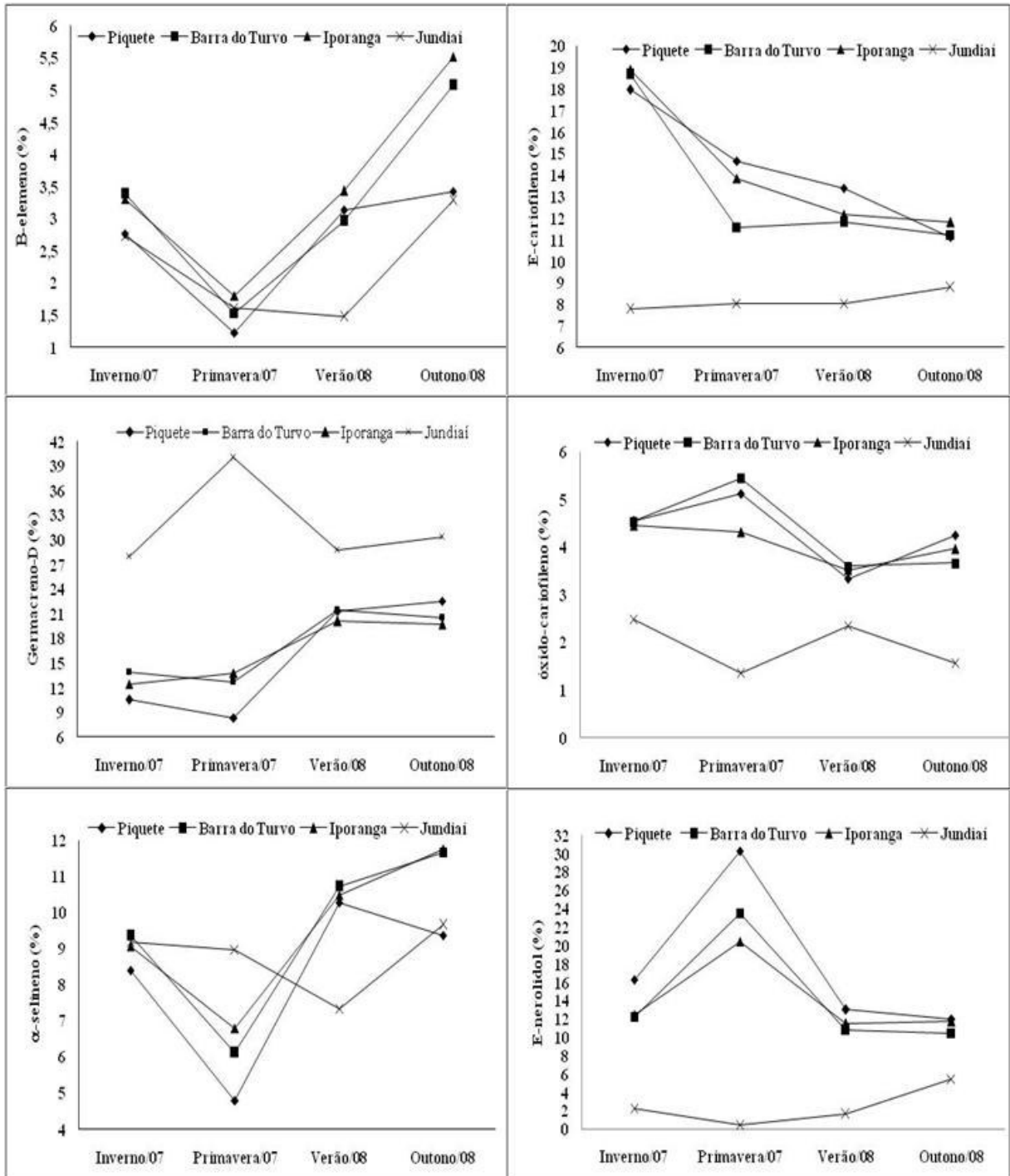


Figura 14. Proporção média relativa das principais substâncias químicas presentes no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função das populações de plantas e da sazonalidade.

A análise dos componentes principais (ACP) aplicada à composição química das principais substâncias presentes no óleo essencial nas quatro populações de *P. umbellata* estudadas revelou 94,33% da variação total nos dois primeiros componentes principais (eixos), sendo de 70,84% no primeiro eixo e de 23,49% no segundo. Essa análise permitiu separar as quatro populações estudadas em 3 grupos: grupo germacreno-D, constituído pelas populações Piquete, Barra do Turvo e Iporanga nas estações do outono e verão e pela população de Jundiaí, na primavera e no verão; grupo *E*-nerolidol, composto pelas populações Piquete, Barra do Turvo e Iporanga na estação da primavera e o último grupo *E*-cariofileno e demais substâncias formado populações Piquete, Barra do Turvo e Iporanga na estação do inverno (Figura 15).

A análise de componentes principais complementa e corrobora com os resultados de teste de médias apresentados, onde a população de Jundiaí se destaca das demais por apresentar um perfil das substâncias químicas presentes no óleo bem diferente do restante das populações, principalmente as substâncias *E*-nerolidol, cujo rendimento foi menor para Jundiaí e maior Piquete, Barra do Turvo e Iporanga em todas as estações climáticas, e germacreno-D, na estação da primavera.

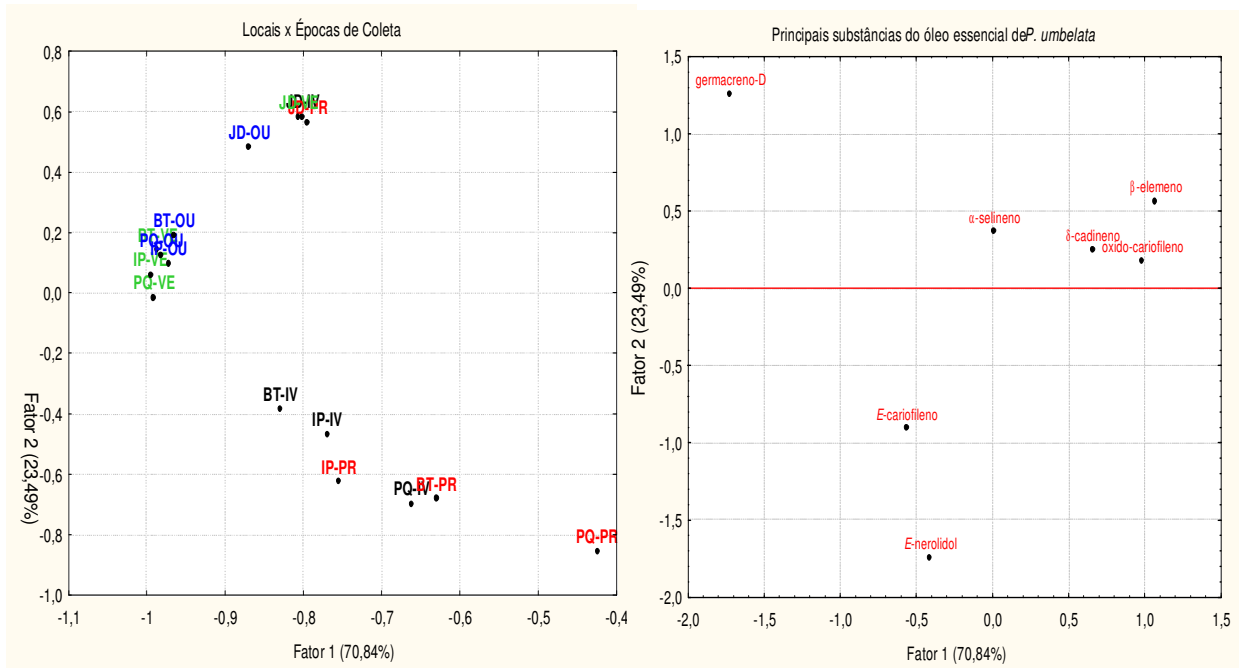


Figura 15: Análise de Componentes Principais (ACP) de quatro populações de plantas e quatro estações do ano baseada nas principais substâncias químicas do óleo essencial de folhas de *P. umbellata*. Onde: BT= Barra do Turvo, JD=Jundiáí, IP=Iporanga, PQ=Piquete, IV=inverno, PR=primavera, OU=outono, VE= verão.

A partir dos resultados apresentados é possível afirmar que existe uma variação química interpoblacional e decorrente dos fatores ambientais envolvidos em cada estação climática no óleo essencial de *P. umbellata*. Todavia, esta ocorrência não é característica apenas dessa espécie, muitos metabólitos secundários são influenciados por fatores ambientais e genéticos, sendo uma característica típica das espécies medicinais.

A proporção relativa das substâncias do óleo essencial de *P. umbellata* cultivada sob diferentes sombreamentos tiveram variações. Os rendimentos dos compostos β -elemeno e germacreno-D aumentaram com o aumento do sombreamento, enquanto que os rendimentos de *E*-nerolidol, *E*-cariofileno e o óxido de cariofileno diminuíram com o aumento do sombreamento (Mattana,2005). Já em *Lippia alba*, os rendimentos de *E*-cariofileno e de óxido de cariofileno aumentaram com o aumento do sombreamento (Ventrella, 2000)

Chaves (2002) constatou variação sazonal na composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, no inverno a proporção relativa de eugenol decresceu,

aumentando em função de estações com temperaturas mais elevadas, o autor observou que os monoterpenos tiveram menores rendimentos no inverno, enquanto que os sesquiterpenos tiveram os maiores nesta estação.

Em *Cymbopogon citratus*, no período chuvoso ocorreu uma diminuição no rendimento de citronelal, enquanto que o de geraniol aumentou, já no período seco, o conteúdo de citronelal aumentou e o de geraniol diminuiu e o rendimento de neral não foi influenciado pelas variações climáticas (Blank et al., 2007). Já, Castro et al. (2008) estudando variação estacional na composição de óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* constataram que no mês de fevereiro a concentração de citronelal foi superior no óleo essencial extraído de folhas colhidas em São Bento Abade, diferentemente de folhas colhidas em São João del Rei, onde o rendimento foi superior no óleo de folhas colhidas em agosto.

Em *Mentha x piperita* segundo Deschamps et al. (2008), existe uma variação na composição química entre cultivares desta espécie. Na cultivar Grapefruit Mint o linalol é constituinte majoritário, as demais cultivares apresentaram composições variadas, sendo α -terpineol e D-germacreno presentes em maior porcentagem na cultivar Banana Mint e α -felandreno-8-ol e *cis*-ocimeno, na cultivar Persian Mint. Os autores alegam que esta variação da composição química nos genótipos de *Mentha* está relacionada com interação de diversos fatores, como genótipo, ontogenia, luz, temperatura, água e nutrientes.

A espécie de *Lippia alba* cultivada em Ilhéus apresentou o citral como constituinte majoritário, atingindo a máxima produção na primavera e, no verão, os menores rendimentos (Silva, et al., 2006). As variações na constituição química dos óleos essenciais da *Lippia alba*, podem ser atribuídas aos fatores ambientais como a influência do clima e solo sobre as plantas analisadas, bem como a época de colheita das mesmas.

No caso da variação da proporção relativa das substâncias que compõem o óleo essencial de *P.umbellata* nas diferentes populações de plantas e no decorrer das estações do ano avaliadas, é notável que exista uma relação do metabolismo secundário não só com fatores ambientais, como temperatura, umidade relativa e precipitação, mas também com fatores genéticos, como a divergência nítida da população de Jundiá com as demais, podendo supor a existência de quimiotipos dentro desta espécie, neste caso germacreno-D para população de Jundiá e *E*-nerolidol para as populações de Piquete, Barra do Turvo e Iporanga.

7.2. Experimento 2: Espaçamentos entre plantas x Idades de Colheita (população Jundiá)

7.2.1. Produção de biomassa foliar e variáveis relacionadas

Os resultados apresentados na Tabela 17 mostram que a espécie *P. umbellata* respondeu apenas às idades colheitas, cujas variáveis biométricas altura de plantas, número de ramos e de folhas, área foliar e biomassa fresca e seca de folhas tiveram efeito significativo. Enquanto que o espaçamento entre plantas e a consequente interação dos fatores espaçamentos x colheitas não ofereceram resposta de nenhuma das variáveis biométricas estudadas.

Tabela 17. Valores de F das variáveis biométricas: altura de plantas (ALT), número de ramos (NR), número de folhas (NF), área foliar (AF), biomassa fresca de folhas (BFF) e seca de folhas (BSF) de plantas de *P. umbellata*, em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Causas de variação	GL	ALT	NR	NF	AF	BFF	BSF
Espaçamento (E)	2	0,148 ^{ns}	3,414 ^{ns}	1,691 ^{ns}	0,611 ^{ns}	1,796 ^{ns}	1,416 ^{ns}
Blocos	3	1,080 ^{ns}	1,116 ^{ns}	1,479 ^{ns}	1,066 ^{ns}	1,475 ^{ns}	1,452 ^{ns}
Resíduo (e)	6	---	---	---	---	---	---
Colheita (C)	1	42,617*	39,68*	7,359*	13,708*	7,121*	7,328*
Interação E x C	2	1,627 ^{ns}	0,145 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,181 ^{ns}	0,213 ^{ns}	0,149 ^{ns}
Resíduo (c)	9	---	---	---	---	---	---
C.V. e (%)	---	21,69	15,21	31,89	74,61	39,00	38,44
C.V. c (%)	---	15,09	24,40	27,61	77,59	44,58	44,22
Média geral	---	81,31	2,67	16,41	6742,49	108,45	19,86

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A Tabela 18 apresenta a média geral das variáveis biométricas estudadas em função dos diferentes espaçamentos entre plantas e idades de colheita. Observa-se que não houve diferença significativa para o tratamento espaçamento de plantas, no qual todas as variáveis tiveram valores semelhantes, porém as plantas espaçadas a 1,0 m obtiveram maiores valores, devido provavelmente ao maior espaço útil de cada planta que favoreceu seu crescimento e desenvolvimento.

Tabela 18. Médias das variáveis biométricas: altura de plantas, em centímetros (ALT), número de folhas (NF), número de ramos (NR), área foliar, em cm² (AF), biomassa fresca (BFF) e seca de folhas (BSF), em gramas, de *P. umbellata*, em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Espaçamentos (m)	ALT	NR	NF	AF	BFF	BSF
0,5 X 0,5	78,69 A	2,46 A	14,27 A	5158,30 A	89,30 A	16,63 A
0,5 x 0,75	83,41 A	2,58 A	17,03 A	7308,96 A	106,77 A	19,88 A
0,5 x 1,0	81,84 A	2,97 A	17,94 A	7760,22 A	129,27 A	23,06 A
Colheitas	ALT	NR	NF	AF	BFF	BSF
6 meses	97,67 A	1,83 B	13,90 B	10.696,52 A	134,78 A	24,72 A
12 meses	64,96 B	3,51 A	18,92 A	2.782,47 B	82,11 B	15,00 B

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$)

A idade de colheita influenciou significativamente todas as variáveis estudadas. Na 1ª colheita, as plantas com 6 meses estavam mais altas, com folhas maiores e produziram maior quantidade de biomassa fresca e seca de folhas, na 2ª colheita, as plantas com 12 meses produziram mais ramos e folhas, porém estavam mais baixas, com menor área foliar e produziram menos biomassa fresca e seca de folhas em relação às plantas colhidas pela primeira vez.

7.2.1.1. Altura de plantas

As plantas colhidas com 6 meses apresentaram-se mais altas em relação às da 2ª colheita (64,96 cm), cerca de 30 centímetros maiores (97,67 cm), em todos os espaçamentos estudados. Todavia, os espaçamentos entre plantas não apresentaram diferença significativa no teste de médias nas duas colheitas realizadas, sendo que nas plantas de 6 meses a maior altura ocorreu no espaçamento de 0,5 x 0,75 m, já as plantas com 12 meses espaçadas 0,5 x 1,0 m foram mais altas que as demais, porém sem efeito significativo em ambas as colheitas (Tabela 19).

Tabela 19. Média da altura de *P.umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	99,50Aa	101,50Aa	92,00Aa	97,67A
12 meses	57,88Ba	65,31Ba	71,68Ba	64,96B
Média	78,69a	83,41a	81,84 ^a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Observa-se que este resultado é semelhante ao ocorrido no experimento de sazonalidade x populações, onde a altura das plantas diminuiu entre o inverno (1ª colheita) e a primavera (2ª colheita), priorizando a ramificação e formação de folhas conforme se observa também neste caso (Tabela 19).

Nascimento et al. (2007) também observaram que os espaçamentos estudados em *Pfaffia glomerata* não geraram diferenças entre as colheitas estudadas, já as colheitas estudadas sim, cuja altura de plantas apresentou uma resposta quadrática, atingindo o máximo aos 172 dias após a germinação, fato também observado para *Ocimum selloi* (Costa et al., 2007).

No trabalho realizado por Blank et al. (2007) que estudaram diferentes densidades de plantio e épocas de colheitas de capim-limão, também foi observada interação destes fatores na altura das plantas. Na segunda colheita, as plantas mais adensadas (111.111 plantas.ha⁻¹) apresentaram-se mais altas, já na terceira, quarta e quinta colheitas houve uma resposta quadrática e a densidade de 55.555 plantas.ha⁻¹ favoreceu maior altura, os autores concluíram que no início do cultivo não houve competição entre as touceiras e a partir da terceira, a competição limitou o crescimento em altura.

No presente trabalho a diminuição da altura das plantas entre as colheitas está relacionada, provavelmente à colheita das folhas, que mesmo sem a poda da região apical, favoreceu o desenvolvimento de ramos laterais, com a ativação das gemas axilares para formação dessas brotações, em consequência desse fator houve detrimento do crescimento em comprimento, resultados semelhantes foram observados por Chaves (2002).

Outro fator que pode certamente está relacionado é a técnica utilizada para aferição da altura, cujo valor foi tomado a partir do colo até a última folha totalmente

expandida. Como o pecíolo dessa espécie é relativamente longo, favorece com que as folhas do ápice da planta ultrapassem o comprimento do ramo principal, no entanto entre uma colheita e outra as folhas tenderam a ser menores e em maior quantidade, devido ao favorecimento das brotações laterais, fato este que levou a diminuição da altura neste intervalo de tempo.

7.2.1.2. Número de ramos e folhas

O número de ramos não foi influenciado pelos espaçamentos entre plantas, no entanto houve efeito significativo nas colheitas estudadas (Tabela 20). A colheita das plantas com 12 meses proporcionou uma quantidade de ramos, significativamente superior (3,51) às colhidas com 6 meses (1,83), cerca de duas vezes a mais em todos os espaçamentos estudados.

Tabela 20. Média do número de ramos de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	1,64Ba	1,82Ba	2,03Ba	1,83B
12 meses	3,28Aa	3,34Aa	3,90Aa	3,51A
Média	2,46a	2,58a	2,97a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

No experimento de sazonalidade x população também se observou um aumento da quantidade de ramos no decorrer das estações do ano que também está relacionado com a idade das plantas, esta variável, na primeira colheita (inverno) foi inferior que nas demais colheitas. Chaves (2000), também constatou este efeito em *Ocimum gratissimum*, cuja produção de caules foi inferior na primeira colheita com um aumento linear da produção de ramos conforme a intensidade das colheitas.

O número de ramos, segundo Taiz & Zeiger (2004), está relacionado com o grau de dominância apical que cada vegetal apresenta. Algumas espécies apresentam um único eixo de crescimento com poucas ramificações laterais, devido à característica de forte inibição do crescimento das gemas laterais, em outras espécies que não expressam dominância apical ocorre o crescimento de ramos laterais e, ainda existem os fatores genéticos e ambientais que influenciam o crescimento de ramos e gemas laterais. Neste caso o fator genético, no caso a idade das plantas parece ser um fator relevante na formação dos ramos, por ser considerada uma

espécie perene tem tendência de ramificar conforme o aumento de sua idade e da intensidade de podas.

O número de folhas acompanhou o número de ramos, cujo valor foi maior nas plantas colhidas com 12 meses em todos os espaçamentos estudados, com um aumento de 5 folhas da primeira para segunda colheita (Tabela 21). No entanto, ao analisar os fatores isoladamente, observa-se que não houve diferença significativa nas colheitas dentro de cada espaçamento e nem dos espaçamentos dentro de cada colheita, porém as plantas submetidas a 0,5 x 1,0 m e 0,5 x 0,75 m obtiveram maior quantidade de folhas (média de 17 folhas).

Tabela 21. Média do número de folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	11,57Aa	14,68Aa	15,46Aa	13,90
12 meses	16,97Aa	19,38Aa	20,42Aa	18,92
Média	14,27 ^a	17,03 ^a	17,94a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Apesar de o espaçamento de plantas não ter provocado respostas significativas no número de ramos e folhas, o aumento destas variáveis foi proporcional ao maior espaçamento e pode estar relacionada a uma competição por luz, água e nutrientes no menor espaçamento, o que muitas vezes dificulta o desenvolvimento da planta (Ferreira et al., 2004; Blank et al., 2007; Costa et al., 2007)

7.2.1.3. Área foliar

A área foliar foi significativamente inferior nas plantas colhidas com 12 meses em relação às com 6 meses, uma diminuição de 74% em média da primeira para segunda colheita (Tabela 22), já os espaçamentos entre plantas não foram significativos para esta variável, apesar de se notar um aumento da área foliar a medida do maior espaçamento.

Tabela 22. Média da área foliar (cm²) de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	8.234,76Aa	11.909,14Aa	11.945,63Aa	10.696,52A
12 meses	2.081,83Aa	2.708,77Ba	3.574,80Aa	2.782,47B
Média	5158,30 ^a	7308,96a	7760,22a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Guerreiro (2006) também observou uma queda da área foliar após a primeira colheita e segundo a autora, essa queda ocorreu devido ao direcionamento de fotoassimilados para outras regiões da planta, que não a folha, o que é aceitável, uma vez que houve um aumento do número de ramos e folhas, ou seja, a planta priorizou a formação de novos órgãos em detrimento da expansão da área foliar.

7.2.1.4. Biomassa foliar

As plantas colhidas com 6 meses produziram maior quantidade de biomassa fresca foliar em relação às plantas com 12 meses em todos os espaçamentos (Tabela 23). O espaçamento 0,5 x 1,0 m proporcionou maiores valores de biomassa fresca em ambas as colheitas, mais expressivamente, na segunda colheita onde a biomassa foi praticamente o dobro das plantas no espaçamento 0,5 x 0,5 m (de 57 gramas para 111 gramas), porém sem efeitos estatísticos. A biomassa seca apresentou uma resposta semelhante à biomassa fresca das folhas, cujos valores só foram significativos para o fator colheita, a segunda colheita também foi inferior (Tabela 24).

Tabela 23. Valores médios da massa de matéria fresca (gramas) de folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	121,21Aa	136,55Aa	146,58Aa	134,78 A
12 meses	57,39Aa	76,99Aa	111,96Aa	82,11 B
Média	89,30 ^a	106,77 ^a	129,27a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Tabela 24. Valores médios da massa de matéria seca (gramas) de folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	22,55Aa	24,96Aa	26,62Aa	24,72 A
12 meses	10,72Aa	14,80Aa	19,50Aa	15,00 B
Média	16,63a	19,88 ^a	23,06 ^a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Analisando as variáveis em conjunto, é provável que após a primeira colheita tenha ocorrido a quebra da dominância apical, que pode ter favorecido o surgimento de ramificações e novas folhas diminuindo a altura das plantas. Mesmo com maior número de ramos e folhas na segunda colheita, a área foliar total foi inferior, o que certamente ocasionou a menor produção de biomassa fresca e seca nessa colheita, visto que essa variável está diretamente ligada produção de biomassa das plantas.

A Tabela 25 exhibe a densidade de plantas por hectare em função dos espaçamentos estabelecidos e as relativas massas de matéria fresca e de matéria seca (kg ha^{-1}) baseadas nos resultados obtidos da média geral destas variáveis (Tabelas 23 e 24). Perante esses resultados, pode-se concluir que a densidade de 40.000 plantas ha^{-1} (0,5 m x 0,5 m) apresenta maior produção de biomassa fresca (3.572 kg ha^{-1}) e seca total por hectare (665.2 kg ha^{-1}) que as demais densidades de plantas.

Tabela 25. Produção de massa de matéria fresca e da matéria seca total de *P. umbellata* (kg ha^{-1}) em função dos três espaçamentos utilizados no experimento.

Espaçamentos (m)	Densidade Plantas ha^{-1}	Biomassa fresca kg ha^{-1}	Biomassa seca kg ha^{-1}
0,5 x 0,5	40.000	3.572	665,2
0,5 x 0,75	26.666	2.845	530,1
0,5 x 1,0	20.000	2.585	461,8

Apesar de o espaçamento 0,5 x 1,0 m ter proporcionado maior produção de biomassa, quando se avalia este aspecto considerando o número total de plantas por área em cada espaçamento estudado, nota-se que essa relação tem efeitos significativos em termos

rentáveis para o produtor, visto que é possível produzir mais biomassa em uma menor área cultivável.

Os resultados deste trabalho corroboram com Wanderer & Barros (2007) que estudaram efeito do espaçamento de plantas sobre o rendimento de biomassa de duas cultivares de *Melissa officinalis* e constataram que o espaçamento em si não teve efeito significativo sobre o rendimento de biomassa, mas o maior adensamento de plantas por área proporcionou o melhor rendimento de biomassa de melissa.

Portanto, vale ressaltar que quando se analisa os efeitos de espaçamentos entre plantas na produção de biomassa foliar deve-se levar em consideração o fator densidade total de plantas por hectare que cada espaçamento acomoda.

Ferreira et al. (2004) analisaram o crescimento de *Trapaeolum majus* “Jewel”, em função de diferentes espaçamentos entre plantas (0,20, 0,30 e 0,40 m x 0,60m, respectivamente 60.000, 43.956 e 33.000 plantas.ha⁻¹) e constataram que as plantas não toleraram adensamento intensivo, sendo que a altura e massa seca máximas ocorreram no espaçamento 0,40 x 0,60 m, já a maior área foliar ocorreu no espaçamento 0,30 m entre plantas.

Da Silva et al. (2004) avaliaram o crescimento e a produção de cúrcuma em função de população de plantas e foi verificado que a produtividade decresceu de 25 t ha⁻¹, obtida com o espaçamento de 5 cm entre plantas, para 18 t ha⁻¹ com o espaçamento de 40 cm, no entanto, os ganhos de produtividade obtidos em espaçamentos menores que 10 cm em cúrcuma não superaram as diferenças de gastos de rizomas para os respectivos plantios.

Blank et al. (2007) constataram que o aumento da densidade de plantio (33.333, 49.382, 55.555 e 111.111 plantas ha⁻¹) na produção de *Cymbopogon citratus*, apresentou uma resposta linear decrescente da massa seca por touceira.

Gomes et al. (2007) estudaram a densidade de plantio em *Calendula officinalis* (60.000, 80.000, 100.000 e 120.000 plantas ha⁻¹) e os resultados mostraram que a produção máxima de biomassa fresca da parte aérea das plantas foi de 20.037 kg ha⁻¹, sob população de 91.037 plantas ha⁻¹ e a biomassa seca não foi influenciada pelos tratamentos.

Vasconcelos et al. (2008), estudando a produtividade de material vegetal de *Achilleia millefolium* sob o efeito de diferentes densidades de plantio (80.000, 40.000, 26.667 plantas ha⁻¹) e averiguaram que a densidade de 80.000 plantas ha⁻¹ proporcionou maior produtividade.

Trabalhos sobre os efeitos de espaçamentos entre plantas na produção de biomassa de *P. umbellata* não foram encontrados, porém este tema vem sendo estudado em diversas espécies medicinais, como se verifica nos trabalhos relatados e, ao que tudo indica cada planta parece responder de forma diferenciada, segundo Andrade & Casali (1999), acredita-se que exista um espaçamento ótimo para cada espécie.

7.2.2. Rendimento e composição química do óleo essencial

A análise de variância das variáveis fitoquímicas do óleo essencial apresentou efeito apenas para o fator idade de colheitas, cujos valores de F foram significativos para a maioria dos dados analisados, tais como o rendimento do óleo essencial e as substâncias que o compõem: δ -elemeno, γ -muuroleno, germacreno-D, α -selineno, δ -cadineno e espatulenol, com exceção, da substância *E*-cariofileno, que não respondeu a nenhum dos fatores estudados. O fator espaçamento entre plantas, bem como sua interação com as idades de colheita não obtiveram respostas significativas dessas variáveis (Tabela 26).

Observa-se que a análise de variância fitoquímica acompanhou o mesmo padrão dos dados biométricos, ou seja, a variação estatística das variáveis estudadas ocorreu somente para o fator idade de colheita.

Tabela 26. Valores de F das variáveis fitoquímicas do óleo essencial, rendimento (ÓLEO) e principais substâncias: δ -elemeno (DEL), *E*-cariofileno (ECA), γ -muuroleno (GMU), germacreno-D (GED), α -selineno (ASE), δ -cadineno (DCA), e espatulenol (ESP), em folhas de *P. umbellata*, em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Causas de variação	GL	ÓLEO	DEL	ECA	GMU	GED	ASE	DCA	ESP
Espaçamentos (E)	2	0,837 ^{ns}	1,905 ^{ns}	2,090 ^{ns}	0,070 ^{ns}	1,587 ^{ns}	4,537 ^{ns}	0,948 ^{ns}	1,998 ^{ns}
Blocos	3	3,741 ^{ns}	0,065 ^{ns}	0,308	0,105 ^{ns}	0,646 ^{ns}	0,564 ^{ns}	0,309 ^{ns}	0,385 ^{ns}
Resíduo (e)	6	---	---	---	---	---	---	---	---
Colheitas (C)	1	184,650*	65,436*	0,287 ^{ns}	68,781*	184,451*	79,222*	174,73*	99,140*
Interação E x C	2	1,350 ^{ns}	0,609 ^{ns}	0,284 ^{ns}	0,886 ^{ns}	0,082 ^{ns}	0,932 ^{ns}	2,006 ^{ns}	0,599 ^{ns}
Resíduo (c)	9	---	---	---	---	---	---	---	---
C.V. e (%)	---	22,08	10,87	17,07	12,87	5,82	5,87	8,98	21,25
C.V. c (%)	---	19,00	15,40	28,62	13,08	12,03	9,01	9,54	29,52
Média	---	0,21	3,23	7,25	4,02	30,26	8,29	7,84	2,57

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

7.2.2.1. Rendimento do óleo essencial

As plantas colhidas com 6 meses de idade tiveram maior rendimento de óleo essencial (0,32%), sendo significativamente superiores às plantas com 12 meses (0,10%) em todos os níveis de espaçamentos. Na primeira colheita, o maior rendimento ocorreu nas plantas sob 0,5 x 1,0 m e, na segunda, nas plantas sob 0,5 x 0,5 m, porém sem efeitos significativos em ambas as colheitas (Tabela 27).

Tabela 27. Rendimento de óleo essencial (%) nas folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	0,31Aa	0,31Aa	0,36Aa	0,32A
12 meses	0,11Ba	0,09Ba	0,10Ba	0,10B
Média	0,21a	0,20a	0,23a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

Como se pode constatar, as colheitas exerceram forte influência no rendimento do óleo essencial de *P. umbellata*, entre a primeira e a segunda colheita decaiu de 0,32% para 0,10% em média. No presente trabalho, as colheitas estão relacionadas a dois fatores em conjunto, a idade das plantas e época em que foram colhidas.

A primeira colheita foi realizada no período do inverno de 2007 quando as plantas estavam com 6 meses de idade, como se pode observar nas Figuras 26 e 27 dos dados meteorológicos, no mês de julho a temperatura e a precipitação foram relativamente baixas, quando comparadas com os demais meses; a segunda colheita (plantas com 12 meses de idade) foi realizada em dezembro de 2007, mês em que as temperaturas estavam mais elevadas e também houve um aumento da precipitação neste intervalo de tempo.

Segundo Taiz & Zeiger (2004), as fases de crescimento e desenvolvimento dos ciclos fenológicos das plantas medicinais podem apresentar alterações bioquímicas e fisiológicas, capazes de afetar a elaboração dos princípios ativos, tanto no aspecto quantitativo quanto qualitativo. No caso do presente trabalho pode ter ocorrido uma alteração em termos quantitativos no rendimento do óleo essencial devido ao clima e a idade em que as plantas

se encontravam no momento de cada colheita. Marchese & Figueira (2005) também relatam que os fatores ambientais, tais como, fotoperíodo, radiação e temperatura são fortes influenciadores do crescimento e desenvolvimento das plantas.

Mattos & Inecco (2002) avaliaram *Mentha arvensis* em duas épocas distintas (seca e chuvosa), e averiguaram uma resposta quadrática com o decorrer das colheitas independente da época estudada, cujo máximo rendimento de óleo ocorreu aos 81 dias após o plantio, decaindo até a última colheita (102 dias); os autores observaram que a estação seca proporcionou maior rendimento de óleo que a chuvosa e conferem esse resultado ao estresse ocasionado pelas baixas temperaturas. Resultados semelhantes foram observados em *Baccharis trimera*, cuja máxima produção de óleo essencial ocorreu na terceira colheita (12 meses após o transplante), 2,5 a 3,0%, período que coincidiu com o outono (Palácio et al., 2007)

Outro resultado interessante no trabalho de Mattos & Inecco (2002) é a correlação positiva encontrada entre o rendimento de óleo essencial e biomassa foliar, corroborando com os dados do presente trabalho, onde essas variáveis foram maiores na primeira colheita.

A relação entre produção de biomassa e óleo essencial é relatada por Marchese & Figueira (2005) que afirmam que a produção de óleos essenciais está associada à maior radiação e maior taxa fotossintética das plantas, porém altas irradiâncias em plantas esciófitas, como é o caso *P. umbellata*, normalmente causam sintomas de clorose e necrose com a fotodegradação dos cromopigmentos, levando a redução da fotossíntese e da biomassa (Marchese et al., 2004; Mattana et al., 2006).

Já *Cymbopogon citratus*, estudada por Leal et al. (2003), apresentou um decréscimo gradual do óleo essencial na medida em que a idade das plantas aumentava, segundo os autores esta queda ocorreu devido às baixas temperaturas verificadas no intervalo de tempo das colheitas, estes resultados corroboram com o presente trabalho. West (1990) citado por Leal et al. (2003), afirma que a medida que a planta envelhece ocorre a redução proporcional dos seus processos biossintéticos e, o conseqüente decréscimo gradativo nos rendimentos de óleos essenciais, é devido às alterações internas nas glândulas que os produzem.

Blank et al. (2003) estudando a mesma espécie não constataram influência das colheitas no rendimento de óleo, no entanto as densidades de plantio (33.333, 49.382, 55.555 e 111.111 plantas ha⁻¹) resultaram em regressões lineares crescentes para o

rendimento de óleo essencial e a massa seca da parte aérea, recomendado a utilização de 111.111 plantas ha⁻¹ (0,30 x 0,30 metros).

Khazaie et al. (2007) avaliaram o efeito de épocas de colheita e diferentes densidade de plantas no rendimento do óleo essencial de duas espécies medicinais (*Thymus vulgaris* e *Hyssopus officinalis*), que demonstraram respostas distintas. O rendimento do óleo essencial de *T. vulgaris* foi menor na segunda colheita e nas plantas mais adensadas, para *H. officinalis* não houve efeitos significativos.

Os trabalhos expostos evidenciam que cada espécie responde diferentemente aos fatores ambientais, genéticos e técnicos, como época, idade e densidade de plantio, portanto a necessidade de estudos específicos relacionados aos aspectos agrônômicos com diferentes técnicas de cultivos e/ou manejo de espécies medicinais.

A Tabela 28 mostra a produção de biomassa seca e do óleo essencial das folhas (baseado na biomassa seca) conforme a densidade de plantas ha⁻¹. Neste caso, é importante considerar a relação biomassa seca/óleo essencial em função dos fatores estudados.

Tabela 28. Produção biomassa seca e de óleo essencial de folhas de *P. umbellata* (kg ha⁻¹) em função da densidade de plantas e das idades de colheita.

Biomassa seca (kg ha⁻¹)				
Colheitas	Densidade Plantas ha⁻¹			
	40.000	26.666	20.000	Média
6 meses	902,0	665,5	532,4	700,0
12 meses	428,8	394,6	390,0	404,5
Média	665,4	530,1	461,2	
Óleo essencial (kg ha⁻¹)				
Colheitas	Densidade Plantas ha⁻¹			
	40.000	26.666	20.000	Média
6 meses	3,26	2,43	2,28	2,66
12 meses	0,54	0,46	0,45	0,48
Média	1,90	1,44	1,37	

Na colheita de 6 meses, um quilo de óleo essencial foi produzido em 263 quilos de folhas, enquanto que na colheita de 12 meses foram necessários 842 quilos de folhas. Já nas densidades de plantas, nota-se que para cada quilo de óleo essencial, são necessários 350 368 e 336 quilos de folhas (40.000, 26.666 e 20.000 plantas ha⁻¹), ou seja, as plantas mais adensadas

produziram maior quantidade de biomassa seca, cerca de 200 kg ha⁻¹ a mais em relação às menos adensadas, porém a relação biomassa/óleo essencial foi muito semelhante entre os espaçamentos estudados.

Marchese (1999) relata que um aumento na concentração ou rendimento de compostos secundários sob condição de estresse, não significa necessariamente um aumento no rendimento destes compostos (produção por planta ou por área cultivada), pois geralmente ocorre uma redução da fitomassa em face da concorrência por assimilados entre o metabolismo secundário e o metabolismo primário.

Perante esses resultados, pode-se afirmar que a produção de óleo essencial de *P. umbellata* é fortemente influenciada pela idade e/ou época de colheita e não responde ao adensamento de plantas, o que leva a crer não existir estresse por competição intraespecífica. Mas, como é habitual a comercialização de plantas medicinais por quantidade de biomassa e não de princípio ativo, ainda é mais vantajosa a utilização da densidade de 40.000 plantas ha⁻¹, evidenciando neste trabalho a importância dos estudos agrônomicos e fitoquímicos na qualidade química das plantas medicinais.

7.2.2.2. Composição química do óleo essencial

Foram identificadas 36 substâncias químicas no óleo essencial, em ambos os tratamentos, espaçamento de plantas e idade de colheita, perfazendo em média 95% do total identificado, não havendo compostos diferentes entre os tratamentos estudados (Tabela 46). Os terpenos foram as substâncias encontradas em maior proporção no óleo essencial dentre as identificadas, em sua maioria os sesquiterpenos e dois monoterpênicos α -pineno e β -pineno, também foram identificados dois aldeídos: decanal e octadecanal.

As substâncias identificadas em maior proporção em média no óleo essencial foram germacreno-D (30,26%), α -selineno (8,29%), δ -cadineno (7,83%), *E*-cariofileno (7,25%), γ -muuroleno (4,0%), δ -elemeno (3,23%) e espatulenol (2,57%), compreendendo em média 63% do total identificado, conforme expõem as Tabelas 29 e 30.

Conforme os resultados da Análise de Variância, somente a idade de colheita influenciou estatisticamente a proporção relativa média das substâncias químicas (Tabela 30), o que não ocorreu para o espaçamento de plantas (Tabela 29).

Tabela 29. Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* (L.) em função dos espaçamentos entre plantas.

Substâncias (%)	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
δ-elemeno	3,11a	3,16 ^a	3,43a	3,23
<i>E</i> -cariofileno	7,33a	7,83 ^a	6,58a	7,25
γ-muuroleno	3,96a	4,02 ^a	4,03a	4,00
germacreno-D	31,02a	30,31 ^a	29,46a	30,26
α-selineno	8,46a	7,87 ^a	8,55a	8,29
δ-cadineno	7,56a	8,01 ^a	7,93a	7,83
EspatulenoI	2,26a	2,69 ^a	2,77a	2,57
Total	63,70	63,89	62,75	63,45

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p > 0,05$).

A idade de colheita foi significativa para quase todas as substâncias estudadas, com exceção do *E*-cariofileno que variou muito pouco entre a primeira e segunda colheita (7,02 para 7,48%). As proporções relativas dos compostos δ-elemeno (4,06/2,41%), germacreno-D (40,36/20,17%) e α-selineno (9,65/6,93%) foram praticamente o dobro nas plantas colhidas com 6 meses em relação às plantas com 12 meses, sendo significativamente superior, e o inverso ocorreu para os compostos, γ-muuroleno (3,12/4,90%), δ-cadineno (5,82/9,86%) e espatulenol (1,03/4,12%), cujas proporções relativas aumentaram na segunda colheita (Tabela 30).

Tabela 30. Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* (L.) em função das idades de colheita.

Substâncias (%)	COLHEITAS		Média
	6 meses	12 meses	
δ-elemeno	4,06a	2,41b	3,23
<i>E</i> -cariofileno	7,02a	7,48a	7,25
γ-muuroleno	3,12b	4,90a	4,00
germacreno-D	40,36a	20,17b	30,26
α-selineno	9,65a	6,93b	8,29
δ-cadineno	5,82b	9,86a	7,83
EspatulenoI	1,03b	4,12a	2,57
Total	71,06	55,87	63,47

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p > 0,05$).

Esta variação na concentração de alguns compostos pode estar relacionada tanto com as condições climáticas no momento da colheita como também com estágio fenológico (ciclo de produção) das plantas que pode favorecer ou desfavorecer a produção de compostos de acordo com sua necessidade de gasto de energia, proteção e/ou atração de insetos.

A maioria dos trabalhos sobre a variação de metabólitos secundários em plantas medicinais sob influência de colheitas refere-se mais às condições climáticas que caracterizam as estações do ano que aos fatores intrínsecos, como as fases de crescimento e desenvolvimento.

Blanco (2001) verificou alteração da proporção relativa dos compostos do óleo essencial de alecrim conforme as épocas em que as plantas foram colhidas. O composto α -pineno apresentou maior proporção relativa nas colheitas durante o inverno e primavera, o mirceno e cânfora na primavera, 1,8 cineol nas colheitas do verão, outono e inverno e os compostos borneol e *E*-cariofileno nas colheitas de verão e outono. Segundo a autora, a variação desses compostos está relacionada aos fatores externos à planta, que influenciam de forma contrária a biossíntese, favorecendo o aumento da concentração de um composto em detrimento da formação de outro, que podem ser por diversas causas, ambiental, biológica ou mesmo agronômica.

Mattos & Inecco (2002) constataram que a produção de mentol de *Mentha arvensis* avaliada em duas épocas distintas (seca e chuvosa), foi maior na estação chuvosa e acompanhou a produção do óleo essencial, obtendo uma resposta quadrática com rendimento máximo de óleo aos 81 dias após o plantio.

No presente estudo, a prática agronômica não influenciou a proporção relativa das substâncias presentes no óleo essencial da espécie em questão, visto que não houve variação dos mesmos nos espaçamentos entre plantas estudadas, estando, as variações ocorrentes, relacionadas às variáveis que influenciam a idade das plantas colhidas.

No experimento populações de plantas x sazonalidade foi avaliada a população de Jundiaí, cujas plantas do presente estudo pertencem a esta população, portanto é possível averiguar algumas similaridades em ambos os experimentos e chegar a algumas conclusões.

No caso de *E*-cariofileno, pode-se afirmar que é uma substância estável na espécie, pois nos dois experimentos não foi influenciado pelas épocas de colheita, tanto pelos fatores intrínsecos como ambientais, pois no experimento de sazonalidade, houve 4 colheitas nas mesmas plantas em estações distintas. Todavia é válido salientar que cada espécie, bem como seus metabólitos secundários, apresenta respostas diversas aos fatores estudados.

Haber (2008) observou que esse composto em *Lychnophora pinaster* teve um aumento significativo nas colheitas realizadas (verão, outono e inverno), atingindo maior proporção no verão, a autora salienta que além das condições de crescimento e estágio fenológico das plantas, fatores ambientais influenciam a biossíntese dos metabólitos secundários presentes nos óleos essenciais, podendo ocasionar grandes variações inter e intraespecíficas. Resultados semelhantes para esta substância foram encontrados por Facanali (2008) estudando *Ocimum selloi*.

A proporção relativa de germacreno-D já foi diferente em ambos os estudos, ou seja, no experimento de sazonalidade a maior proporção ocorreu na primavera, já no presente trabalho foi nas plantas colhidas com 6 meses que coincide com o inverno. Facanali (2008) constatou maior proporção desta substância em *O. selloi* na colheita de inverno.

Como se pode notar, não existe uma tendência uniforme na variação dos metabólitos conforme as colheitas, visto que as substâncias majoritárias selecionadas são sesquiterpênicas originadas pela mesma rota metabólica, não havendo priorização para formação de um ou outro metabólito. No entanto, é possível afirmar que existe influência das colheitas devido à variação ocorrida nestes compostos, certamente influenciada pelos fatores ambientais e genéticos envolvidos nestas alterações, ou mesmo a interação de ambos os fatores.

7.2.3. Rendimentos do extrato bruto foliar e do composto 4-nerolidilcatecol.

Os resultados apresentados na Análise de Variância (Tabela 31) mostram que as variáveis fitoquímicas estudadas: rendimentos do extrato foliar e do 4-nerolidilcatecol responderam aos efeitos dos tratamentos, ora por um, ora por outro, ou mesmo pela interação desses.

Tabela 31. Valores de F das variáveis fitoquímicas: rendimento de extrato bruto (EB) e de 4-nerolidilcatecol (4NC) em folhas de *P. umbellata*, em função dos espaçamentos entre plantas e idades de colheita.

Causas De variação	GL	EB	4NC
Espaçamentos (E)	2	7,099*	1,063 ^{ns}
Blocos	3	4,159*	0,117 ^{ns}
Resíduo (e)	6	---	---
Colheitas (C)	1	11,963*	49,126*
Interação E x C	2	14,503*	0,404 ^{ns}
Resíduo (c)	9	---	---
C.V. e (%)	---	4,47	20,74
C.V. c (%)	---	4,25	18,80
Média geral	---	11,60	8,48

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

O rendimento do extrato bruto foliar foi significativamente influenciado por ambos os fatores, espaçamento de plantas e idade de colheita, bem como a interação dos fatores, conforme mostra os valores de F da Análise de Variância. No entanto, o rendimento de 4-nerolidilcatecol respondeu somente à idade de colheita, não sendo influenciado pelos espaçamentos entre plantas e a conseqüente interação das variáveis estudadas.

O rendimento do extrato bruto foi maior nas plantas colhidas com 12 meses, porém no espaçamento 0,5 x 0,5 m as plantas com 6 meses obtiveram valores significativamente maiores (12,48%) em relação às colhidas com 12 meses (11,65%), contudo, 0,75 e 1,0 m entre plantas proporcionaram rendimentos superiores nas plantas com 12 meses (Tabela 32).

Tabela 32. Rendimento do extrato bruto (%) nas folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	12,48Aa	10,86Bb	10,44Bb	11,26B
12 meses	11,65Ba	12,47Aa	11,75Aa	11,96A
Média	12,07 ^a	11,67a	11,10b	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

O maior espaçamento entre plantas (0,5 x 1,0 m) proporcionou os menores valores para o rendimento do extrato bruto, porém somente as plantas colhidas com 6 meses responderam aos efeitos do espaçamento, cujo rendimento do extrato foi superior nas plantas espaçadas por 0,5 x 0,5 m em relação às demais plantas.

A interação dos fatores espaçamento x idade de colheitas mostra um comportamento distinto do rendimento do extrato em cada colheita, conforme apresenta a Figura 16. Nas plantas colhidas com 6 meses, o rendimento teve uma resposta linear decrescente à medida que houve aumento do espaçamento entre plantas, já as plantas colhidas com 12 meses, ocorreu uma resposta quadrática, onde o máximo rendimento ocorreu no espaçamento intermediário (0,5 x 0,75 m).

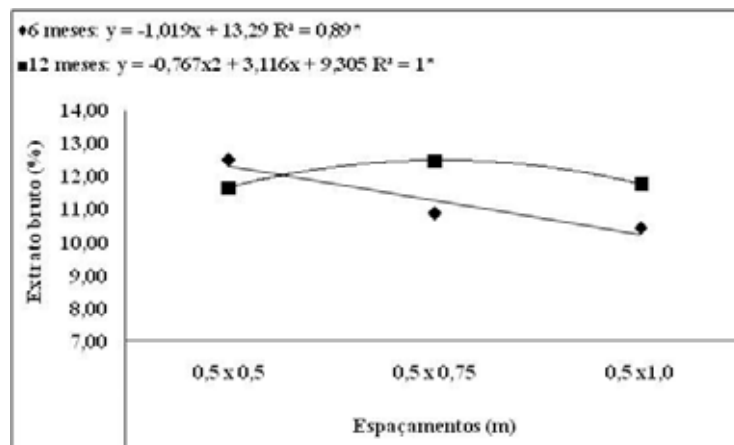


Figura 16. Rendimento do extrato bruto (%) nas folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

O rendimento de 4-nerolidilcatecol (4-NC) acompanhou o do extrato em função das colheitas (Tabela 33), cujo efeito foi significativo, cerca de 40% a mais nas plantas colhidas com 12 meses (10,77%) em relação às colhidas com 6 meses (6,20%) em todos os espaçamentos entre plantas avaliados, no entanto o 4-NC não respondeu a esse fator em ambas as colheitas, observa-se pela Figura 17, que as plantas espaçadas por 0,5 x 0,75 m apresentaram os menores valores, tendo um efeito quadrático, porém não significativo.

Tabela 33. Rendimento de 4-Nerolidilcatecol (%) nas folhas de *P.umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Colheitas	Espaçamentos (m)			Média
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	
6 meses	6,16Ba	5,53Ba	6,92Ba	6,20B
12 meses	11,50Aa	9,96Aa	10,84Aa	10,77A
Média	8,83a	7,75a	8,88 ^a	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p < 0,05$).

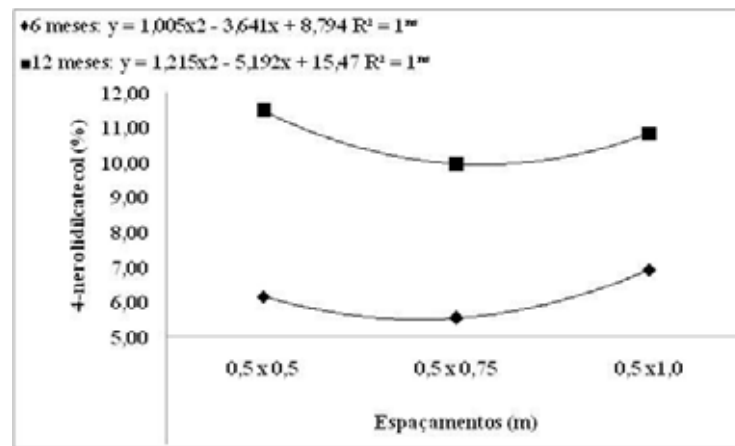


Figura 17: Rendimento de 4-nerolidilcatecol (%) no extrato bruto das folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Relacionando os dados apresentados dos rendimentos do extrato e do 4-NC das folhas, nota-se que a variação mais evidente ocorre em função das colheitas nas duas variáveis estudadas, cujas plantas com 12 meses obtiveram os maiores valores, já com relação aos espaçamentos, nota-se uma relação inversa entre as variáveis, principalmente na segunda colheita, onde houve o maior rendimento do extrato e o menor de 4-NC.

Portanto, pode-se dizer que a variação nessas variáveis frente aos tratamentos estudados, parece estar fortemente relacionada à idade de colheita, que por sua vez está ligada a época do ano em que as plantas foram colhidas (6 meses no inverno e 12 meses no verão), sendo esta estação a mais adequada para obtenção de extrato foliar e 4-nerolidilcatecol nas folhas.

Analisando as características ambientais ocorridas durante a colheita do verão, temperaturas mais elevadas e alta precipitação (Figuras 26 e 27) e relacionando com a característica da molécula, antioxidante, é presumível uma relação direta entre esses fatores, supondo que a maior produção de 4-NC está diretamente ligada aos fatores ambientais, neste caso às altas temperaturas. É provável também, que o fator genético, como a idade das plantas seja influenciador da produção dessa substância, mas para tal confirmação seriam necessários intervalos de colheita menores e mais frequentes para saber quais desses fatores estão ligados a produção desse metabólito secundário em *P. umbellata*.

Trabalhos relacionados com o presente tema na espécie *P. umbellata*, não foram encontrados, todavia os relatados evidenciam que a variação de metabólitos secundários parece estar mais ligada aos fatores genéticos que os ambientais.

Na espécie *Pfaffia glomerata*, já é constatado que a produção de β -ecdisona está relacionada à idade de colheita das plantas, onde a maior produção ocorre após um ano de transplântio, já a época das colheitas e o espaçamento de plantas não apresentaram influência nesse metabólito secundário (Montanari et al., 1999, Correa Junior, 2003; Guerreiro, 2006, Correa Junior et al., 2008).

Já a produção de taninos em *Baccharis myriocephala* varia conforme o acesso e as época de colheita, Castro et al. (1999) coletaram plantas em dois locais diferentes no município de Viçosa/MG, denominando acessos A e C. Cultivaram e colheram esses acessos em diferentes épocas e foi constatado que no acesso C, a maior produção de taninos ocorreu no período da floração e, no acesso A, no final da floração. Os autores atribuem essas variações aos fatores genéticos envolvidos nessa espécie, tais como alogamia e ciclo fenológico.

Silva et al. (2006) estudando o teor de flavonóides em plantas de *Baccharis trimera*, na região de Lavras/MG nas estações seca e úmida, constataram que as duas flavonas 5,3'-diidróxi-4',6,7-trimetóxi-flavona e 5-hidróxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona obtiveram maiores teores em plantas coletadas na estação úmida. Os autores relacionam esses resultados com a maior temperatura e precipitação na época da colheita e sugerem um efeito indireto dos fatores ambientais no metabolismo desta flavona por influenciar diretamente no crescimento do vegetal, pois observaram um intenso crescimento vegetativo na estação úmida. Já o teor de fenóis totais foi menor na época mais úmida, com maiores temperaturas e no período de intenso crescimento vegetativo (Silva et al., 2007)

Nesta mesma espécie, *B. trimera*, o teor de flavonóides expressos em rutina apresentou um incremento no teor em plantas colhidas no verão em relação a plantas colhidas no inverno e na primavera (Borella et al., 2001).

No presente estudo isso não ocorreu, pois a produção de biomassa foi maior na estação seca e as produções de extrato e 4-NC foram maiores na estação úmida, ou seja, nas plantas colhidas com 12 meses.

Tanto os flavonóides como os fenilpropanóides pertencem a classe dos compostos fenólicos (Carvalho et al., 2007), no entanto o acúmulo de metabólitos pertencentes a uma mesma classe é diferenciado, conforme o exposto, havendo a necessidade de estudos específicos para os diferentes compostos dentro da mesma classe.

Ao analisar a produção de extrato e 4-NC em função da densidade de plantas (Tabela 34), observa-se que, devido à biomassa seca foliar ter sido superior na primeira colheita e a produção do extrato e 4-NC das folhas serem em função dessa variável, houve uma maior produção do extrato e do composto na densidade de 40.000 plantas ha⁻¹, cerca de 30 quilos a mais de extrato e dois quilos a mais de 4-NC, em relação às plantas menos adensadas. Já a produção de 4-NC foi semelhante em ambas as colheitas, enquanto que o extrato foi maior na colheita de 6 meses.

Tabela 34. Produção de biomassa seca, extrato e 4-Nerolidilcatecol (Kg ha^{-1}) nas folhas de *P.umbellata* em função da densidade de plantas e idade de colheita.

Biomassa seca (kg ha^{-1})				
Colheitas	Densidade Plantas ha^{-1}			Média
	40.000	26.666	20.000	
6 meses	902,0	665,5	532,4	700,0
12 meses	428,8	394,6	390,0	404,5
Média	665,4	530,1	461,2	
Extrato (kg ha^{-1})				
Colheitas	Densidade Plantas ha^{-1}			Média
	40.000	26.666	20.000	
6 meses	112,55	72,28	55,58	80,12
12 meses	49,97	49,20	45,83	48,33
Média	81,26	60,74	50,70	
4NC (kg ha^{-1})				
Colheitas	Densidade Plantas ha^{-1}			Média
	40.000	26.666	20.000	
6 meses	6,93	4,00	3,85	4,92
12 meses	5,72	4,90	4,96	5,19
Média	6,32	4,45	4,40	

Esses resultados demonstraram que a produção de extrato está ligada à produção de biomassa seca foliar, enquanto que o composto 4-nerolidilcatecol está diretamente ligado à idade e/ou épocas de colheita, pois a concentração do composto nas folhas foi maior nas plantas colhidas com 12 meses, ou seja, para cada quilo de 4-NC produzido na colheita de 6 meses foram precisos 16 quilos de extrato, já na colheita de 12 meses, cerca de 9 quilos, praticamente a metade da quantidade de extrato.

Portanto, vale ressaltar a importância dos estudos agrônômicos atrelados aos fitoquímicos, visando à maior rentabilidade e otimização da produção de metabólitos secundários na qualidade de plantas medicinais, todavia, sabe-se que ainda a comercialização de plantas medicinais, bem como de extratos vegetais é realizada pela quantidade de material vegetal e não pela quantidade de princípio ativo presente.

7.3. Experimento 3: Horário de colheita x temperatura de secagem.

Os valores apresentados na Análise de Variância (Tabela 35) mostram que as variáveis fitoquímicas estudadas, rendimento de extrato foliar, rendimento de 4-nerolidilcatecol no extrato, rendimento de óleo essencial e as principais substâncias químicas identificadas nas folhas de *P. umbellata*, foram influenciadas pelos horários de colheita e pelas temperaturas de secagem, bem como, a interação dos mesmos, com nível de significância de 5%. Com exceção para as substâncias químicas do óleo essencial, germacreno-D e α -selineno, que não tiveram efeito significativo para o tratamento horário de colheita.

Tabela 35. Valores de F das variáveis: rendimento de extrato foliar (EXT), 4-nerolidilcatecol (4NC), rendimento de óleo essencial (ÓLEO), *E*-cariofileno (ECA), germacreno-D (GED), α -selineno (ASE) e *E*-nerolidol (ENE), em folhas de *P. umbellata*, em função de horários de colheita e temperaturas de secagem.

Causas de variação	G.L.	EXT	4NC	ÓLEO	ECA	GED	ASE	ENE
Horário de colheita (H)	5	7,84*	11,68*	5,95*	12,38*	2,18 ^{ns}	1,89 ^{ns}	6,52*
Temperatura de secagem (T)	3	415,89*	1356,75*	100,41*	230,55*	247,13*	367,27*	167,10*
Interação H x T	15	2,12*	9,86*	2,96*	3,90*	4,40*	5,01*	3,37*
Repetição (r)	4	1,21 ^{ns}	0,38 ^{ns}	1,35 ^{ns}	1,47 ^{ns}	1,31 ^{ns}	0,33 ^{ns}	2,17 ^{ns}
C.V. c (%)	---	11,59	10,29	26,51	12,84	16,86	12,81	13,29
Média geral	---	13,15	9,61	0,12	16,50	14,36	6,04	23,14

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

7.3.1. Rendimentos do extrato bruto foliar e do 4-nerolidilcatecol.

O rendimento do extrato bruto das folhas frescas foi maior durante todo o período do dia, diferenciando-se significativamente das folhas que passaram pelo processo de secagem (Tabela 36). Pode-se dizer que a partir desse resultado, o processo de secagem, independente do horário de colheita, demonstrou-se desfavorável para obtenção do extrato foliar, visto que o rendimento do extrato das folhas frescas foi, praticamente, o dobro (21,62%) do restante dos tratamentos de secagem.

Com relação aos horários de colheita, pela média do respectivo tratamento (Tabela 36), pode-se verificar que o rendimento do extrato das folhas colhidas no período da tarde foi maior em relação ao período da manhã, atingindo maior rendimento às 15 horas e diminuindo gradativamente a partir desse horário até as 21 horas.

Tabela 36. Rendimento de extrato bruto (%) de folhas de *P. umbellata* em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem. UNESP-Botucatu/2009.

Temperaturas de secagem (°C)	Horários de colheitas (horas)						Média
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00	21:00	
Folhas frescas	19,68Ab	20,58Ab	23,18Aa	23,39Aa	21,28Ab	21,61Ab	21,62A
40°C	9,51Cb	8,67Bb	10,29Bb	13,19Ba	8,69Cb	10,17Bb	10,09C
60°C	8,94Ca	8,86Ba	10,33Ba	10,20Ca	10,25Ca	9,62Ba	9,70C
80°C	11,60Ba	9,74Bb	10,11Bb	12,18Ba	12,57Ba	11,04Bb	11,21B
Média	12,44c	11,97c	13,48b	14,74a	13,20b	13,11b	-----

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p>0,05$).

Contudo, esta evidência não pode ser generalizada para todos os tratamentos de secagem, no caso das folhas frescas e secas a 40°C, os dados corroboram com a média dos tratamentos, cujos rendimentos do extrato foram maiores nos horários de 12 e 15 horas, respectivamente. O rendimento do extrato das folhas secas a 80°C apresentou o mesmo perfil em parte, ou seja, obteve maior valor às 6 horas da manhã, além de 15 e 18 horas, já o rendimento do extrato das folhas secas a 60°C não foi afetado pelos horários de colheita.

O rendimento da substância 4-nerolidilcatecol (4-NC) nos extratos brutos das folhas apresentou a mesma resposta do rendimento do extrato, frente às temperaturas de secagem, onde as folhas frescas proporcionaram maior rendimento de 4-NC que as folhas submetidas aos demais tratamentos de secagem, em todos os horários em que foram colhidas, alcançando rendimento superior (Tabela 37), cerca de duas vezes a mais (19,16%) que o tratamento de secagem a 60°C (8,58%), que foi significativamente maior que os demais tratamentos a 40°C (6,82%) e a 80°C (3,89%), respectivamente. Este resultado confirma os resultados de rendimento do extrato, evidenciando que a secagem não é um procedimento adequado para a obtenção da substância no extrato.

Ao analisar os horários de colheita, o rendimento de 4-NC respondeu diferentemente dos resultados de rendimento do extrato, atingindo maior rendimento, no final do período da tarde, às 18 horas. Durante o período da manhã, das seis horas ao meio dia, o rendimento de 4-NC apresentou um pequeno acréscimo, porém não significativo, decrescendo após esse período até as 15 horas (Tabela 37).

Tabela 37. Rendimento de 4-Nerolidilcatecol (%) em folhas de *P. umbellata* em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem.

Temperaturas de secagem (°C)	Horários de colheitas (horas)						Média
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00	21:00	
folhas frescas	18,02Ab	19,90Aa	19,37Aa	18,14Ab	20,18Aa	19,37Aa	19,16A
40°C	8,26Ba	7,17Bb	6,22Cc	5,20Cc	8,68 Ca	5,38Cc	6,82C
60°C	8,52Bb	6,10Bc	9,98Ba	8,46Bb	10,60Ba	7,82Bb	8,58B
80°C	1,90Cc	4,35Cb	3,10Dc	2,87Dc	4,74Db	6,40Ca	3,89D
Média	9,28b	9,38b	9,67b	8,67c	10,95a	9,75b	-----

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p>0,05$).

No entanto, examinando os fatores isoladamente, nota-se que cada tratamento de temperatura apresentou um efeito diferente, conforme os horários em que as folhas foram colhidas; para folhas secas, o rendimento de 4-NC foi inferior somente às 15 horas, para as secas a 40°C, os maiores valores ocorreram no início da manhã (6 horas) e no final da tarde (18 horas); no caso das folhas secas a 60°C, o rendimento foi maior ao meio dia e às 18 horas e para as secas a 80°C, no período da noite. Contudo, na maioria dos tratamentos, os maiores rendimentos de 4-NC ocorreram nas folhas colhidas às 18 horas, com exceção das secas a 80°C.

Em toda a literatura consultada foi encontrada apenas uma referência sobre o tópico abordado com a espécie em questão, que corrobora com os dados do presente trabalho, cuja produção de 4-NC sofreu um incremento da concentração ao longo do dia, com valores máximos no período da tarde para folhas jovens de 1184,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e adultas de 1819,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$, já a concentração de 4-NC nas amostras secas foi em média 536 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Castellani et al., 2008). Segundo os autores é possível que tenha ocorrido degradação do marcador, devido o processo de secagem e recomendam que o processo de extração do 4-NC seja feito em plantas frescas e a colheita de folhas no período da tarde.

A Tabela 38 mostra a produção de 4-NC em miligramas/grama de extrato bruto foliar, conforme os horários de colheita e temperatura de secagem, e, apesar das unidades de medida serem diferentes [no trabalho de Castellani et al. (2008), os dados de produção estão em concentração de solução ($\mu\text{g mL}^{-1}$)], observa-se a mesma relação de valores de produção entre as folhas frescas e secas.

Tabela 38. Produção de 4-Nerolidilcatecol (mg/gr de extrato) em folhas de *P.umbellata* em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem.

Temperaturas de secagem (°C)	Horários de colheitas (horas)						Média
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00	21:00	
Folhas frescas	182,46	197,06	195,56	182,63	203,45	194,89	192,67
40°C	87,53	73,49	60,03	53,86	80,47	55,64	68,51
60°C	87,06	93,14	101,79	82,87	107,59	77,59	91,67
80°C	18,18	45,36	29,83	28,12	46,18	65,07	38,79
Média	93,81	102,26	96,80	86,87	109,42	98,30	

Existem alguns trabalhos já realizados sobre a resposta da molécula de 4-NC frente às temperaturas elevadas e à fotoestabilidade, visto que é uma substância promissora para produção de cosméticos e medicamentos de prevenção do fotoenvelhecimento da pele, até mesmo como medicamento no tratamento de câncer de pele, devido ao seu alto potencial antioxidante (Barros et al, 1997). Da Silva et al. (2005), constataram que a formulação cosmética contendo a molécula é totalmente degradada a 45°C, sendo a temperatura um dos principais fatores que influenciam a estabilidade química da molécula, e quanto à fotoestabilidade, o produto cosmético apresentou-se estável quando submetido a radiação UVB (Da Silva et al., 2005; Almeida et al., 2008).

Diante das constatações expostas sobre o efeito da temperatura na molécula de 4-NC, pode-se afirmar que o processo de secagem das folhas favorece sua degradação, não sendo recomendado para extrair esta substância.

Outro fator que se deve levar em consideração é o processo de extração e as relações de polaridade existentes entre o solvente utilizado e a molécula que se pretende extrair. Segundo Filho (1997), o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Provavelmente, a

utilização de metanol, que é um solvente polar, favoreceu o aumento do rendimento do extrato bruto das folhas frescas, e este fato se deve a dois principais fatores, a presença de água, cuja molécula também é polar, além de as principais substâncias presentes nas folhas também serem polares, entre elas, o 4-nerolidilcatecol, conforme se observa na Figura 18.

Segundo, Melo et al. (2008) as moléculas polares são mais hidrossolúveis, portanto a presença da água é fundamental para a eficiência do processo extrativo; os autores estudaram a atividade antioxidante de diversas frutas e observaram que o uso da água no processo possibilitou a extração de maior teor de polifenóis, que o extrato acetônico. Portanto, é possível afirmar a água presente nas folhas frescas favoreceu o maior rendimento do extrato bruto pela extração de maior quantidade de substâncias e também, favoreceu o maior rendimento de 4-NC.

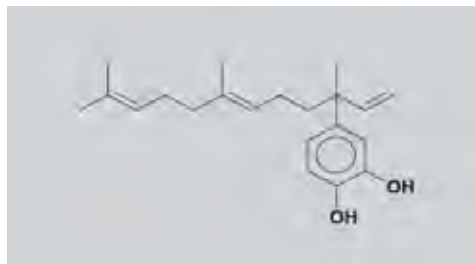


FIGURA 18: Estrutura química da molécula de 4-nerolidilcatecol.

A Figura 19 mostra a relação do rendimento do extrato bruto foliar com o do 4-NC, nela pode-se notar que existe uma relação diretamente proporcional, ou seja, o rendimento de 4-NC acompanhou o rendimento do extrato, com relação às temperaturas de secagem (23a e 23b), ambos os valores foram maiores nas folhas frescas, devido, provavelmente, à relação de polaridade explicada anteriormente; contudo, quando se analisa a relação dos fatores em cada temperatura isolada (Figuras 19c a 19f), observa-se uma resposta inversamente proporcional, principalmente nos horários de 12 e 15 horas, mais notavelmente para as folhas frescas e secas a 40°C, cujo rendimento do extrato foi maior e do 4-NC foi menor.

Se o calor é um dos fatores responsáveis pela degradação da substância, conforme os relatos citados, uma hipótese plausível seria a degradação da molécula neste intervalo de tempo (12 às 15 horas), devido à alta temperatura ocorrida nesses horários e mais

elevada na época do ano em que as plantas foram colhidas, no mês de outubro de 2007, podendo ser observada na Figura 26.

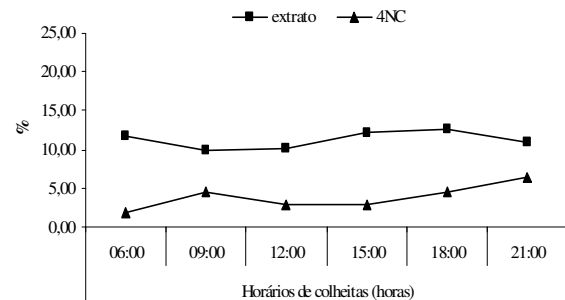
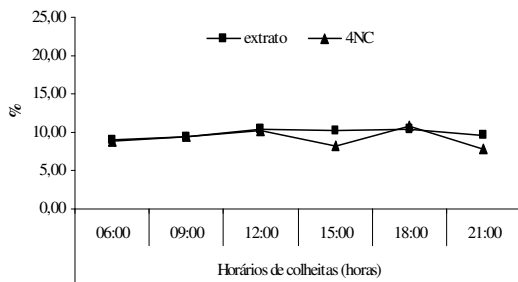
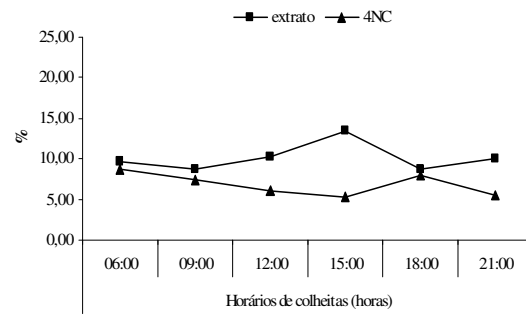
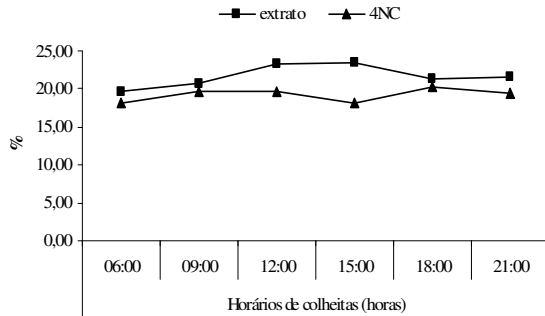
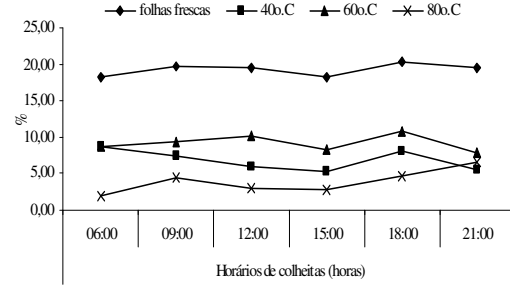
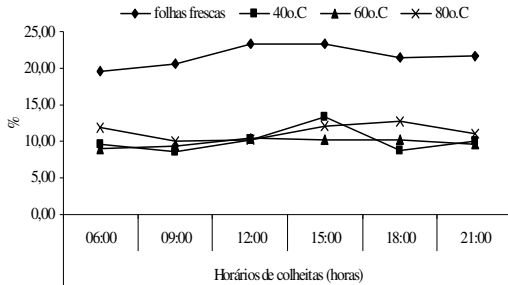


Figura 19. Relação dos rendimentos do extrato bruto (%) e do composto 4- nerolidilcatecol (%) em folhas de *P.umbellata* em função dos horários de colheitas e temperaturas de secagem.

7.3.2. Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* (L.)

A temperatura também foi um fator importante para o rendimento de óleo essencial das folhas de *P. umbellata*; de maneira geral, as folhas frescas e secas a 40°C (0,17% e 0,16%) proporcionaram valores significativamente maiores que o rendimento das folhas secas a 60°C e a 80°C respectivamente (0,09% e 0,05%), porém não se diferenciaram entre si (Tabela 39).

Tabela 39. Rendimento de óleo essencial (%) em folhas de *P. umbellata* em função de horários de colheitas e temperaturas de secagem.

Temperaturas de secagem (°C)	Horários de colheitas (horas)						Média
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00	21:00	
folhas frescas	0,15Ab	0,20Aa	0,17Ab	0,17Ab	0,14Ab	0,21Aa	0,17A
40°C	0,16Ab	0,23Aa	0,16Ab	0,13Bb	0,13Ab	0,18Ab	0,16A
60°C	0,10Ba	0,10Ba	0,08Ba	0,12Ba	0,07Ba	0,09Ba	0,09B
80°C	0,09Ba	0,03Cb	0,04Bb	0,03Cb	0,04Bb	0,08Ba	0,05C
Média	0,12a	0,14a	0,11b	0,11b	0,10b	0,14a	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p > 0,05$).

No caso de óleos essenciais, este resultado está relacionado à volatilidade das substâncias que os compõem, em sua maioria são compostos monoterpênicos e sesquiterpênicos, cujo peso molecular é baixo. Muitos autores recomendam a secagem de plantas medicinais para extração de óleo essencial a uma temperatura máxima de 40°C (Corrêa Júnior et al., (1994); Furlan, (1998); Silva, (1998); Martins, (2000); Arruda et al., (2002); Chagas et al., (2003); Figueira et al., (2003) *apud* Marchese & Figueira, (2005)).

Segundo Córrea Junior (1991) o processo de secagem é um dos métodos mais utilizados para a preservação da qualidade de plantas medicinais, pois estabiliza o metabolismo, imobiliza a ação enzimática degradadora dos princípios ativos existentes, originando condições desfavoráveis à continuidade das atividades metabólicas e ao desenvolvimento de microrganismos (Martinazzo et al., 2007). Hertwig (1991) recomenda cuidados no processo de secagem, pois os óleos essenciais são altamente voláteis; Blanco et al. (2000), alegam que cada espécie medicinal responde de forma diferenciada e aconselham estudos específicos, visando assegurar rendimentos e composição adequados do óleo essencial.

Como na maioria dos horários de colheita em que as folhas foram colhidas, com exceção das 15 horas, o rendimento do óleo essencial das folhas frescas e secas a 40°C foi semelhante, diferenciando-se apenas do rendimento das folhas secas a 60°C e 80°C, é recomendável secá-las, de preferência até 40°C, conforme relatos das referências citadas.

Os horários de colheita também influenciaram o rendimento do óleo essencial e este efeito parece estar relacionado com a temperatura, pois o período da manhã, as 6 e 9 horas e o período da noite às 21 horas, foram os horários em que o rendimento foi maior, distinguindo do período da tarde, ou seja, horários mais quentes do dia, das 12 às 18 horas, cujos valores foram significativamente inferiores (Tabela 39). Mas, segundo Evans (1996) a formação de óleos voláteis, em geral, parece aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar de dias muito quentes levarem a uma perda excessiva do rendimento.

No entanto, os resultados apresentados no presente trabalho são opostos a essa afirmativa, não podendo generalizar essa conceito; algumas espécies medicinais apresentaram resultados semelhantes ao presente trabalho. Silva et al. (2003) averiguaram que em *Ocimum basilicum*, o maior rendimento de óleo essencial ocorreu no período da manhã. Palá-Paúl et al. (2001) constataram uma correlação negativa entre o rendimento do óleo essencial com o aumento da temperatura nas partes aéreas de *Santolina rosmarinifolia*. Blank et al. (2005) estudaram os efeitos do horário de colheita e temperaturas de secagem em *Melissa officinalis* e verificaram que o maior rendimento do óleo essencial foi nas folhas frescas colhidas às 17 horas.

Segundo Reis & Mariot, (2000) os óleos essenciais geralmente atingem o rendimento máximo nos horários da manhã. Marchese & Figueira (2005) explicam que a maior produção dos óleos essenciais é matutina, pelo fato de existir mais radiação fotossinteticamente ativa (PAR) disponível pela manhã e uma maior taxa fotossintética, e ainda, afirmam que a maior produção de terpenos, principalmente os monoterpenos, é dependente da fotossíntese e ocorre nos cloroplastos, através da via do metil-eritritol-fosfato. No final da manhã e durante a tarde, devido à elevação da temperatura do ar, há um aumento na respiração celular e uma diminuição da condutância estomática, provocando uma redução da fotossíntese, contribuindo para a queda da síntese de terpenos e do rendimento de óleo essencial nas plantas.

A composição química do óleo essencial não foi influenciada pelos tratamentos de secagem e horário de colheita, sendo identificadas as mesmas substâncias em todos os tratamentos, alterando apenas sua proporção relativa média. Foram identificadas 36

substâncias químicas no óleo essencial em ambos os tratamentos, totalizando em média 95% da identificação, a proporção relativa média de todas as substâncias identificadas está exposta nas Tabelas 45 e 46. A principal classe de compostos encontrada foi a dos terpenóides, em maior quantidade os sesquiterpenos, e dentre os monoterpenos estão α -pineno, β -pineno e o limoneno, além de compostos aldeídos identificados como decanal e octadecanal.

As substâncias identificadas em maior proporção no óleo essencial foram o *E*-cariofileno (16%), germacreno-D (14%), α -selineno (6,04%) e *E*-nerolidol (23,10%), compreendendo 60% do total identificado, sendo estas as selecionadas para discussão dos efeitos dos fatores horários e temperatura, conforme expõem as Tabelas 40 e 41.

Os horários de colheita tiveram efeito significativo apenas para as substâncias *E*-cariofileno e *E*-nerolidol, cujas proporções relativas foram maiores nos períodos da manhã (6 horas) e da tarde (15 e 18 horas) respectivamente (Tabela 40). Já, com relação às temperaturas de secagem, todas as substâncias foram influenciadas, ocorrendo uma inversão na proporção relativa com o aumento da temperatura, principalmente para o *E*-cariofileno e *E*-nerolidol (Tabela 41).

Tabela 40. Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* (L.) em função de horários de colheitas.

Substâncias (%)	Horários de colheitas (horas)						Média
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00	21:00	
<i>E</i> -cariofileno	19,06a	16,26b	16,78b	13,85c	16,86b	16,22b	16,56
germacreno-D	15,04a	15,06a	14,71a	14,22a	12,92a	14,21 ^a	14,39
α -selineno	6,28a	5,86a	6,02a	5,74a	5,95a	6,34 ^a	6,04
<i>E</i> -nerolidol	21,06b	22,42b	23,12b	24,60a	25,77a	21,89b	23,10
TOTAL	61,3	59,77	60,64	58,49	61,43	58,9	60,09

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p>0,05$).

Tabela 41. Composição química (% relativa média) do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* (L.) em função de temperaturas de secagem.

Substâncias (%)	Temperaturas de secagem (°C)				
	Folhas frescas	40°C	60°C	80°C	Média
<i>E</i> -cariofileno	25,00a	15,69b	13,51c	11,83d	16,56
germacreno-D	18,84a	19,19a	15,08b	4,31b	14,39
α -selineno	7,62b	8,21a	6,12c	2,20d	6,04
<i>E</i> -nerolidol	16,44d	18,59c	24,95b	32,59 ^a	23,10
TOTAL	67,88	61,72	59,8	50,77	60,04

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Scott-Nott ($p > 0,05$).

O *E*-cariofileno diminuiu pela metade com o aumento da temperatura, passou de 25% nas folhas frescas para 11,83% nas folhas secas a 80°C, e o inverso ocorreu para o *E*-nerolidol, que aumentou sua concentração com o aumento da temperatura de secagem (16,44% para 32,59%). As substâncias α -selineno e germacreno-D tiveram respostas similares, cujas proporções relativas foram significativamente maiores nas plantas secas a 40°C, a partir dessa temperatura houve um decréscimo dos valores de ambas as substâncias.

Estes resultados podem estar ligados a volatilização dos compostos de menor massa molecular e conseqüentemente mais leves, neste caso o *E*-cariofileno e este efeito provavelmente acarretou na maior concentração da proporção relativa de outros compostos menos voláteis.

A Figura 20 mostra a resposta de cada substância nas diferentes temperaturas de secagem em função dos horários de colheita, observa-se o comportamento inverso nas proporções relativas das substâncias *E*-cariofileno e *E*-nerolidol tanto para as temperaturas de secagem como para os horários de colheita. A maior proporção de *E*-cariofileno, ocorreu pela manhã em folhas frescas e, para o constituinte *E*-nerolidol, as folhas colhidas as 15 e 18 horas e secas a 80°C obtiveram maior proporção. Já as substâncias germacreno-D e α -selineno responderam de forma bem similar, durante todo o período do dia, no entanto, este fator não apresentou uma relação concisa com estas variáveis.

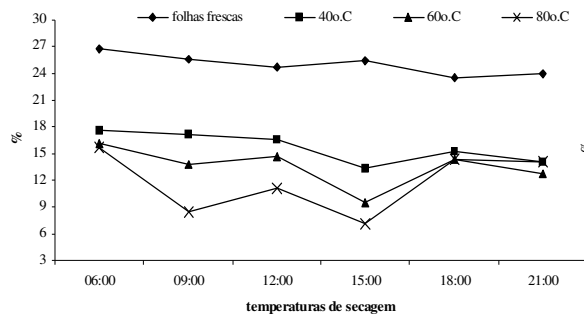


Figura 20a: Proporção relativa (%) de E-cariofileno em folhas de *P. umbellata* em diferentes horários de colheita em função da temperatura

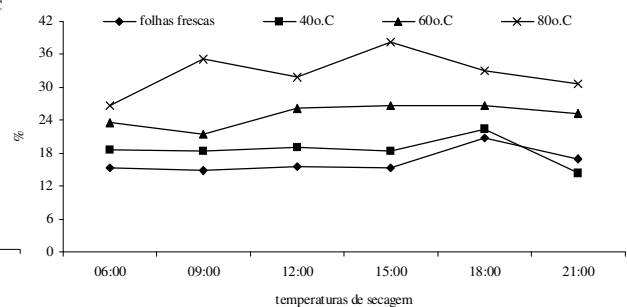


Figura 20b: Proporção relativa (%) de E-nerolidol em folhas de *P. umbellata* em diferentes horários de colheita em função da temperatura

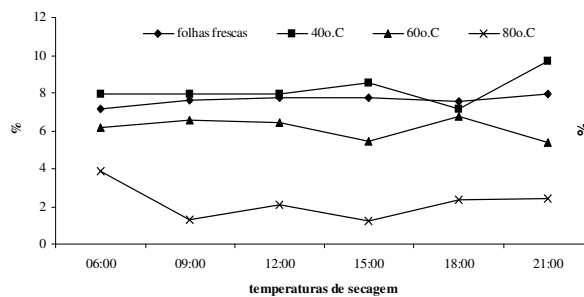


Figura 20c: Proporção relativa (%) de α -selineno em folhas de *P. umbellata* em diferentes horários de colheita em função da temperatura

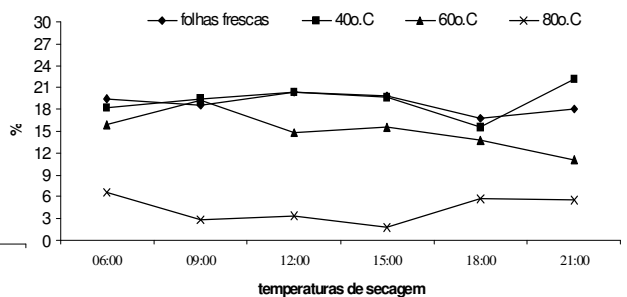


Figura 20d: Proporção relativa (%) de germacreno-D em folhas de *P. umbellata* em diferentes horários de colheita em função da temperatura de

Figura 20. Proporções relativas (%) das substâncias *E*-cariofileno (a), *E*-nerolidol (b), α -selineno (c) e germacreno-D (d) em folhas de *P. umbellata* em função dos horários de colheitas e diferentes temperaturas de secagem.

Perante as observações constatadas, nota-se influência do ritmo circadiano, no entanto o processo de secagem parece ser mais influente na variação dos constituintes químicos presentes no óleo essencial da espécie estudada. Contudo, pode haver uma falsa ilusão do acréscimo ou decréscimo de certas substâncias no processo de secagem, devido os valores serem expressos em proporção relativa média, ou seja, com o aumento da temperatura de secagem, as substâncias mais voláteis, de menor peso molecular, tendem a evaporar e, com isso, a proporção relativa média das substâncias presentes no óleo essencial torna-se maior pelo fato da quantidade de componentes presentes serem menores.

Para poder afirmar com maior garantia que o processo de secagem, aumenta ou diminui a quantidade real da substância na planta, seria necessário a comparação do

peso da massa molecular presente na folha com um padrão referencial. Contudo, esse processo tornaria muito dispendioso e demorado, não sendo viável para o objetivo deste trabalho.

Silva et al. (1999) constataram uma variação de mais de 80% na concentração de eugenol no óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), o qual atingiu um máximo em torno do meio-dia, horário em que foi responsável por 98% do óleo essencial, em contraste com uma concentração de 11% em torno de 17 horas.

Angelopoulou et al. (2002) também observaram variação na composição química do óleo essencial de *Viola surinamensis*. Conforme o horário do dia, o nível relativo de monoterpenos às 6 e às 21 horas foi o dobro do nível ao meio-dia, já o conteúdo de elemicina foi maior ao meio dia.

O horário de colheita e a secagem das folhas de *Melissa officinalis* também influenciaram na composição química do óleo essencial. Os constituintes majoritários β -citral e α -citral alcançaram valores acima de 86% nas folhas secas à 40°C e colhidas às 9 horas da manhã e às 15 horas (Blank et al. 2005).

Os níveis de conina em *Conium maculatum* são maiores quando as coletas são efetuadas pela manhã (Elsohly, 1997), já o conteúdo total de taxanos em *Taxus media* é menor pela manhã, aumentando durante o dia e atingindo um máximo no final da noite (Fairbairn, 1961, *apud* Globbo-Neto & Lopes, 2007). Em *Porophyllum ruderale*, o maior rendimento de tanino ocorreu às 18 horas (Fonseca et al. 2007).

Observa-se que o ritmo circadiano e o processo de secagem são fatores que influenciam intensamente a concentração, não só dos constituintes de óleos essenciais, mas de diversos outros metabólitos secundários de plantas medicinais, conforme os trabalhos relatados e os resultados do presente trabalho, sendo possível afirmar que estes fatores são de grande relevância no metabolismo secundário de plantas medicinais, pois, cada espécie tem uma resposta diferente, portanto, devem ser levados em consideração nas pesquisas e cultivos comerciais, visando à qualidade e padronização de produtos naturais.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudar o cultivo de plantas medicinais brasileiras e todos os aspectos que o envolvem é um desafio, pela carência de estudos nacionais focados na área fitotécnica atrelada à fitoquímica, além de outras áreas que compreendem a pesquisa com plantas medicinais; mas também uma necessidade incontestável, devido aos avanços dos desmatamentos e do extrativismo das plantas medicinais nativas, cuja flora brasileira é alvo de interesses industriais que visam princípios ativos naturais de alto valor medicinal e econômico.

Algumas considerações valem ser ressaltadas, fatores que não puderam ser abordados nas análises estatísticas e assim não foram expostos dentro do corpo do texto, pois foram observações de campo que não entraram na discussão dos resultados, mas que foram imprescindíveis para a realização e condução deste estudo e devem ser levadas em consideração para se obter sucesso no cultivo de *P. umbellata*.

O primeiro fator relevante foi a propagação do material vegetal em viveiro de mudas para realização dos experimentos propostos. Com a intenção de conhecer melhor o comportamento da espécie em ambiente cultivado e também de levantar possíveis demandas existentes de produtores de plantas medicinais a respeito de melhor produção dessa cultura, resolveu-se visitar um produtor de pariparoba, que por sinal, foi o único encontrado na época de realização do presente trabalho. As recomendações dadas por ele para propagar material vegetal foram as seguintes: escolher estacas pequenas com apenas uma gema, de preferência que esteja ativa, ou seja, soltando brotos, mais lenhosas que tenras, utilizar substrato rico em matéria

orgânica e mantê-lo constantemente úmido e, principalmente, sob sombreamento até o pegamento das mudas.

Essas informações foram indispensáveis para o sucesso na propagação das mudas, cujas recomendações foram seguidas, porém contestadas na área acadêmica, pelo fato de se utilizar apenas uma gema para propagar as estacas. Em geral, o conhecimento popular não é valorizado no meio acadêmico, no entanto, esses resultados comprovam que a observação diária e experimentação empírica da natureza por pessoas que convivem nela devem ser valorizadas e respeitadas.

Outro fator que foi importante para o estabelecimento e manutenção das plantas no campo durante o período de dois anos foi o consórcio das plantas de pariparoba com as de feijão guandu. Esta espécie trouxe muitos benefícios além do sombreamento das plantas que era o objetivo principal, entre elas, o controle de formigas cortadeiras, cuja área dos experimentos apresenta certa infestação desses insetos que preferiram atacar as plantas de guandu ao invés das de pariparoba; dispensando o controle químico, visto que se trata de uma espécie medicinal e não se recomenda a utilização de agrotóxicos no controle de pragas, doenças e plantas invasoras.

Além de controlar o ataque de formigas, observou-se também controle de plantas invasoras, devido ao sombreamento proporcionado por essa espécie juntamente com as plantas de pariparoba e também pela poda e incorporação da biomassa vegetal produzida pelas plantas de guandu, e com isso aumentou o intervalo de capinas nos experimentos; foi observada também um equilíbrio de insetos praga, como pulgões, pela ocorrência de inimigos naturais, como as “joaninhas”, devido provavelmente ao ambiente proporcionado pelo consórcio das espécies.

Um benefício também bem interessante verificado, porém não computado, é a produção de feijão vagem e lenha oriunda da poda dos ramos laterais das plantas de guandu, como alternativas de renda para o produtor entre as colheitas de pariparoba. Perante essas observações de campo e os resultados apresentados no presente trabalho, pode-se afirmar que a espécie *P. umbellata* é passível de cultivo em consórcio com espécie de maior porte, com produtividade e rentabilidade atraentes para o produtor, principalmente pelos benefícios de redução de gastos e alternativas de renda.

Outras considerações também são válidas a respeito dos resultados alcançados. Nos estudos sobre espaçamentos de plantas é imprescindível relacioná-los com a

densidade de plantas por área, apesar de a maior produção de biomassa foliar ter sido verificada no maior espaçamento de plantas, a produção por área total foi maior nas plantas mais adensadas e esses resultados são de grande valia quando se pensa na maior produtividade por área.

A seleção de material genético também é um fator relevante, visto a variação interpopulacional encontrada na produção de biomassa e óleo essencial na espécie estudada, as plantas procedentes de Jundiá mostraram-se promissoras para produção dessas variáveis. Logo, caso o interesse esteja em algum composto específico, como no caso do E-nerolidol, essa população já não é interessante, mas caso o interesse seja o germacreno-D, sim. Visando a qualidade química do óleo essencial, é importante a avaliação da melhor época de colheita, conforme o interesse das substâncias que o compõem, como constatado existe uma variação considerável das substâncias, conforme a idade das plantas e/ou época de colheitas, bem como acessos populacionais diferentes. Portanto, recomenda-se a seleção de material genético conforme o interesse.

Não só é importante selecionar material genético, idade das plantas e/ou época de colheitas, como também o horário ideal de se colher, no caso da espécie *P.umbellata* irá depender do interesse; para produção de óleo essencial recomenda-se colher no período da manhã, para produção de extrato foliar e 4-nerolidilcatecol no período da tarde, e assim provavelmente deve ocorrer com outras espécies medicinais.

E uma última consideração, é com relação à temperatura de secagem, pois é um fator que afeta diretamente a qualidade química das plantas medicinais. Para *P. umbellata* recomenda-se a secagem das folhas a 40°C visando a produção do óleo essencial, já para produção de extrato bruto foliar e de 4NC recomenda-se não secar o material vegetal.

Os objetivos deste trabalho foram alcançados e espera-se que as informações fornecidas possam servir de subsídios úteis às classes produtora e consumidora de plantas medicinais, em especial de *P. umbellata*, e também, como contribuição científica para conservação e utilização racional da espécie, com a produção em escala comercial como alternativa da atividade agrícola e essencial para o fornecimento de matéria-prima de qualidade.

Contudo, o presente trabalho não exauriu as informações a respeito do cultivo desta espécie, sugere-se que as pesquisas continuem em outras áreas afins ainda não estudadas e também o maior aprofundamento dos resultados até aqui alcançados.

9. CONCLUSÕES

***Espaçamento de plantas:**

Os espaçamentos estudados influenciaram as plantas de *P. umbellata*, sendo que as maiores produções de biomassa foliar, óleo essencial e extrato bruto foliar ocorreram no espaçamento 0,5 x 0,5 metros entre plantas (40.000 plantas ha⁻¹), portanto recomenda-se a utilização do menor espaçamento, visto que acomoda uma maior quantidade de plantas em um menor espaço físico ocupado, sendo economicamente viável.

***Idade de colheita:**

A idade de colheita tem influência sobre as plantas de *P. umbellata*, sendo que a idade ideal dependerá do interesse: para obtenção de biomassa, óleo essencial e extrato bruto foliar recomenda-se colheita das plantas aos 6 meses após o transplântio e para produção de 4-NC aos 12 meses após o transplântio.

*** Populações de plantas:**

Existe diferenças entre os materiais genéticos estudados e a população de Jundiaí mostrou-se mais promissora para a produção de biomassa e óleo essencial.

***Sazonalidade:**

Existe variação sazonal na produção de biomassa foliar, teor e composição química do óleo essencial, sendo que as maiores produções de biomassa foliar ocorreram nas estações do outono e verão e na primavera o menor teor de óleo essencial, não sendo recomendada a colheita das folhas nesta época para extração de óleo essencial.

*** Horário de colheita:**

O horário de colheita influencia as características fitoquímicas do extrato e do óleo essencial, recomendando-se a colheita no período da manhã para extração do óleo essencial e no período da tarde para extração do extrato bruto e do composto 4NC.

***Temperatura de secagem:**

O processo de secagem influencia as características fitoquímicas de *P.umbellata*, recomendando-se a utilização de folhas frescas para a produção do extrato e do composto 4NC e secagem a 40°C para produção de óleo essencial.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; et al. Phytochemical study on *Piper aducum*. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, v.14, n.1, p.2-3, 1984.

ACHENBACH, H. FIETZ, W., WOERTH, J. Constituents of tropical plants. IXX GC/MS – investigation of the constituents of (*Piper amalago*) **Planta Medica**. v.1, p.12, 1986.

ADAMI, Y.H. *In vitro* antimalarial activity in of crude extracts of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata* (Piepraceae). **Tropical Medicine**. v.40, n.2, p. 91-94, 1998.

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, Allured Publ. Corp, Carol Stream, 1995.

AGNOL, L.D. A indústria brasileira de fitoterápicos: desafios e perspectivas. In: VIEIRA et al.. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: Resultados da 1ª Reunião Técnica.Brasília/DF**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos naturais Renováveis (Ibama)/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002, 184p.

ALÉCIO, A.C. et al. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidium*. **Journal of Natural Products**. v.61, p.637, 1998.

ALMEIDA, R.L. et al. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) e avaliação da inibição *in vitro* de metaloproteinases 2 e 9 na pele. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 44, n. 1, p. 44-50, 2008.

ALVES, R.B.N. **Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen**. Botucatu, 112p. Tese (Doutorado em agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. 2008.

ALVES, S.M.C. et al. Balanço do nitrogênio e fósforo em solo com cultivo orgânico de hortaliças após a incorporação de biomassa de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, n.11, p.1111-1117, 2004.

AMORIM, C.T. et al. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.24, p.101-106, 1988.

ANDRADE, A.M.; GOMES, S.S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, v.7, n.1, p.181-9, 2000.

ANDRADE, F. M. C., CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa, UFV/DFT, 1999, 139p.

ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D.; Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. **Biochemycal Systematics and Ecology**. v.30, p.189-203, 2002.

ANTIDEHOU, K.K. et al. Antitypanosomal and Antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. **Journal of Ethnopharmacology**. v.90, p.221-227, 2004.

BALDOQUI, D.C. et al. Benzopyrans and benzoic acid derivatives from *Piper aducum*. Evaluation of DNA damaging activity. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, 1999.

BARROS, S.B.M., TEIXEIRA, D.S., AZNAR, A.E. Antioxidant activity of ethanolic extrats of (*Pothomorphe umbellata* L.). **Ciência e Cultura**. v.1, n.48, p.114-116, 1996.

BARROS, S.M.; et al. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (pariparoba). **J. Braz. Assoc. Adv. Sci.**,v.48, p.114, 1997.

BARROSO, G.M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.1, 2ª.ED, Viçosa: UFV, 2004.

BASTOS, W.E; et al. Metabólitos Secundários e Biossíntese em *Pothomorphe umbellata*.. **Res...21º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**. Poços de Caldas/MG, 1998.

BELTRAME, T.P.; RODRIGUES,E. Feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) na restauração de florestas tropicais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 19-28, 2007.

BERG, M. E. V. D. **Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**. 2a Edição. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém, 1993. p. 58-61.

BERGAMO, D.C.B. **Avaliação Química dos Componentes Não Voláteis e Voláteis e Estudo Biossintético do 4-Nerolidilcatecol em *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae)**. 146p. Tese. (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2003.

BIOKA, D.; ABENA, A. Pscopharmacological profile or *Piper umbellatum* aqueous extract. **Encephale**, v.16, p. 205-208, 1990.

BLANCO, M.C.G. **Preparado biodinâmico, temperaturas de secagem, tempo de armazenamento e tipos de embalagem na produção e conservação de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. 76p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Horticultura). Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.2001.

BLANCO, M.C.S.G.; et al. Influência da temperatura de secagem no teor e composição química do óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**. v.18, p.901-903, 2000.

BLANK, A.F.; et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de Melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.1, p.73-78, 2005.

BLANK,A.F. et al. Densidades de plantio e doses de biofertilizante na produção de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p.343-349, 2007.

BLANK,A.F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.17, n.4, p.557-564, 2007.

BORELLA, J.C. et al. Influência da adubação mineral (NP- K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* Less. (Asteraceae) - Carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n.1, p.101-4, 2001.

BORSATO, A.V.; DONI-FILHO, L.; AHRENS,D.C. Secagem de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Raeuchert] com cinco temperaturas de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.2, p.77-85, 2005.

BOZA,H.S. Revisión del género *Pothomorphe* (Piperaceae) in Cuba. **Revista del Jardín Botánico Nacional**. v. 19, p. 41-44, 1998.

BRAGA, F.G. et al. Antileishmanial and Antifungal activity plants used in tradicional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.111, p.396-402, 2007.

BUGGLE, V. et al. Inlence of diferents drying-temperatures on the amount of essential oils and citral content in *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf – POACEAE. **Acta Horticulturae**, n.500, p.71-74, 1999.

CARREIRA, R.C. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. 191p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente/Plantas Vasculares em Análises Ambientais). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo.2007.

CARVALHO, C.T.C.; GOSMANN,G.; SCHENKEL,E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, 1104 p.

CASTELLANI, D.C.et al. Influência do horário de colheita na produção de 4-nerolidilcatecol em folhas de pariparoba (*Pothomorphe umbellata*): matéria-prima da indústria cosmética. **Res. XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia**. p.95, suplemento CD-ROM, 2008.

CASTRO, H.G. et al. Rendimento de taninos em dois acessos de (*Bacchari myriocephala* D.C.) em diferentes épocas de colheita em Viçosa – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.1, n.2, p.29-33,1999.

CASTRO, N.E.A. et. al. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.70-75, 2008.

CHARTOL, A. *Piper umbellatum*. a vegetable insect repellent. **Méd Trop. Marseille**, v.6, n.24, 1964. p. 743-747.

CHAVES, F.C.M. **Produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de Alfavaca – cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte**. Botucatu. 144p. Tese (Doutorado em Agronomia/ - Área de Concentração: Horticultura) Faculdade de Ciências Agrônomicas –UNESP - Botucatu.2002.

COIMBRA, R. **Manual de fitoterapia** 2ª ed. Belém-PA. CEJUP, 1994, 213p.

CORRÊA JÚNIOR C; MING L.C.; CORTEZ , D.A.G. Sazonalidade na produção de raízes e teor de β -ecdisona em acessos de fáfia. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, 2008.

CORRÊA JÚNIOR, C. **Estudo agrônômico de [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de β -ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CORREA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2ª.Ed., Jaboticabal: FUNEP, 1994, 162p.

CORREA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER - Paraná, 1991, 162p.

COSTA, L.C.B. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de elixir-paregórico em função do corte das inflorescências e épocas de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 2, p.175-179, 2007.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: células e tecidos**. 2ª. Ed, São Paulo: Roca, v.1, 1986, 304p.

CZEPAK, M.P. Produção de óleo bruto e mentol cristalizável em oito frequências de colheita de menta (*Mentha arvensis* L). In: MING, L.C. (Org.) **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. 1998. p.53-80.

DA SILVA, V.V. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 303, p. 125–131, 2005.

DE FEO,V.; Use di plante ad azione antiinflamatoria nell'Alto Ucayali, Peru Orientale. **Fitoterapia**, v. LXVII, p.481-494,1991.

DE-FERREIRA-DA-CRUZ, M.; et al. The intraperitoneal Plasmodium berghei-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plants extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. **Exp. Parasitol**, v.94, p.243-247,2000.

DESCHAMPS, C. et al. Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de *Mentha*. **Ciência Agrotécnica**., v. 32, n. 3, p. 25-730, 2008.

DESMARCHELIER, C.; et al. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. Scavengers peroxy radicals and inhibits Fe (II)-dependent DNA damage. **Planta Medica**. v.63, p.561-563, 1997.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons. New York. 2002. 507p.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal Plants popularly used in the Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**. v.73, p. 69-91, 2002.

DI STASI, L.C., et al. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v.LXV, p. 529-540, 1993.

ELSOHLY, H. N.et al. Diurnal and Seasonal Effects on the Taxane Content of the Clippings of Certain *Taxus* Cultivars. **Phytochemical Analysis**. v.8, p. 124-129, 1997.

EVANS, W.C. Trease and Evans' Pharmacognosy. London: W.N. Saunders. 1996.

FACANALI, R. **Estudo da biologia reprodutiva, diversidade genética e química de populações de *Ocimum selloi* Benth**. 129p. Tese (Doutorado em Agronomia Horticultura)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008.

FERNANDES, M. F.; BARRETO A. C.; EMÍDIO FILHO, J. Fitomassa de adubos verdes e controle de plantas daninhas em diferentes densidades populacionais de leguminosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.34, n.9, p.1593-1600, 1999.

FERREIRA DA CRUZ, M.F. et al. Intraperitoneal Plasmodium berghei – Pasteur infection Swiss mice is not a system that is able to detect antiplasmodial activity in Pothomorphe plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. **Experimental Parasitology**. v.94, p. 243-247, 2000.

FERREIRA, R.B.G.; VIEIRA, M.C.; ZARETE, N.A.H. Análise de crescimento em *Trapaeolum majus* “Jewel”, em função de espaçamentos de plantas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.57-66, 2004.

FIGUEIREDO, R.O. et al. Reguladores vegetais na produção de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, em diferentes épocas do ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.31-35, 2006.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

FONSECA, M.C.M.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A. Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.9, n.2, p.75-79, 2007.

FOUNQUÉ, A. Les Plantes médicinales présent en Foret Guyanaise. **Fruits**. v. 35, n.12, p. 759-768, 1980.

FREISE, F.W. Plantas medicinais brasileiras. **Boletim da Secretaria da Agricultura Ind. E Com. Do Estado de São Paulo**. v.34, p. 361-427, 1933.

GARCIA, I.P., MARQUES, M.C., SILVA, V.T.A. Plantas medicinais: mercado em expansão. *Agriannual. Anual da agricultura brasileira*. Ed. Argos, 2000, p.67-69.

GENTRY, A.H. A field guide to the families and general woody plants of Northwest South America (Columbia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa. Washington DC. **Conservation International**.1993, 683p.

GIBBS, R.D. **Chemotaxy of flowering plants**. London: McGill-Queen's University Pres, 1974, p.1532-1537.

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

GOMES, H.E.; VIEIRA, M.C.; HEREDIA Z.N.A. Density and plant arrangement on *Calendula officinalis* L. yield. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.117-123, 2007.

GOTTLIEB, O.R. et al. Essential oils from the Amazon. **Acta Amazônica**, v.11, n.1, p.143-148, 1981.

GUERREIRO, C.P.V. **Análise de crescimento, curva de absorção de macronutrientes (N, P e K) e teor de β -ecdisona em fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] em função de adubação orgânica**. 144f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

GUSTAFSON, K.R. et al. The peltatols, novel anti-HIV catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. **Journal of Organic Chemistry**. Washington DC, v.57, p.2809-281, 1992.

HABER, L.L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microsatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaste* MART**. 112p. Tese (Doutorado em Agronomia - Horticultura)Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2008.

HAMMER, M.L.A.; JOHNS, E.A. tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of marajó Island, Pará (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**. v.40, p.53-75, 1993.

HERTWIG, V.I.F. **Plantas medicinais e aromáticas: plantio, colheita, secagem e comercialização**. 2 ed. São Paulo: Ícone, 1991, 414p.

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi.**, v.122, n.4, p. 291-294, 2002.

JANUÁRIO, A.A., MENDES, L.M., CRUZ, H.M. Atividade anti-paf de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. Piperaceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 9. **Res...** Curitiba-Pr. 1992.

JENSEN, S.; HANSEN, J.; BOLL, P.M. Lignans and neolignans from Piperaceae. **Phytochemistry**. v.28, p.523, 1993.

KASHIMA, S.; PIETRO, R.C.L.; ENNES, G. Atividade do extrato de *Pothomorphe umbellata* frente às cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15. **Res...** Águas de Lindóia – São Paulo, 1998.p.56.

KHAZAIE, H.R. ; NADJAFIB, F.; BANNAYANA, M. Effect of irrigation frequency and planting density on herbage biomass and oil production of thyme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*). **Industrial Crops and Products**. v.27, p.315-321, 2007.

KIJOA, A., et al. 4-Nerodyl-cathechol from *Pothomorphe umbellata*. **Plant Med**. v.39, p.85-87, 1980.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000, 531p.

LEAL, T.C.A.B., et al. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf.] em diferentes idades. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.2, p.61-64, 2003.

LICHTENTHALER, H.K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.47-65, 1999.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002, p

LOSS, F.R. Sistema agroflorestral: café, banana e ingá. **Rev. Bras. de Agroecologia**. v.2, n.2, p.1088-90, 2007.

LUNZ, A.M.P.; FRANKE, I.L. Avaliação de um sistema agroflorestral com pupunha, açaí, cupuaçú, café e castanha-do-brasil no Estado de Acre. **Boletim Informativo EMBRAPA – Centro de Pesquisa Agroflorestral do Acre**. n.101, p.1-3, 1997.

LUZ, A.I.R. et al. Volatile constituents of brazilian Piperaceae, Part 5. The oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata*. **Journal of Essential Oil Research**. v. 11, n. 4, p. 479-481.1999.

MACHADO, S.R.; SILVA.E.M.J.; GREGÓRIO, E.A. Ultra structural aspects of the Pearl-Gland in *Piper regnelli* (Piperaceae), **Acta Microscopica** v.4, p.274, 1995.

MANN, T. **Chemical Aspects of Biosynthesis**. New York: Oxford University Press Inc. 1994, 92p.

MARCHESE, J.A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos**. 1999. 88p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1999.

MARCHESE, J.A.; FIGUEIRA, G.M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.86-96, 2005.

MARCHESE, J.A.; MATTANA, R.S.; MING, L.C. Trocas gasosas em plantas submetidas a diferentes irradiâncias. **Horticultura Brasileira**. v.22, n.2, suplemento CD-ROM, 2004.

MARTINAZZO, A.P.; et al. Difusividade efetiva em folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf submetidas à secagem com diferentes comprimentos de corte e temperaturas do ar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.1, p.68-72, 2007.

MARTINS, A.P. et al. Essential oils from four *Piper* species. **Phytochemistry**. v. 49, n.7, p.2019-2023, 1998.

MARTINS, F.C. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995, 220p.

MARTINS, P.M.; et al. Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.911-913, 2000.

MATTANA, R.S. **Produção de biomassa, teor e composição do óleo essencial e plasticidade foliar em plantas de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento**. 108p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Horticultura) Universidade Estadual Paulista. Botucatu.2005.

MATTANA, R.S., et al. Biomass production in plants of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. submitted to different shade levels. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.esp., p.83-85, 2006.

MATTOS, S.C.; INECCO, R. Idade ideal de corte de *Mentha arvensis* L. como produtora de óleo essencial e mentol para o Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.1, p.15-18, 2002.

MAY,A. et al. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 379-382, 2008.

McLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D. **The wile/NBS registry of mass spectral data**. John Wiley Sons, New York, v. 1-6, 1989.

MELO, E.A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MESQUITA, J.M.O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.1, p. 6-12, 2005.

METCALFE. C.R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford, Clarendo Press, v.2, 1950, 724p.

MING, L.C. **Levantamento de Plantas Mediciniais na Reserva Extrativista Chico Mendes-Acre**. 165p. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas/Botânica). Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 1995.

MING, L.C. Plantas medicinais: um recurso cultural. **Alternativa – Cadernos de Agroecologia**, julho, 1994, p.40.

MING, L.C., et al. Produção sazonal do óleo essencial em uma população natural de *Piper aduncum* L. em Adrianópolis – PR. **Horticultura Brasileira**, v.20, suplemento CD-ROM, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta de Política Nacional de Plantas Mediciniais e Medicamentos Fitoterápicos** – Fórum Brasília - 17, 18 e 19 de dezembro de 2001. Disponível em: <http://www.suade.gov.br/sps> Acesso em: 15 de abril de 2005.

MONGELLI, E.; et al. cytotoxic catechol derivative from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. **Planta Med.**, v.65, n.4, p.376-378, 1999.

MONTANARI JUNIOR, I., MAGALHÃES, P.M.; QUIROGA, C.L. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of b-ecdisonone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.3, n.502, p.125-128, 1999.

MORAES, M.S. de. **Caracterização Farmacognóstica da Droga e do Extrato Fluido de *Pothomorphe umbellata* L.** **Miq.** São Paulo. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas/ Controle de Qualidade de Drogas e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 1983.

MORAES, M.S., MACHADO, S.R., MARQUES, M.O.M. Essential Oil of the *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. **Journal of Essential Oil Research**, v.3, n.502, p.125-128, 2004.

MORAES, M.S., AKISUE, M.K., OLIVEIRA, F. Considerações sobre pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Rev. Bras. de Farmacognosia**. v.5, n.1e7, p.101-108, 1986.

MORAES, M.S., et al. Morfodiagnose das Folhas e Sumidades floridas da Droga Pariparoba – *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Rev. Cienc. Farm. de São Paulo**. n. 8/9, p.77-90, 1987.

MORAES, M.S., GLOMBTIZA, K.W., OLIVEIRA, F. Isolamento de caroteno Prolycopeno das folhas de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. – Piperaceae. In: XLV Congresso Nacional de Botânica. São Leopoldo – RS, **Res...**, 1994, p.187.

MORAIS, H. et al. Características fisiológicas e de crescimento de cafeeiro sombreado com guandu e cultivado a pleno sol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p.1131-1137, 2003.

MORS, W.B. et al. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**. v. 55, p. 627-642. 2000.

NAGAO, E.O. et al. Effect of the harvest time on content and major constituent of essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., chemotype citral-limonene. **Ciência Agronomica**. v.35, p.355-360, 2004.

NASCIMENTO, E.X. et al. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência Agrotecnica**, v. 31, n. 3, p.724-730, 2007.

NORIEGA, P. et al. Optimization of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel topical formulations using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**. v.353, p.149–159, 2008.

SILVA, P.; et al. Avaliação por análise fatorial das condições da extração de 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellate* (L.) Miq., **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 41, n.2, p. 261-269, 2005.

OLIVEIRA, F., AKISUE, M.K., AKISUE, G. **Farmacognosia**. São Paulo. Rio de Janeiro Atheneu.,1997,127p.

PALÁCIO, C.P.A.M. et al. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.58-63, 2007.

PALÁ-PAÚL, J. et al. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochemycal Systematics and Ecology**. v.29, p.663-672, 2001.

PALEVITCH, D. Recent advances in the cultivation of medicinal plants. **Acta Horticulturae**, v.208, p.29-34, 1987.

PARMAR, V,S, et al. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**. v.46, p.597, 1997.

PECKOLT, T., PECKOLT, G. **História de plantas medicinais e úteis do Brasil**. Rio de Janeiro Typ. Laemert, v.6, p.1888-914, 1896.

PERAZZO, F,F, et al. Anti-inflammatory na analgesic activities of water-etanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.99, 215-220, 2005.

PERAZZO, F.F. **Estudo químico – farmacológico dos extratos e princípios ativos obtidos da espécie medicinal *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae)**. 111p. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2006.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas e cultivadas**. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro, 1926, 350p.

PUPO, A,S, **Estudo do efeito analgésico de plantas medicinais da família Piperaceae**. (Monografia), Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 1988.

REIS, M.S., MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: _____. 2. Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000. p.39-60.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da a UFSC, 2007, 1104 p.

REITZ, R. **Piperáceas**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1978 p.22-24.

REZENDE, K.R. **Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.** 78p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo. 2002.

RIEDEL, O.O. Subsídios para o estudo farmacolognostico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth – Curitiba, **Trib. Farmac.** n.9, v.12, p.269-83, 1941.

ROCHA, S.F.R.; MING, L. C. MARQUES,M.OM. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composiao química do óleo essencial de citronella (*Cymbopogon winteranus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v.3, n.1, p.73-78, 2000.

ROPKE, C. D.; et al. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol from depletion after UV-irradiation. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v.78, n.5, p.109-116, 2003a.

ROPKE, C.D. **Avaliaao da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. na pele.** 1999. 83p. Dissertaao. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

ROPKE, C.D., et al. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics.** v.249, p.109–116, 2002.

ROPKE, C.D., et al. In vitro and in vivo inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.439–442, 2006.

ROPKE, C.D., et al. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellate* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clinical Experimental Dermatology.** v.30, p.272–276 , 2005.

RÖPKE, C.D.; et al. Validaao de metodologias analıticas para determinaao quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 39, n.2, 2003b, p.209-217.

SALATINO, A.; SILVA, J.B. Anatomia e Óleo essencial de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *Regnellii*. **Bol. Botânica Univ. São Paulo**.v.3, p.95-106, 1975.

SILVA, F et al. Teor e composição do óleo essencial de manjeriço *Ocimum basilicum* L. em dois horários e duas épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.6, n.1, p.33-38, 2003.

SILVA, G.A.A.B., BAUER, L. Contribuição á Química do Óleo essencial de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. **Res. Bras. Farm. do Rio de Janeiro**. v.53, p.53-61, 1972.

SILVA, M. G. V., et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v.70, p.32-34, 1999.

SILVA, N.A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.52-55, 2006.

SILVA, N.F.; SONNENBERG, P.E.; BORGES, J.D. Crescimento e produção de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em função de adubação mineral e densidade de plantio. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.1, p.61-65, 2004.

SILVA, R.A.D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. 1ª Ed. São Paulo – Cia. Ed. Nacional.1926, 850p.

SILVA, F.G. et al. Seasonal variation in the total phenol contents in cultivated and wild carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9 n.3, p.52-57, 2007.

SILVA,F.G.et al. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] coletadas nas estações seca e úmida. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.19-25, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, 1104 p.

SOUZA, J.P.B. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada utilizando cromatografia gasosa e líquida**. 164p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração; Produtos naturais e sintéticos). Faculdades de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2007.

STELLFELD, C. As drogas vegetais da Farmacopéia Brasileira em face ao sistema taxonômico. **Tribuna Farmacêutica**. Curitiba-PR, v. 7, n.6, p.117, 1938.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed, Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 313.

TRAPP, S.C., CROTEAU, R.D. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genet.** v.158, p.811-32, 2001.

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

VASCONCELLOS, A.A. et al. Influência da densidade de plantio e da adubação orgânica na produtividade e produção de óleo essencial de mil-folhas. **Horticultura Brasileira**, CD-ROM, 2008.

VENTRELLA, M.C. **Produção de folhas, óleo essencial e anatomia quantitativa foliar de *Lippia Alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita**. Botucatu. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia Horticultura). Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista. 2000.

VIEIRA et al.. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: **Resultados da 1ª Reunião Técnica. Brasília/DF**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos naturais Renováveis (Ibama)/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002, 184p.

VIEIRA, L. S. **Manual da Medicina Popular – A Fitoterapia da Amazônia**. FCAP – Serviço de Documentação e Informação: Belém, 1991. p 48- 51.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Produção de óleo essencial de eucalipto. **Notícias Florestais**, v.23, n.146, 1999.

WANDERER, M; BARROS, I.B.I. Efeito do espaçamento de plantas sobre o rendimento de biomassa de duas cultivares de melissa. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.2, n.1, p.1118-1121, 2007.

WU, Q.L. et al. Alkaloids from *Piper puberulum*. **Phytochemistry**. v.44, p.727, 1997.

YUNCKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil 2**. Hoehnea. São Paulo, v.3, 1973, p. 29-284.

APÊNDICE

Apêndice 1. Protocolo de preparo e obtenção do extrato bruto de folhas de *P. umbellata*

Objetivo

Otimizar as condições para a obtenção do extrato bruto de folhas de *P. umbellata*.

Metodologia

1. Determinação do solvente de extração

Folhas de *P.umbellata* coletadas no município de Jundiaí/SP em abril de 2007 foram secas em estufa a 40°C por 48 horas, tempo suficiente para estabilização da massa da matéria seca. Posteriormente pulverizadas em moinho tipo “Wiley”. Duas alíquotas de 5,00 gramas do material seco foram colocadas em erlenmeyers, juntamente com 40 mL de metanol e etanol respectivamente, e armazenadas em local escuro durante um período de 108 horas (4 dias e ½). Após esse período os respectivos extratos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador e calculados os rendimentos, conforme o resultado apresentado na Tabela 42.

Tabela 42. Rendimento dos extratos foliares de *P.umbellata* em função de tipos de solventes.

Solvente	Rendimento (mg)	Rendimento %
Metanol	650	13,0
Etanol	330	6,6

2. Determinação da relação planta:solvente e do tempo de extração.

Quatro alíquotas de 5,00 gramas do material tamisado foram acondicionadas em erlenmeyer, devidamente identificados e vedados com alumínio para proteção da luminosidade, juntamente com 25, 50, 75 e 100 mL de metanol, (P.A. marca “Synth”).

Os extratos metanólicos, contendo as respectivas quantidades do solvente, foram testados em diferentes tempos e métodos de maceração: maceração mecânica com agitação em temperatura ambiente por 60 e 120 minutos em mesa agitadora com rotação constante de 150 rpm e maceração estática por um período de 24 horas.

Após os períodos de extração estabelecidos, os extratos foram filtrados para frascos âmbar, previamente pesados e identificados, em seguida foram concentrados em rotaevaporador, com pressão reduzida e temperatura de 40°C, até a evaporação total do solvente, para posterior cálculo do rendimento, conforme apresenta a Tabela 43. Visando a maximização

do trabalho e perante os resultados apresentados, foram estipulados a relação planta:solvente 1:10 (50,0 mL de metanol para 5,00 gramas de planta) com um tempo de agitação de 1 hora, devido ao pouco acréscimo no rendimento dos extratos a partir da quantidade de 50,0mL de metanol e do tempo de uma hora de extração para maiores períodos de extração.

Tabela 43. Rendimento (%) dos extratos metanólicos de *P. umbellata* em função de quantidade de solvente, tempo e processo extrativo. UNESP/Botucatu, 2009.

Quantidade solvente (mL)	Tempo/modo de extração		
	1 hora agitação	2 horas agitação	24 horas maceração
25,0	4,2	3,8	4,4
50,0	10,4	11,6	7,5
75,0	12,3	13,1	9,2
100,0	14,5	14,0	11,8

Apêndice 2. Protocolo de isolamento da substância 4-nerolidilcatecol a partir de raízes de *P. umbellata*.

Objetivo

Isolar uma quantidade suficiente de 4-nerolidilcatecol para realizar a quantificação da substância nos extratos brutos foliares da espécie em questão.

Metodologia

Raízes de *P. umbellata* foram coletadas no município de Jundiaí-SP e levadas para Instituto Agrônomo de Campinas, onde foram lavadas e secas em estufas de secagem a 40°C, até a estabilização total do peso. O material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas tipo “Wiley” e submetido ao processo de tamisação (20 mesh).

Cerca de 2,00 quilos de raízes pulverizadas foram percolados utilizando aproximadamente 2,0 litros de metanol (P.A. “Synth”) durante 48 horas e armazenados em vidros âmbar em ambiente fechado e temperatura ambiente. Após esse período o material foi filtrado a vácuo através de placa sinterizada acoplada a um kitassato e, em seguida concentrado em rotaevaporador a 40°C.

Uma alíquota de 100mg do extrato seco de raízes foi ressuspensa em metanol grau CLAE e aplicada com capilar em placa cromatográfica preparativa de vidro com sílica gel (Merck), e em seguida eluída com hexano:acetato de etila (80:20).

Após o término da eluição (01h30min), a placa foi retirada da cuba e deixada em capela até a total evaporação do solvente, para posterior visualização em câmara ultravioleta (284nm e 366nm). Foram identificadas quatro frações, as quais foram demarcadas e separadas com auxílio de uma espátula (Figura 21).

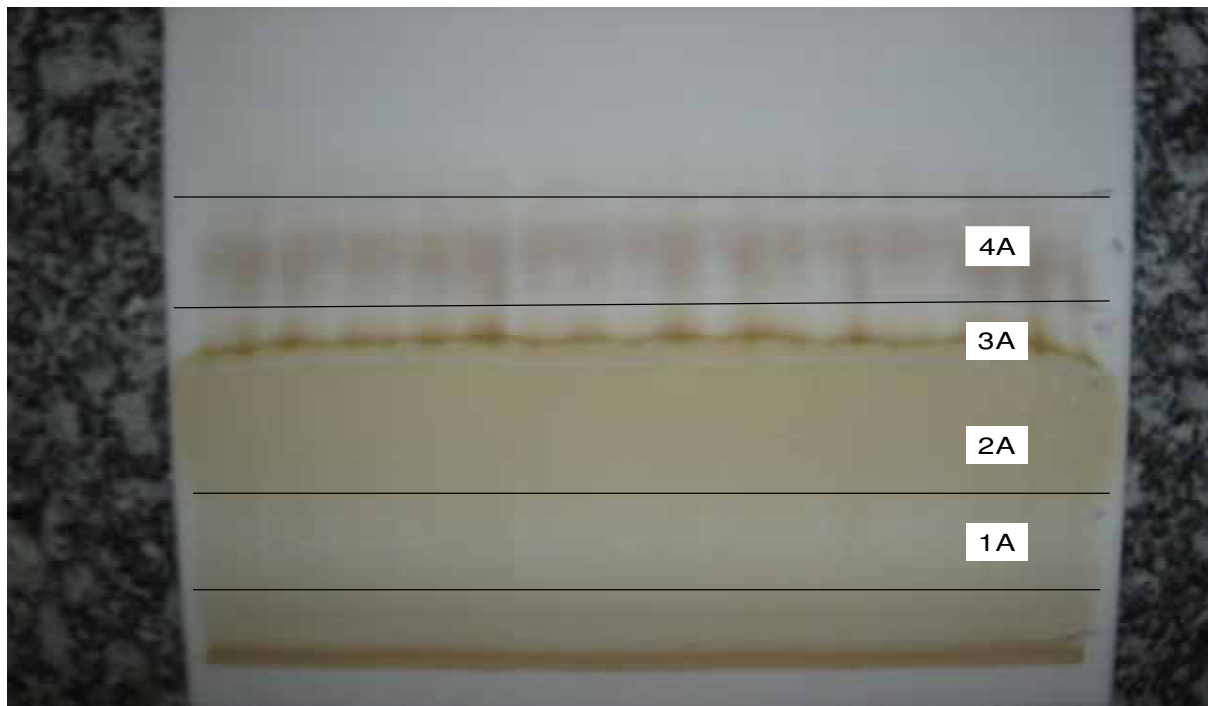


Figura 21. Placa cromatográfica contendo as frações isoladas do extrato metanólico de raízes de *P. umbellata*.

Cada fração foi acondicionada em erlenmeyers, juntamente com 10 mL da solução de hexano:acetato de etila (1:1) e agitada por alguns minutos. As soluções foram filtradas a vácuo em funil de placa sinterizada, transferidas para balões de fundo redondo, concentradas em rotaevaporador e armazenadas em freezer (-18°C) até o momento da análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) para a identificação da substância 4-nerolidilcatecol (Figura 22). A fração 2A foi identificada, como sendo a substância 4-nerolidilcatecol, por comparação do espectro com o de literatura (Perazzo, 2005).

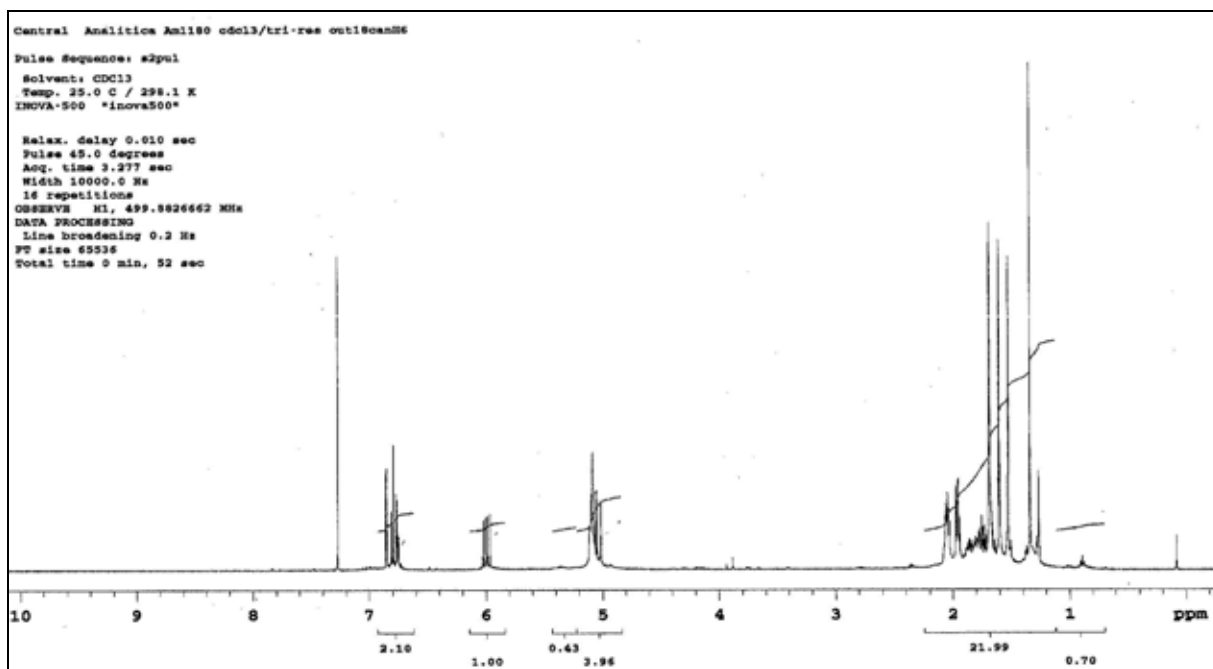


Figura 22. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da substância 4-nerolidilcatecol.

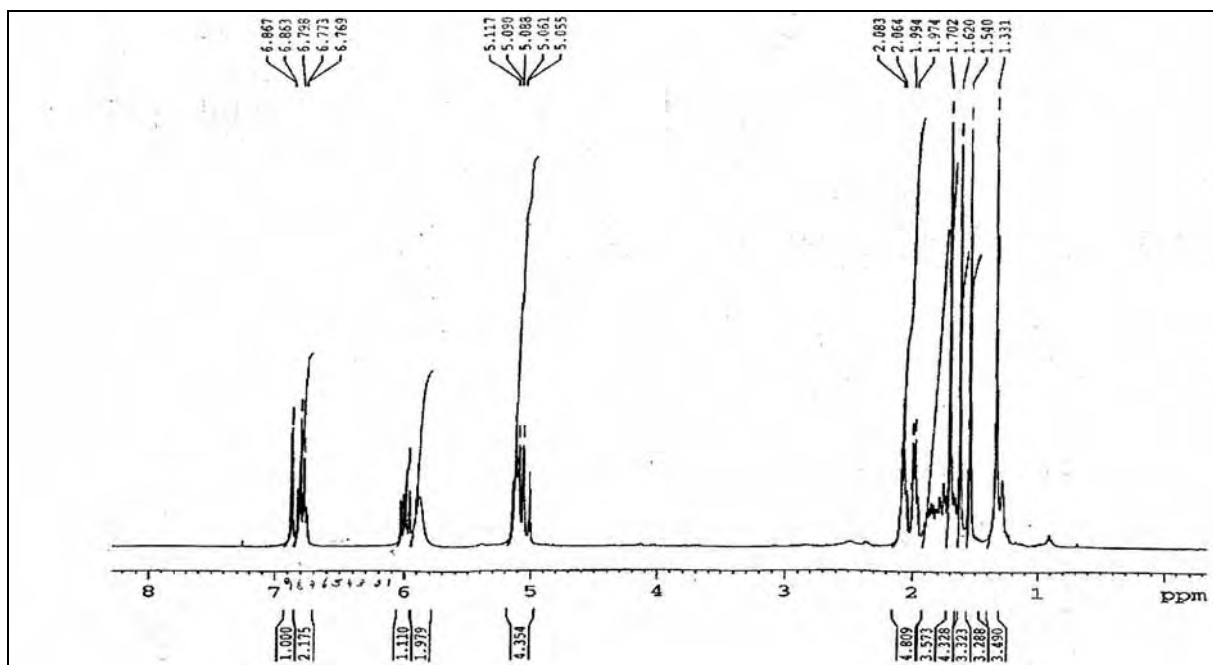


Figura 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da substância 4-nerolidilcatecol identificada por Perazzo (2005).

Para a obtenção de maior quantidade dessa substância, o extrato metanólico bruto de raízes foi submetido à cromatografia de adsorção em coluna (450 mm x 40 mm) com 50,0 gramas de sílica gel (Merck) empacotada com hexano grau CLAE, utilizando como eluente hexano:acetato de etila com polaridade crescente (90:10; 80:20; 10:10).

Foram coletadas 12 frações (Tabela 44), as quais foram concentradas em rotaevaporador. As frações concentradas foram ressuspensas, aplicadas em placas cromatográficas e depois visualizadas em câmara ultra-violeta para análise comparativa com a fração 2A (Figura 24). As frações 10 e 11 contendo 4-nerolidilcatecol foram reunidas e purificadas por cromatografia preparativa, resultando em 60 mg.

Para confirmação da substância isolada 4-nerolidilcatecol, foi injetada uma amostra em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas (Figura 25).

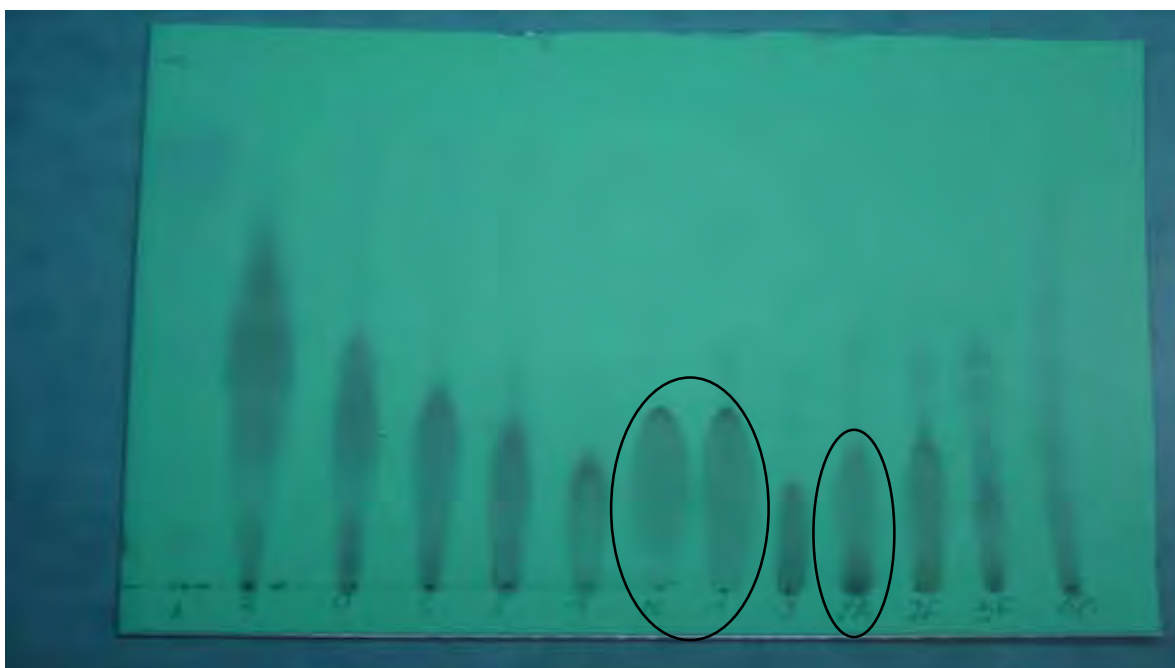


Figura 24. Placa cromatográfica comparativa contendo as 12 frações coletadas em cromatografia em coluna, a fração 2A identificada na RMN e as 3 frações coletadas na cromatografia preparativa de *P. umbellata*.

Tabela 44. Frações 1 a 12 coletadas na coluna cromatográfica com os eluentes hexano: acetato de etila com polaridade crescente.

Frações coletadas	Eluentes - Hexano: Acetato de Etila
1 – 7	9:1
8 – 11	8:2
12	1:1

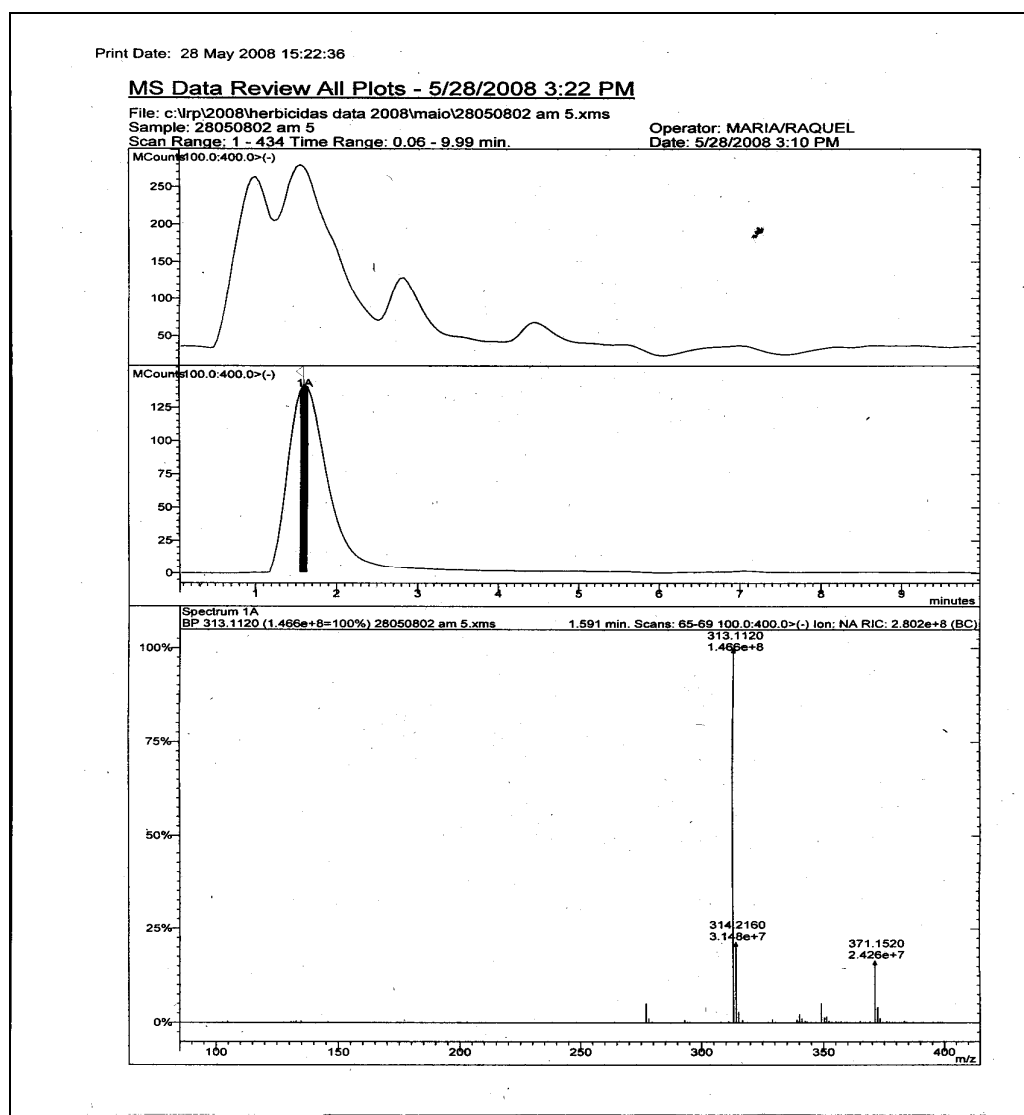


Figura 25. Espectro de massas da substância 4-nerolidilcatecol identificada por CLAE – EM.

Apêndice 3. Composição química do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* do experimento de horários de colheita x temperaturas de secagem.

Tabela 45. Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função dos horários das colheitas.

Substâncias Químicas	Horários de colheitas (horas)					
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00	21:00
α -pineno	0,52	0,52	0,56	0,39	0,41	0,49
β -pineno	0,75	0,71	0,75	0,59	0,56	0,66
Limoneno	0,02	0,06	0,13	0,05	0,07	0,08
Decanal	0,59	0,86	0,61	0,90	0,67	0,72
δ -elemeno	0,57	0,34	0,49	0,38	0,43	0,46
α -cubebeno	0,88	0,77	0,69	0,65	0,70	0,83
Ciclosativeno	0,11	0,04	0,10	0,14	0,12	0,15
α -copaeno	1,65	1,51	1,51	1,24	1,39	1,51
β -bouborneno	0,00	0,00	0,04	0,03	0,05	0,04
β -cubebeno	0,18	0,19	0,16	0,15	0,14	0,15
β -elemeno	2,73	2,54	2,58	2,37	2,62	3,01
Octadecanal	0,20	1,10	0,19	0,32	0,20	0,27
<i>E</i> -cariofileno	19,05	16,47	16,91	13,96	16,77	16,21
β -gurjuneno	1,05	0,90	0,83	0,77	0,94	0,96
Aromadendreno	0,57	0,40	0,45	0,39	0,51	0,50
α -humuleno	1,72	1,40	1,51	1,42	1,52	1,53
cis-muurolo-4(14)-5 dieno	0,39	0,34	0,35	0,37	0,32	0,36
γ -muuroloeno	2,03	1,64	1,76	1,53	1,82	1,91
Germacreno-D	14,97	15,20	14,91	14,13	12,79	14,34
β -selineno	0,76	0,65	0,57	0,67	0,75	0,89
cis- β -guaieno	0,69	0,70	0,64	0,64	0,38	0,19
α -selineno	6,24	5,87	6,05	5,67	5,96	6,41
α -muuroloeno	0,80	0,68	0,66	0,62	0,70	0,76
<i>E,E</i> , α -farneseno	1,06	1,05	1,09	1,03	1,02	1,19
γ -cadineno	1,67	1,48	1,49	1,52	1,63	1,62
δ -cadineno	4,06	3,42	3,56	3,26	4,14	3,63
Cubeneno	0,27	0,18	0,23	0,21	0,26	0,21
α -cadineno	0,27	0,18	0,23	0,18	0,25	0,22
α -calacoreno	0,28	0,20	0,25	0,20	0,29	0,24
<i>E</i> -nerolidol	21,04	22,23	22,77	24,73	25,91	21,94
Espatuleno	1,40	2,37	1,48	1,94	1,31	1,89
Óxido-cariofileno	3,39	3,94	3,66	3,87	3,88	4,33
1-epi-cubenol	0,66	0,59	0,68	0,82	0,69	0,70
epi- α -cadinol	1,75	1,99	2,01	2,52	2,15	2,16
Cubenol	1,06	1,16	1,17	1,48	1,16	1,19
α -muurolol	1,37	1,61	1,61	2,14	1,75	1,72
TOTAL	94,76	93,30	92,65	91,24	94,27	93,46

Tabela 46. Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de *P.umbellata* em função das temperaturas de secagem.

Substâncias Químicas	Temperaturas de secagem (°C)			
	FOLHAS FRESCAS	40°C	60°C	80°C
α -pineno	0,66	0,89	0,35	0,02
β -pineno	1,12	1,13	0,40	0,04
Limoneno	0,05	0,09	0,03	0,10
Decanal	2,07	0,69	0,13	0,02
δ -elemeno	0,62	0,48	0,38	0,30
α -cubebeno	0,49	1,08	0,86	0,58
Ciclosativeno	0,00	0,00	0,00	0,44
α -copaeno	1,32	1,91	1,54	1,10
β -bouborneno	0,00	0,00	0,00	0,10
β -cubebeno	0,22	0,23	0,14	0,06
β -elemeno	2,50	2,92	2,72	2,41
Octadecanal	0,63	0,18	0,68	0,03
<i>E</i> -cariofileno	25,00	15,66	13,44	12,15
β -gurjuneno	0,72	1,34	0,93	0,65
Aromadendreno	0,26	0,61	0,48	0,54
α -humuleno	1,80	1,46	1,36	1,45
cis-muurolo-4(14)-5 dieno	0,34	0,68	0,36	0,04
γ -muurolo	1,40	2,09	1,76	1,87
Germacreno-D	18,83	19,27	15,13	4,34
β -selineno	0,71	0,99	0,75	0,41
cis- β -guaieno	0,43	0,45	0,61	0,68
α -selineno	7,59	8,20	6,14	2,22
α -muurolo	0,74	0,81	0,64	0,63
<i>E,E</i> , α -farneseno	1,87	1,34	0,89	0,19
γ -cadineno	1,27	1,86	1,76	1,38
δ -cadineno	3,03	4,12	3,73	3,83
Cubeneno	0,26	0,28	0,21	0,15
α -cadineno	0,14	0,27	0,23	0,25
α -calacoreno	0,00	0,25	0,27	0,45
<i>E</i> -nerolidol	16,46	18,56	25,02	32,38
Espatuleno	0,12	0,81	2,08	3,91
Óxido-cariofileno	1,61	3,27	5,51	5,00
1-epi-cubenol	0,41	0,56	0,82	0,97
Epi- α -cadinol	1,77	1,70	2,30	2,62
Cubenol	0,82	0,82	1,25	1,93
α -muurolol	1,53	1,36	1,58	2,34
TOTAL	96,76	96,37	94,44	85,54

Apêndice 4. Composição química do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* do experimento de espaçamentos entre plantas x idades de colheita.

Tabela 47. Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* em função dos espaçamentos entre plantas e das idades de colheita.

Substâncias	Idade de colheita					
	6 meses			12 meses		
	Espaçamentos					
	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0	0,5 x 0,5	0,5 x 0,75	0,5 x 1,0
α -pineno	0,02	0,06	0,03	0,25	0,28	0,03
β -pineno	0,13	0,24	0,19	0,48	0,44	0,03
δ -elemeno	4,41	3,87	3,91	2,46	2,46	2,32
α -cubebeno	1,55	1,53	1,52	1,70	1,71	1,83
Ciclosativeno	0,60	0,10	0,06	0,28	0,27	0,31
α -copaeno	2,25	2,12	2,22	2,51	2,42	2,66
β -cubebeno	0,46	0,41	0,47	0,52	0,52	0,54
β -elemeno	2,01	1,61	2,82	2,14	1,82	1,96
<i>E</i> -cariofileno	7,03	8,04	6,01	7,64	7,64	7,16
β -gurjuneno	1,23	1,33	1,18	1,78	1,75	1,94
Aromadendreno	0,47	0,55	0,56	1,16	0,97	0,89
α -humuleno	0,83	0,98	0,75	0,69	0,78	1,02
cis-muurolo- 4(14)-5 dieno	1,05	1,33	1,13	1,09	0,96	0,59
γ -muurolo	3,17	3,25	2,97	4,77	4,81	5,16
Germacreno-D	41,48	40,03	39,58	20,58	20,60	19,34
β -selineno	0,45	0,39	0,59	0,97	0,69	0,78
cis- β -guaieno	2,28	2,43	2,31	3,15	3,23	3,45
α -selineno	9,85	8,97	10,15	7,08	6,79	6,96
α -muurolo	0,03	0,03	0,03	1,10	1,04	1,15
<i>E,E</i> , α -farneseno	0,98	0,72	1,15	0,86	0,67	0,75
γ -cadineno	2,54	2,83	2,56	3,73	3,78	4,03
δ -cadineno	5,55	6,37	5,55	9,58	9,66	10,33
Cubeneno	0,43	0,49	0,46	0,44	0,40	0,47
α -cadineno	0,32	0,44	0,37	0,52	0,49	0,52
α -calacoreno	0,27	0,27	0,22	0,59	0,61	0,64
<i>E</i> -nerolidol	0,70	0,51	1,07	2,93	3,07	3,22
Espatuleno	0,80	0,91	1,38	3,73	4,48	4,16
Óxido-cariofileno	1,04	1,24	1,43	2,97	3,27	2,78
1-epi-cubenol	1,42	1,69	1,67	3,72	4,16	3,71
epi- α -cadinol	1,13	1,31	1,37	1,87	1,98	1,95
Cubenol	0,27	0,27	0,35	0,58	0,60	0,58
α -muurolol	1,25	1,41	1,83	2,51	2,54	2,56
TOTAL	96,02	95,70	95,85	94,33	94,86	93,78

Apêndice 5. Composição química do óleo essencial de folhas de *P. umbellata* do experimento de populações de plantas x sazonalidade.

Tabela 48. Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* da população de Piquete/SP em função da sazonalidade.

Substâncias	Sazonalidade			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
α -pineno	0,28	0,69	0,34	0,34
β -pineno	0,30	0,81	0,47	0,65
Decanal	0,15	0,15	0,32	0,24
δ -elemeno	0,22	0,19	0,55	0,86
α -cubebeno	1,06	0,90	1,33	1,27
Ciclosativeno	0,19	0,03	0,08	0,14
α -copaeno	2,32	1,52	2,09	1,98
β -cubebeno	0,34	0,03	0,39	0,28
β -elemeno	2,76	1,23	3,14	3,42
Octadecanal	0,03	0,10	0,03	0,03
<i>E</i> -cariofileno	17,96	14,67	13,38	11,13
β -gurjuneno	1,62	1,08	1,68	1,41
Aromadeno	1,04	0,69	0,84	0,68
α -humuleno	1,55	1,36	0,64	1,10
cis-muurolo-4(14)-5 dieno	1,02	0,86	1,15	1,05
γ -muurolo	2,51	1,93	2,60	2,42
Germacreno-D	10,53	8,36	21,37	22,53
β -selineno	1,64	0,81	1,32	1,88
cis- β -guaiano	0,03	0,94	0,49	0,03
α -selineno	8,40	4,80	10,27	9,36
α -muurolo	1,07	0,82	1,23	0,76
<i>E,E</i> , α -farneseno	1,23	0,66	1,73	1,29
γ -cadineno	2,48	1,93	3,43	2,49
δ -cadineno	7,91	5,88	3,25	5,04
Cubeneno	0,39	0,27	0,44	0,28
α -cadineno	0,43	0,35	0,36	0,29
α -calacoreno	0,59	0,53	0,29	0,26
<i>E</i> -nerolidol	16,26	30,26	12,99	11,99
Espatuleno	1,27	1,32	1,04	2,40
Óxido-cariofileno	4,56	5,12	3,34	4,25
1-epi-cubenol	0,51	0,92	0,65	0,59
epi- α -cadinol	2,02	2,27	1,77	2,32
Cubenol	1,03	1,05	0,81	1,11
α -muurolo	1,68	2,04	1,62	1,83
TOTAL	95,33	94,53	95,38	95,65

Tabela 49. Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* da população de Jundiaí/SP em função da sazonalidade.

Substâncias	Sazonalidade			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
α -pineno	0,37	0,06	0,02	0,12
β -pineno	0,44	0,24	0,02	0,25
Decanal	0,01	0,00	0,02	0,08
δ -elemeno	3,36	3,87	3,22	2,76
α -cubebeno	1,52	1,53	1,51	1,75
Ciclosativeno	0,09	0,00	0,20	0,14
α -copaeno	2,06	2,12	2,09	1,72
β -cubebeno	0,27	0,41	0,34	0,40
β -elemeno	2,73	1,61	1,47	3,28
Octadecanal	0,03	0,00	0,03	0,22
E-cariofileno	7,76	8,04	8,05	8,77
β -gurjuneno	1,48	1,33	1,66	1,43
Aromadendreno	0,71	0,55	0,69	0,62
α -humuleno	0,89	0,98	0,59	0,66
cis-muurolo-4(14)-5 dieno	1,09	1,33	1,26	0,93
γ -muurolo	3,87	3,25	4,19	3,19
germacreno-D	27,96	40,03	28,73	30,36
β -selineno	0,90	0,39	0,19	2,49
cis- β -guaieno	2,05	2,00	3,14	0,14
α -selineno	9,16	8,97	7,34	9,65
α -muurolo	0,44	0,03	0,94	0,70
<i>E,E</i> , α -farneseno	1,15	0,72	0,62	1,20
γ -cadineno	3,24	2,83	3,67	2,77
δ -cadineno	6,69	6,37	8,33	6,02
Cubeneno	0,34	0,45	0,38	0,29
α -cadineno	0,49	0,44	0,52	0,33
α -calacoreno	0,41	0,30	0,49	0,26
<i>E</i> -nerolidol	2,22	0,51	1,60	5,49
Espatulenol	2,63	0,98	2,68	2,39
Óxido-cariofileno	2,48	1,35	2,34	1,56
1-epi-cubenol	1,43	0,27	2,59	2,43
epi- α -cadinol	1,25	1,56	2,11	1,36
Cubenol	0,72	1,08	0,33	0,44
α -muurolol	1,79	1,48	1,71	1,42
TOTAL	92,02	95,07	93,00	95,58

Tabela 50. Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* da população de Iporanga/SP, em função da sazonalidade

Substâncias	Sazonalidade			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
α -pineno	0,42	0,56	0,98	0,53
β -pineno	0,49	0,68	1,12	0,79
Decanal	0,03	0,03	0,03	0,14
δ -elemeno	0,99	0,87	1,38	1,01
α -cubebeno	1,16	0,94	1,28	1,31
Ciclosativeno	0,13	0,06	0,03	0,16
α -copaeno	2,52	1,78	1,89	2,12
β -cubebeno	0,30	0,03	0,03	0,21
β -elemeno	3,30	1,80	3,43	5,52
Octadecanal	0,03	0,03	0,10	0,17
<i>E</i> -cariofileno	18,87	13,84	12,19	11,81
β -gurjuneno	1,35	1,25	1,37	1,26
Aromadendreno	0,90	0,76	0,77	0,65
α -humuleno	1,73	1,12	1,28	1,37
cis-muurolo-4(14)-5 dieno	1,04	1,32	1,20	0,99
γ -muurolo	3,05	2,64	2,84	2,57
Germacreno-D	12,44	13,76	20,06	19,66
β -selineno	1,81	1,01	1,52	2,41
cis- β -guaieno	0,03	1,44	0,57	0,17
α -selineno	9,05	6,78	10,47	11,74
α -muurolo	0,92	0,82	0,59	0,42
<i>E,E</i> , α -farneseno	1,49	0,87	1,45	2,06
γ -cadineno	2,15	2,30	2,41	2,12
δ -cadineno	6,36	6,06	5,19	4,71
Cubeneno	0,33	0,30	0,28	0,24
α -cadineno	0,36	0,38	0,37	0,21
α -calacoreno	0,45	0,46	0,33	0,16
<i>E</i> -nerolidol	12,46	20,42	11,47	11,70
Espatuleno	1,52	1,35	1,25	1,90
Óxido-cariofileno	4,46	4,32	3,52	3,97
1-epi-cubenol	0,59	1,42	1,17	1,28
epi- α -cadinol	1,21	1,93	1,66	1,39
Cubenol	0,81	0,69	0,60	0,58
α -muurolol	1,29	2,12	1,87	1,77
TOTAL	93,98	94,09	94,65	97,03

Tabela 51. Porcentagem média relativa (%) de todas as substâncias químicas identificadas no óleo essencial de folhas de *P. umbellata* da população de Barra do Turvo-SP em função da sazonalidade.

Substâncias	Sazonalidade			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
α -pineno	0,52	0,38	0,63	0,50
β -pineno	0,60	0,53	0,78	0,78
Decanal	0,13	0,03	0,03	0,19
δ -elemeno	1,13	0,85	1,54	1,19
α -cubebeno	1,14	0,70	1,28	1,38
Ciclosativeno	0,10	0,03	0,03	0,09
α -copaeno	2,34	1,33	1,87	2,18
β -cubebeno	0,28	0,07	0,17	0,22
β -elemeno	3,38	1,53	2,96	5,07
Octadecanal	0,03	0,03	0,03	0,20
<i>E</i> -cariofileno	18,66	11,59	11,81	11,22
β -gurjuneno	1,31	1,03	1,41	1,39
Aromadendreno	0,78	0,59	0,85	0,71
α -humuleno	1,52	0,98	1,27	1,32
cis-muuroala-4(14)-5 dieno	0,94	0,99	1,20	1,01
γ -muuroleno	2,88	2,25	2,92	2,83
Germacreno-D	13,91	12,71	21,43	20,54
β -selineno	1,79	0,90	1,39	2,38
cis- β -guaiano	0,03	1,41	0,56	0,36
α -selineno	9,34	6,11	10,71	11,65
α -muuroleno	0,85	0,74	0,24	0,80
<i>E,E</i> , α -farneseno	1,51	0,87	1,28	1,92
γ -cadineno	2,08	2,19	2,40	2,20
δ -cadineno	5,78	5,76	5,46	4,89
Cubeno	0,29	0,16	0,38	0,25
α -cadineno	0,34	0,35	0,39	0,27
α -calacoreno	0,34	0,47	0,31	0,15
<i>E</i> -nerolidol	12,23	23,51	10,73	10,47
Espatuleno	1,43	1,88	1,22	1,85
Óxido-cariofileno	4,54	5,45	3,60	3,67
1-epi-cubenol	1,42	1,84	1,25	1,42
epi- α -cadinol	1,50	2,39	1,79	1,50
Cubenol	0,61	0,95	0,69	0,65
α -muurolol	1,56	2,39	1,90	1,60
TOTAL	95,26	92,94	94,49	96,83

Apêndice 6. Dados meteorológicos de temperatura (máxima, mínima e média), precipitação, umidade relativa e radiação solar do período em que o experimento foi mantido em campo, coletados na Estação Meteorológica da UNESP-Botucatu/SP.

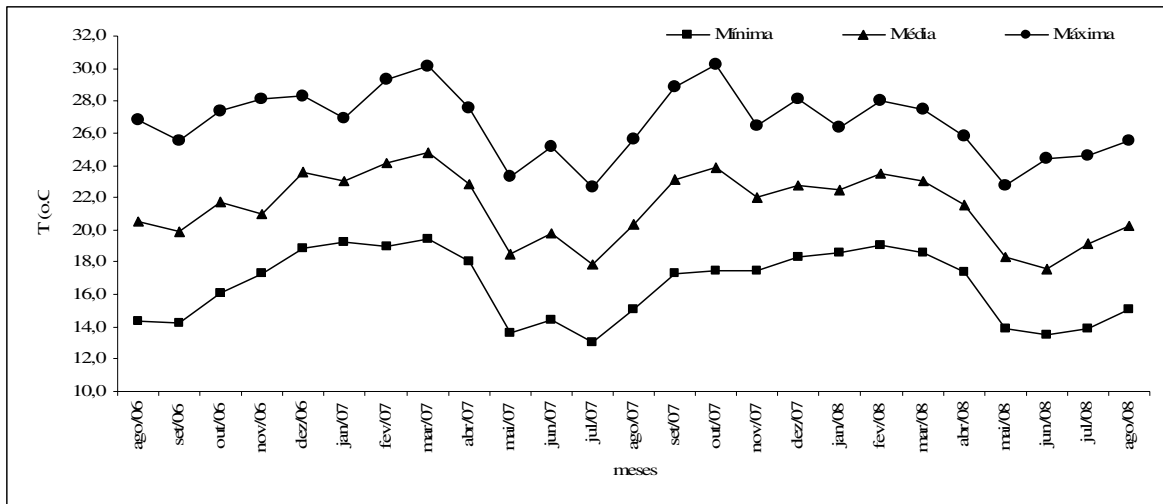


Figura 26. Temperaturas mínima, média e máxima registradas (C°) na Fazenda Experimental Lageado – UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008. Fonte: Estação Meteorológica da UNESP-Botucatu/SP.

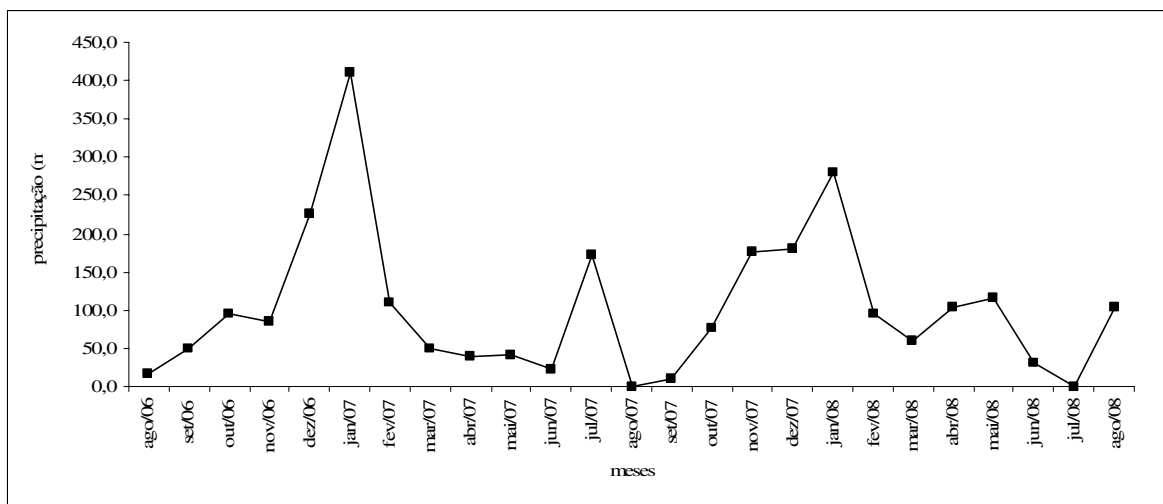


Figura 27. Precipitação pluviométrica (mm) registrada na Fazenda Experimental Lageado – UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008. Fonte: Estação Meteorológica da UNESP-Botucatu/SP.

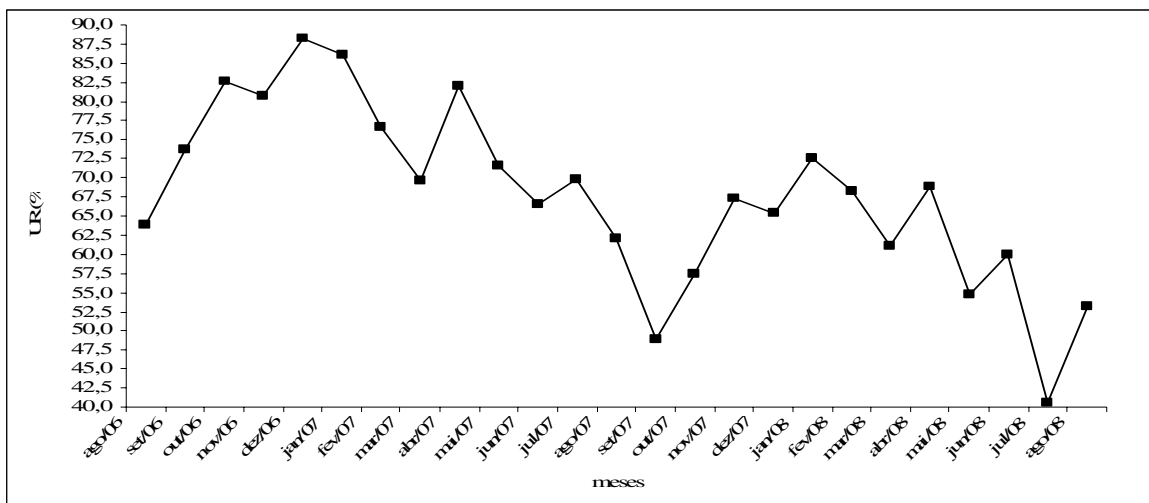


Figura 28. Umidade relativa (%) registrada na Fazenda Experimental Lageado – UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008. Fonte: Estação Meteorológica da UNESP-Botucatu/SP.

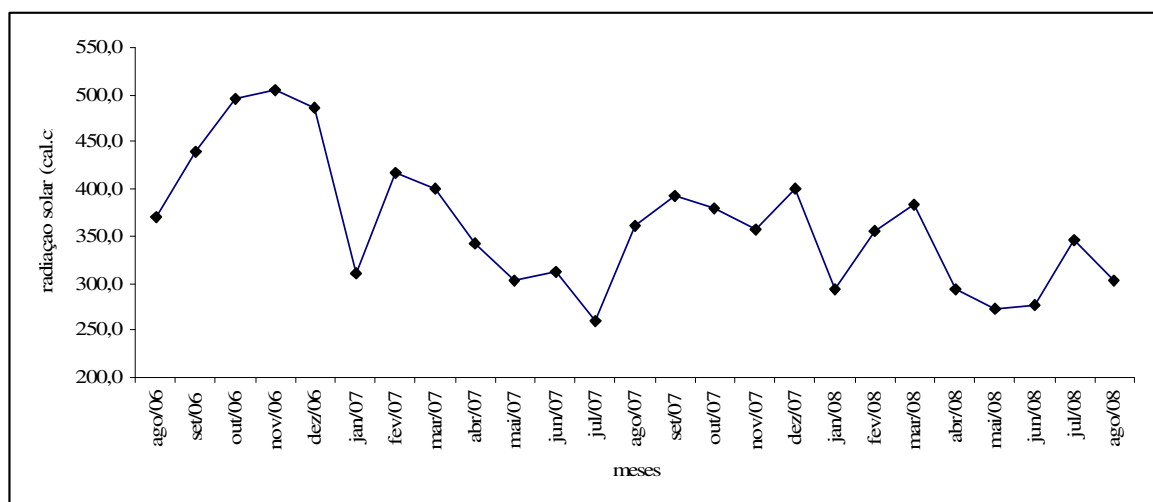


Figura 29. Radiação solar (cal.cm^{-2}) registrada na Fazenda Experimental Lageado - UNESP/Botucatu, durante o período de agosto de 2006 a agosto de 2008. Fonte: Estação Meteorológica da UNESP-Botucatu/SP.