



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



JORDANY APARECIDA DE OLIVEIRA GOMES

**ESTUDOS COMPLEMENTARES AO MANEJO DO ASSA-PEIXE (*Vernonia
polyanthes* Less.): FENOLOGIA, FITOQUÍMICA, HISTOQUÍMICA, ANATOMIA E
VARIAÇÃO SAZONAL EM POPULAÇÃO NATIVA**

**Botucatu
2017**

JORDANY APARECIDA DE OLIVEIRA GOMES

**ESTUDOS COMPLEMENTARES AO MANEJO DO ASSA-PEIXE (*Vernonia
polyanthes* Less.): FENOLOGIA, FITOQUÍMICA, HISTOQUÍMICA, ANATOMIA E
VARIAÇÃO SAZONAL EM POPULAÇÃO NATIVA**

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

Orientador: Filipe Pereira Giardini Bonfim

**Botucatu
2017**

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

G633e Gomes, Jordany Aparecida de Oliveira, 1988-
Estudos complementares ao manejo do assa-peixe
(*Vernonia polyanthes* Less.): fenologia, fitoquímica his-
toquímica, anatomia e variação sazonal em população na-
tiva / Jordany Aparecida de Oliveira Gomes. - Botucatu:
[s.n.] , 2017
88 p. : il., color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Filipe Pereira Giardini Bonfim
Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais. 2. Plantas - Anatomia. 3. Feno-
logia vegetal. 4. Variações sazonais. I. Bonfim , Filipe
Pereira Giardini. II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculda-
de de Ciências Agrônômicas. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte."

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDOS COMPLEMENTARES AO MANEJO DO ASSA-PEIXE (*Vernonia polyanthes* Less.): FENOLOGIA, FITOQUÍMICA, HISTOQUÍMICA, ANATOMIA E VARIAÇÃO SAZONAL EM POPULAÇÃO NATIVA

AUTORA: JORDANY APARECIDA DE OLIVEIRA GOMES

ORIENTADOR: FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM
Dep de Horticultura / Faculdade de Ciências Agrárias de Botucatu


Profa. Dra. MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA
Dep Botânica - Pós-Doutoranda / Instituto de Biociências de Botucatu


Profa. Dra. TATIANE MARIA RODRIGUES
Depto de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu


Dra. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES
Campinas-SP / Instituto Agronômico de Campinas


Profa. Dra. DÉBORA CRISTINA CASTELLANI
./ Deptº de Pesquisa & Desenvolvimento - Natura - Cajamar/SP

Botucatu, 21 de fevereiro de 2017.

Aos meus amados pais,

Amário e Paixão

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas e pelas bênçãos em minha vida.

Aos meus pais, Amário e Paixão, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos desta etapa.

Ao meu irmão, Amário Júnior, pelo carinho.

Aos meus avós, João e Joana, por serem pilares na minha vida, exemplos de amor e persistência.

Aos meus tios e primos, por me apoiarem, confiarem em mim e tornarem minha vida mais feliz.

Ao Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim pela confiança depositada em mim, pela orientação e a amizade;

À Profª Drª Tatiane Maria Rodrigues, pela disponibilidade em etapas imprescindível neste projeto;

À Profª Drª Márcia Ortiz, pela disponibilidade e aprendizado durante este estudo;

Ao Prof. Dr. Ernane Ronie Martins pelo apoio e ensinamentos ao longo da minha vida acadêmica.

À FCA/UNESP, Campus de Botucatu, Programa de Pós-graduação em Agronomia (Horticultura) docente e funcionários em especial aos funcionários do pomar e do Seu Lima e Moacir pela amizade;

A Veridiana Zocoler, Márcia Garcia, Roselaine, Ricardo Tozin e pela ajuda nas análises fitoquímicas e anatômicas;

Aos amigos, Daniela (C-nora), Nathália, Dayane, Sthefani, Lucas e Túlio, por todos os momentos de diversão e por se mostrarem sempre disponível para ajudar. Em especial C-nora pela ajuda em todas as etapas deste trabalho.

RESUMO

Vernonia polyanthes Less., conhecida popularmente como assa-peixe, possui propriedades farmacológicas, tais como anti-hipertensivo, diurético e broncodilatadora. A época em que a espécie medicinal é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e a qualidade dos constituintes ativos podem não ser constantes durante o ano. Torna-se importante estabelecer linhas de ação voltadas ao desenvolvimento de técnicas de manejo, visando à utilização desta espécie, aliada à manutenção do equilíbrio do ecossistema. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo de gerar informações para subsidiar o desenvolvimento de técnicas complementares ao manejo do assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.) para que seja explorada de forma mais eficiente, sustentável e segura. O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campus Botucatu. Quarenta indivíduos foram acompanhados durante 24 meses e registrado as fases fenológicas, segundo Fournie. Coletas foram realizadas nos períodos sazonais: outono, inverno, primavera e verão, com, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e cinco repetições. As variáveis analisadas foram: teor de óleo essencial, teor compostos fenólicos totais, variações na anatomia foliar e histoquímica. Estudou-se também tempo de extração de folhas caracterização do óleo essencial para a espécie. Verificou-se a correlação das fases fenológicas com as variáveis climáticas e além de serem observadas variações morfoanatômicas e fitoquímicas na *Vernonia polyanthes* Less nos diferentes estações e fases de desenvolvimento foliar. Conclui-se que, *V. polyanthes* possui ápices das fenofases reprodutivas no período de junho a setembro e vegetativa de outubro a maio, apresenta plasticidade anatômica e fitoquímica em resposta às variações sazonais. O tempo determinado para hidrodestilação foi de 106 minutos e o maior rendimento se dá no horário de 12h00min horas.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Vernonia polyanthes*, fitoquímica, fenologia, anatomia foliar.

ABSTRACT

Vernonia polyanthes Less., commonly known as assa-peixe, has pharmacological properties, such as antihypertensive, diuretic and bronchodilator. The time when a medicinal species is collected is one of the most important factors, since the quantity and quality of the active constituents are not constant during the year. It is important to establish lines of action aimed at the development of management techniques, aiming at the use of this species, together with the maintenance of the ecosystem equilibrium. In this way, the present study aimed to generate information to support the development of techniques complementary to the management of assa-fish (*Vernonia polyanthes* Less.) To be exploited more efficiently, sustainably and safely. The work was developed at the Fazenda Experimental Lageado, belonging to the Faculdade de Ciências Agronômicas of UNESP - Campus Botucatu. Forty individuals were followed up for 24 months and recorded phenological activities / phases, according to Fournie. Samples were collected in the seasonal periods: autumn, winter, spring and summer, with five replications, a completely randomized design (DIC) with four treatments. The analyzed variables were: essential oil content, phenolic compounds, variations in leaf anatomy and histochemistry. It was also studied time of extraction of leaves characterization of the essential oil for the species. The correlation of the phenological phases with the climatic variables was verified and besides morphological and phytochemical variations in *Vernonia polyanthes* Less were observed in the different seasons. It is concluded that, *V. polyanthes* has the apices of the reproductive phenophases from June to September and vegetative from October to May, presents anatomical and phytochemical plasticity in response to seasonal variations. The time for hydrodistillation was two hours. It is concluded that, *V. polyanthes* has the apices of the reproductive phenophases from June to September and vegetative from October to May, presents anatomical and phytochemical plasticity in response to seasonal variations. The time for hydrodistillation was 106 minutes and the highest income is given in the hour of 12h00min hours.

Key words: Medicinal plants, *Vernonia polyanthes*, phytochemistry, phenology, foliar anatomy.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Plantas Medicinais	18
2.2 Assa-peixe (<i>Vernonia polyanthes</i> Less) ASTERACEAE	19
2.3 Fenologia	22
2.4 Metabolismo Secundário e a influência dos fatores ambientais.....	23
2.4.1 Compostos Fenólicos	25
2.4.2 Terpenos	26
2.4.3 Alcaloides	27
2.4 Variações anatômicas e estruturas secretoras	28
CAPÍTULO 1: FENOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E FITOQUÍMICA DO ASSA-PEIXE (<i>Vernonia polyanthes</i> Less.) EM ÁREA DE CERRADO, BOTUCATU-SP, BRASIL	31
CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE HIDRODESTILAÇÃO, HORÁRIO DE COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Vernonia polyanthes</i> Less.	65
3. CONCLUSÃO GERAL.....	81
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

Plantas com princípio medicinal podem ser definidas como aquela que, nativa ou cultivada, tem seu uso relacionado com fins medicinais, terapêuticos e de cura (OMS, 2003). Estas espécies possuem ação farmacológica comprovada e esse efeito está relacionado aos princípios ativos conhecidos, fornecendo eventualmente matéria-prima para a indústria farmacêutica (RIZZINI & MORS, 1995).

O saber acerca das plantas medicinais significa na maioria das vezes que esse conhecimento é o único meio que algumas pessoas encontram para ter acesso a tratamento para uma gama de enfermidades. Esse uso, muito presente ainda hoje em comunidades carentes e povos tradicionais, é relatada na história da humanidade desde 2600 a.C (AMOROZO,1988; PRANCE, 1992).

O depoimento mais antigo relatado do uso de espécies medicinais são restos de pólen num jazigo arqueológico em Shanidar, com aproximadamente 60 mil anos (época do Homem de Neanderthal) (LIETAVA, 1992 apud BONET, 1998). No Brasil, à aproximadamente 50 mil anos em sítios arqueológicos no Parque Nacional da Serra da Capivara em Joinville e em São Raimundo Nonato no Piauí, foram encontrados vestígios de atividades humanas. Tradição Nordeste (cultura humana mais antiga relatada) com data de 12 mil a 7 mil/ 6 mil a.P (antes do presente, tendo como base o anos de 1950 como referencial para o cálculo) foram encontradas evidências de pinturas rupestres, infestações por parasitas, além de grão de pólen associados a atividade terapêutica (TEIXEIRA-SANTOS,2010).

Esse uso terapêutico é atribuído a uma diversidade de espécies vegetais, dentre elas destaca-se o assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less) que faz parte da Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) a partir do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006 a, b). É conhecida popularmente por assa-peixe, assa-peixe branco, estaca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu, cambará-do-branco, erva-preá e enxuga; perenes, e comum nos cerrados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais (ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1984), é caracterizada por propriedades farmacológicas, tais como anti-hipertensivo e diurético (SILVEIRA et al. 2003 a; SILVEIRA et al. 2003 b),

antiulcerogênica (BARBASTEFANO et al., 2007), antifúngica e leishmanicida (BRAGA et al., 2006) e antimicrobiano (OLIVEIRA et al., 2007).

Apesar da diversidade de usos, ainda se sabe pouco sobre o cultivo e a domesticação da espécie. Nesse ponto, os estudos da fenologia e de técnicas de domesticação contribuem para auxiliar a elucidar o problema.

Na literatura observa-se uma série de trabalhos que caracterizam a fenologia das vegetações savânicas (MONASTERIO & SARMIENTO 1976, BATALHA et al. 1997, PIRANI et al. 2009, SILVA et al. 2011). Entretanto, os estudos que apresentam informações, baseadas em vários anos de observações, que englobem possíveis variações entre anos para as espécies são limitados.

Por se tratar de uma espécie oriunda do Cerrado brasileiro e este bioma, nos últimos 30 anos ter sofrido forte pressão pela ação da expansão da fronteira agrícola, além da exploração predatória do material vegetal lenhoso para produção de carvão (BRASIL,2016), estudos de natureza fenológica são de extrema importância pois contribuem no entendimento do processo de reprodução, melhoramento genético, coleta de material para droga vegetal, etc; que auxiliarão na determinação das técnicas de cultivo (PEREIRA et al,2008).

Espécies de cerrado, sob climas estacionais, demonstram variações na sazonalidade no que se refere à produção de folhas, flores e frutos, o que determina adaptações a fatores bióticos e abióticos (VAN SCHAIK et al. 1993). Estas adaptações estão ligadas a características funcionais ou estruturais, as quais são analisadas pela fenologia. Apesar disso, alguns pesquisadores defendem que a limitação sazonal do período de floração e os eventos fenológicos são estabelecidos filogeneticamente, ou seja, por restrições filogenéticas e vigorosamente induzidos pela forma de vida, sendo independente de fatores bióticos ou abióticos como a precipitação (WRIGHT & CALDERON 1995).

Para o manejo das espécies medicinais, uma etapa importante é a época de coleta do material que corresponde à fase onde a quantidade e, muitas vezes, a natureza dos compostos bioativos pode variar durante o ano. Na literatura existem diversos relatos da interação da variação sazonal e das fases fenológicas com a produção de praticamente todas as classes de substâncias secundárias, tais como ácidos fenólicos, terpenos, cumarinas, flavonoides, alcaloides, entre outros (SCHOWOB et al,2004; PITAREVIC et al, 1984; ZIDORN E STUPPNER,2001;

GRACE et al,1998; BROOKS E FEENY,2004; WILT E MILLER,1992; JALAL et al, 1982).

Outra etapa importante para otimizar a obtenção de princípio ativo pode ser realizado de maneira criteriosa seguindo as etapas de planos de manejo já existentes ou trabalhando no desenvolvimento ou aperfeiçoamento destas técnicas. Algumas dessas etapas são horário de coleta do órgão de interesse, técnicas de extração do metabólito secundário e tempo de hidrodestilação.

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo de gerar informações para subsidiar o desenvolvimento de técnicas complementares ao manejo do assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.) para que seja explorada de forma mais eficiente, sustentável e segura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O primeiro relato documentado do uso de espécies medicinais com a finalidade terapêutica data da idade da Pedra Lascada. Na Mesopotâmia, entre os povos sumérios encontrou-se o primeiro documento de cunho médico escrito (3000-1900 a.C), descrito em uma tabua de argila no qual consta a informação do uso de diversas plantas. Entre elas podemos citar o açafrão (*Crotus sativus* L.), a canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyne), mandrágora (*Mandragora officinarum* L.), mirra (*Commiphora myrrha* L.) entre outras (DIAS, 2016; CARVALHO, 2004; CUNHA, 2007; LOPES, 2004).

Nas civilizações seguintes, os babilônicos, a prática da medicina com o uso de espécies medicinais, ficava a cargo do rei Assurbanipal que deixou relatos sobre os usos da mirra (*Commiphora myrrha* L.), que posteriormente ganhou notoriedade pelos séculos seguintes, até chegar ao cristianismo (LOPES, 2004).

No Egito antigo, a relação do homem com essas espécies, está em evidências de restos de grãos de pólen de plantas aromáticas. Essas espécies desempenharam papel fundamental nessa civilização, pois eram cremadas em altares de divindades. O odor agradável era enviado como pedido de proteção aos deuses. Já a cremação de odores desagradáveis, usava-se para espantar animais ou deuses maléficos. Algumas espécies utilizadas pelos egípcios eram: cebola (*Allium cepa* L.), anis (*Pimpinella anisum* L.), incenso (*Pittosporum undulatum* Vent.), entre outras (CUNHA, 2007).

O povo grego recebeu como herança dos persas muitos produtos aromáticos, como os relatados por Teofrasto (século VI) no Tratado dos odores, onde chamava a atenção à função terapêutica dos perfumes (CUNHA, 2007). Na Idade Média, as plantas foram um divisor de águas, porque qualquer tipo de utilização dessas espécies era considerado magia, pois era uma prática que diretamente ameaçava a classe médica das Universidades que estavam surgindo no feudalismo (MURARO, 1991).

No Brasil, a ocorrência dos usos é datada de aproximadamente 50 mil anos. Padre Anchieta, fazia diversos convites a companheiros de Portugal para se tratarem no Brasil com o dizer de “a terra é muito boa e ficareis mui sãos”. (RODRIGUES, 1934). A história prossegue com o uso de várias espécies nativas da

flora brasileira, receitas pelo médico Guilherme Piso (1661-1678) para tratar uma série de enfermidades. Piso foi empenhado na apropriação do conhecimento dos índios, pois estes desprezavam os medicamentos das boticas para se tratarem com as plantas da região (TAUNAY, 1948). A grande contribuição dos índios à farmacoterapia foi com a indicação do barbatimão (*Stryphnodedron barbadetiman* (Vell.) Mar.), cacau (*Theobroma cacao* L.), gervão (*Stachytarpheta australis* Moldenke), guaraná (*Paullinia cupana* var *sorbilis* Ducke), entre outras (MARTIUS, 1979).

A etnofarmacobotânica, na história da medicina popular no Brasil foi o elo para o conhecimento deixado pelos portugueses, onde as plantas provindas das mais diversas regiões atravessaram séculos e se juntaram às espécies da flora nativa e hoje fazem parte do gama de espécies medicinais que são utilizadas para tratamento e cura de diversos males (CAMARGO, 2014).

2.2 Assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.) - ASTERACEAE

A família Asteraceae, anteriormente denominada Compositae, é a mais numerosa dentro das Angiospermas, compreende aproximadamente 1100 gêneros e 25000 espécies e representa 10 % das espécies vegetais do mundo (VERDI et al., 2005; MAIA et al., 2010). Esta família é a segunda em número de representantes de espécies no Cerrado brasileiro (MENDOÇA et al., 1998). São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (HEYWOOD, 1993).

A denominação Áster vem do grego e faz referencia a suas estruturas florais que se apresentam na forma de estrelas (BREMER, 1994). Os frutos desta família normalmente apresentam pápus persistente e transformado em uma estrutura de dispersão, sendo a anemocoria (dispersão pelo vento) e a zoocoria (dispersão pelos animais) formas mais significativa de dispersão (HEIDEN et al., 2007). Espécies desta família estão sendo bastante estudadas nos últimos 25 anos, não somente quanto a anatomia, morfologia e ecologia, porém estão tendo enfoque na fitoquímica, citogenética e estrutura macromolecular. Com isso, algumas dessas espécies têm sido bases para obtenção e criação de novos fármacos e inseticidas (NAKAJIMA; SEMIR, 2001; NIJS; MENKEN, 1996).

O gênero *Vernonia*, um dos maiores e mais importante da família Asteraceae, possui aproximadamente 1.500 espécies distribuídas especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo a África e a América do Sul, os principais centros de dispersão (MIZERES et al., 1996). É um dos mais complexos gêneros ponto de vista da taxonomia por causa da alta diversidade das suas formas biológicas da família Asteraceae do (DEMATTEIS e FERNÁNDEZ, 2000; OLIVEIRA et al., 2007). Recebeu este nome em homenagem a Will Vernon, pesquisador botânico (CABRERA; KLEIN, 1980). Estudos mostram que o gênero *Vernonia* é rico em sesquiterpenos, lactonas e glicosídeos com muitas atividades biológicas (LIU et al., 2007). Geralmente, plantas deste gênero são ricas em glândulas oleíferas e muitos dos seus óleos essenciais apresentam atividades biológicas, como antimicrobiana e inseticida (VAGIONAS et al., 2007).

Destaca-se dentro deste gênero a *Vernonia polyanthes* Less., conhecida popularmente por assa-peixe, cambará-guassu, estanca-sangue, tramanhém, cambará branco, enxuga, erva-preá e assa-peixe-branco (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1984; LORENZI & MATOS, 2002) é citada com frequência em levantamentos etnobotânicos de plantas medicinais. Na região do cerrado do Mato Grosso (BR), é usada como medicinal, sendo denominada por cafera (NETO & MORAIS, 2003).

Arbusto grande ou arvoreta, perene, ereto, pouco ramificado, rizomatoso, de caules pubescentes de coloração acinzentada, 1-3 m de altura. Suas folhas são simples, ásperas na face ventral e pilosas na dorsal, curtamente pecioladas, lanceoladas de margem serrilhada, base atenuada e ápice agudo, possuem cerca de 10-24 cm de comprimento e 3 cm de largura (Figura 1). A lâmina foliar possui como características anatômicas ser dorsiventral, com tricomas em ambas as faces. Pela face adaxial, a epiderme é uni estratificada e nela são encontrados, junto às células comuns e estômatos, tricomas simples, pluricelulares, com número variável de células situadas, em geral sobre as nervuras. Os tricomas caracterizam por apresentarem de células situadas, em feral nas nervuras. Os tricomas caracterizam-se por apresentarem células com diferentes gruas de espessamento. As flores esbranquiçadas, melíferas, reunidas em pequenos dispostas em panículas terminais, são as principais características desta espécie (LORENZI & MATOS, 2008).

De acordo Lorenzi e Matos (2008) a espécie possui alcaloide, glicosídeos, flavonoides e óleos essenciais em sua composição fitoquímica. Estudo realizado com a espécie *V. polyanthes* no estado do Espírito Santo caracterizaram o óleo essencial da espécie como de coloração amarelo-claro. A espécie apresenta variação no rendimento do óleo essencial nas diferentes partes frescas da planta, sendo que as folhas possui rendimento de 0,23%, nas flores de 0,01% e na raiz de 0,02% (ANDREA et al. 2003).

V. polyanthes possui propriedades farmacológicas, tais como anti-hipertensivo e diurético (SILVEIRA et al. 2003 a; SILVEIRA et al. 2003 b), antiulcerogênica (BARBASTEFANO et al., 2007), antifúngica e leishmanicida (BRAGA et al., 2006) e antimicrobiano (OLIVEIRA et al., 2007). Na região do alto Rio Grande, Minas Gerais, o decocto ou infusão de toda a planta é utilizado como antifebril, contusões, hemorragias e infecções do útero, em bronquites, gripes, resfriados e tosse (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Segundo Lorenzi & Matos (2008), as folhas e raízes dessa espécie são usadas para a eliminação de cálculos renais, na forma de compressa têm efeito antirreumático e na forma de chá, conferem melhora considerável em tosse persistentes.

Figura 1- *Vernonia polyanthes* Less. – Botucatu, SP. Março de 2015.

Fonte: A autora



2.3 Fenologia

A fenologia é responsável pela caracterização do desenvolvimento e reprodução de uma espécie num determinado período, e a relação dessas variáveis com o meio ambiente (FOURNIER, 1974; LIETH; SCHULTZ, 1976; SILVA; SANTOS, 2008). O desenvolvimento de pesquisas nessa área, são de suma importância, pois apresentam o estudo das fenofases, bem como a frequência e intensidade de cada uma delas e sua interação com fatores abióticos ou bióticos (NEWSTROM et al., 1994; ALMEIDA; ALVES, 2000; SANMARTIN-GAJARDO; MORELLATO, 2003; RAMOS; SANTOS, 2005; NEVES et al., 2010).

Os estudos para entender as fenofases de uma espécie no seu habitat natural, estão ligados a estudos ecológicos que se relacionem com a biodiversidade, produtividade e programas de conservação de recurso genético (MOONEY et al, 1980; CAMACHO & OROZCO, 1998). O comportamento fenológico da vegetação influencia também na diversidade de herbívoros, pois ficam dependentes do desenvolvimento sazonal das espécies o que pode comprometer sua alimentação (STRONG et al, 1984). Os insetos precisam localizar sua fonte de alimento, e está deve ser coincidente com a fase do vegetal onde os tecidos estão disponíveis, pois a diversidade de insetos estão diretamente relacionada a produtividade e riqueza das espécies (KERSALAKE e HARTLEY, 1997; YUKAWA, 2000; SIEMANN et al, 1998).

Castellani e colaboradores (1999) descreveram os padrões de floração, frutificação, brotamento e germinação de 34 espécies da duna frontal da Joaquina e concluíram que a diminuição da temperatura limita a floração e que o estresse hídrico pode afetar as demais fenofases analisadas.

A variação nos padrões fenológicos pode mudar devido à idade, habitat, se a flor é feminina; masculina ou hermafrodita, altura, largura; pois espécies tropicais são classificadas como heterogênea para as fenofases (NEWSTROM et al., 1994). Os efeitos abióticos relatados por Carvalho e colaboradores (2007), demonstraram que as variações na química foliar de espécies do Cerrado são decorrentes da sazonalidade o que destaca a importância desse fator nas diferentes fases da planta.

Em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham) observou-se comportamento caducifólio, com alta taxa de queda foliar durante grande parte do ano, a floração

ocorre no período de fevereiro a abril, enquanto a frutificação alcançou o pico de intensidade no mês de maio. Todas as fenofases apresentaram altos índices de sincronia (CARVALHO JÚNIOR, 2011). Em *Bidens segetum* (picão-do-mato) e *Baccharis trimera* (carqueja) a fase de floração tem ocorrência no período seco. A frutificação da maioria das populações de *Baccharis trimera* estudadas apresenta sincronia e coincidem com o final do período seco e começo do chuvoso em área do cerrado (LELIS, 2008; SOUSA et al., 2014). *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (mamacadela) possui fenofases sincrônicas, o crescimento é periódico e sazonal e correlacionado positivamente com a precipitação. Em área de cerrado em Mato Grosso, o período mais adequado para a coleta de frutos de *B. gaudichaudii* é de outubro a dezembro (FARIA et al., 2015).

Em população de *Cybistax antisyphilitica* (ipê-verde), ocorrente na região de cerrado, foi observada elevada sincronia dentro de cada fenofase e padrão fenológico sazonal com ciclos anuais. O brotamento ocorreu no final da estação seca, logo após a queda de folhas, que ocorreu ao longo do período seco, a floração ocorreu no início das chuvas, logo após os eventos vegetativos. A deiscência dos frutos e a dispersão das sementes ocorreram no final da estação seca. Em geral, as fenofases correlacionaram-se com a umidade, temperatura e pluviosidade. Entretanto, afinidades filogenéticas e interações com polinizadores e dispersores também podem atuar no comportamento fenológico de *C. antisyphilitica* (GUILHERME et al., 2011).

2.4 Metabolismo Secundário e a influência dos fatores ambientais

Uma das principais características dos seres vivos é a atividade metabólica, sendo assim, o metabolismo é definido como um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. Nos vegetais, o metabolismo está dividido em dois tipos: o metabolismo primário e o secundário ou especializado (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os compostos químicos que são formados, degradados ou transformados recebem o nome de metabólitos (SIMÕES et al., 2010) (Figura 2).

Buchanan et al. (2000) definiram os metabólitos primários como compostos que participam da nutrição e dos processos metabólicos essenciais, enquanto os metabólitos secundários são aqueles que influenciam nas interações ecológicas

entre plantas e o ambiente. Através da fotossíntese, as plantas utilizam a energia solar para a produção de compostos orgânicos que são precursores dos metabólitos secundários (CASTRO et al., 2004). Estes são classificados com base em suas vias biossintética e nos principais grupos: os compostos nitrogenados, os terpenos e compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2013) (Figura 2).

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH et al, 1987; HARTMANN, 1996). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

A água exerce influência em diversos processos, como a assimilação de CO₂, transpiração, expansão foliar e partição de fotoassimilados para órgãos do vegetal. A redução da quantidade de água disponível a planta leva ao aumento da atividade das enzimas hidrolíticas e à diminuição da intensidade fotossintética o que induz respostas metabólicas, acúmulo de solutos e substâncias antioxidante e expressão de genes específicos de estresse (SINGH-SANGWAN et al., 1994). Em condições de baixa disponibilidade de água no solo, vários processos metabólicos nas plantas podem ser influenciados, como o fechamento estomático, o declínio na taxa de crescimento, o acúmulo de solutos e antioxidantes e a expressão de genes específicos de estresse (SINGH SANGWAN et al., 1994; SILVA; CASALI,2000). A consequência da seca no teor dos metabólitos especializados depende do nível de estresse e da duração do mesmo, sendo que um período curto de estresse hídrico pode levar a uma maior produção e quando o período é prolongado ocorre a redução (GOBO-NETO; LOPES, 2007). O aumento da síntese de metabólitos secundários pode ser explicado como resultado da diminuição do CO₂ interno, diminuição da atividade do ciclo de Calvin e aumento da oferta de agentes redutores (NADPH) para as vias metabólicas secundárias de síntese de isoprenóides, fenóis ou alcalóides (SELMAR; KLEINWACHTER, 2013).

Mudanças na temperatura podem influenciar a fisiologia dos vegetais. Temperaturas altas diminuem a condutância estomática e consequentemente reduz a fotossíntese, o crescimento das plantas. Afetam também a produção de

metabólitos secundários, pois fotosistema II apresentando diminuição na eficiência fotoquímica causando aumento no estresse nas plantas (VERMA; SUKLA, 2015). Baixas temperaturas (<20°C) afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas, limita significativamente a produtividade. As temperaturas baixas reduzem diretamente as reações metabólicas e indiretamente a absorção de água e a desidratação celular impede a expressão do potencial genético (CHINNUSAMY et al., 2007; KOC et al., 2010).

A principal enzima relacionada a resposta do metabolismo secundário é a fenilalanina amônia-liase (FAL) responsável pelas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas. A FAL já foi isolada de algas, fungos e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

2.4.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas básicas são: a rota do ácido malônico e a do ácido chiquímico, sendo esta última participante na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2013). Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Possuem estrutura variável e por isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, coumarinas, taninos, ligninas entre outros (SHAHIDI; NACZK, 1995). Existem dois grupos desses compostos: os flavonoides e os não flavonoides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (SILVA et al., 2013). Alguns compostos fenólicos são acumulados, especialmente, nos tecidos

superficiais, e as plantas os utilizam como filtros UV, pois esses metabólitos absorvem a radiação UV-B sem influenciar na radiação fotossinteticamente ativa (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae apresenta variação da composição química associada a fatores ambientais e fenológicos, havendo aumento no teor de flavonoides glicosado e diminuição dos flavonoides agliconas na fase pós-frutificação e com aumento da disponibilidade hídrica (COUTINHO et al., 2009). Os teores de quinonas das folhas foram maiores nos períodos mais quentes de coleta (verão e outono), enquanto os teores de flavonoides foram semelhantes nos quatro períodos de coleta em folhas de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae (CARDOSO et al., 2010). Segundo Pimpão (2009), os valores mais elevados de fenóis totais e de flavonoides foram atingidos nos meses de Novembro e Dezembro, enquanto os valores mais elevados de atividade antioxidante foram registados nos meses de Maio/Junho e Agosto/Setembro em espécies *Juniperus*.

2.4.2 Terpenos

Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou MEP (no cloroplasto) (ALVES, 2001; PERES, 2016). A classificação dos terpenos pode ser feita de acordo com o número de unidades de isopreno que vão se ligando entre si, orientadas em sentido inverso (cabeça-cauda) podendo ser: hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoides (C20), triterpenoides (C30) e carotenoides (C40) (PERES, 2016; OLIVEIRA et al., 2003). O isopreno (IP) é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. As unidades bioquimicamente ativas de isopreno são na realidade o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) (NIERO; MALHEIROS, 2007). Os monoterpenoides (C10) são compostos por duas unidades de isopreno. Devido a seu baixo peso molecular, são voláteis, sendo, portanto os constituintes dos óleos essenciais e das essências voláteis, atuando principalmente na atração de polinizadores. Os monoterpenos podem ser isolados através de destilação ou extração e atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenoides naturais

(OLIVEIRA et al., 2003). Fazem parte deste grupo os constituintes dos óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitorreguladores são terpenos.

Em estudo realizado com *Cymbopogon citratus* (DC.) Stap observou que os elevados teores de óleo essencial no período da manhã, em épocas de temperaturas e umidades elevadas, sendo que a época de colheita, variação climática e condições de cultivo influenciam na quantidade de óleo essencial (SANTOS et al., 2009). De acordo com Cerqueira et al (2009) a variação sazonal influencia na composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae), sendo o regime de chuvas crucial para esta variável. Para as espécies de menta (*Mentha x piperita* L., *M. suaveolens*, *M. spicata* L., *M. aquatica* L. e *M. arvensis* L.) é verificado queda no rendimento de óleo essencial no mês de junho, visto que este rendimento no verão é o dobro que o verificado no inverno (DESCHAMPS et al., 2008).

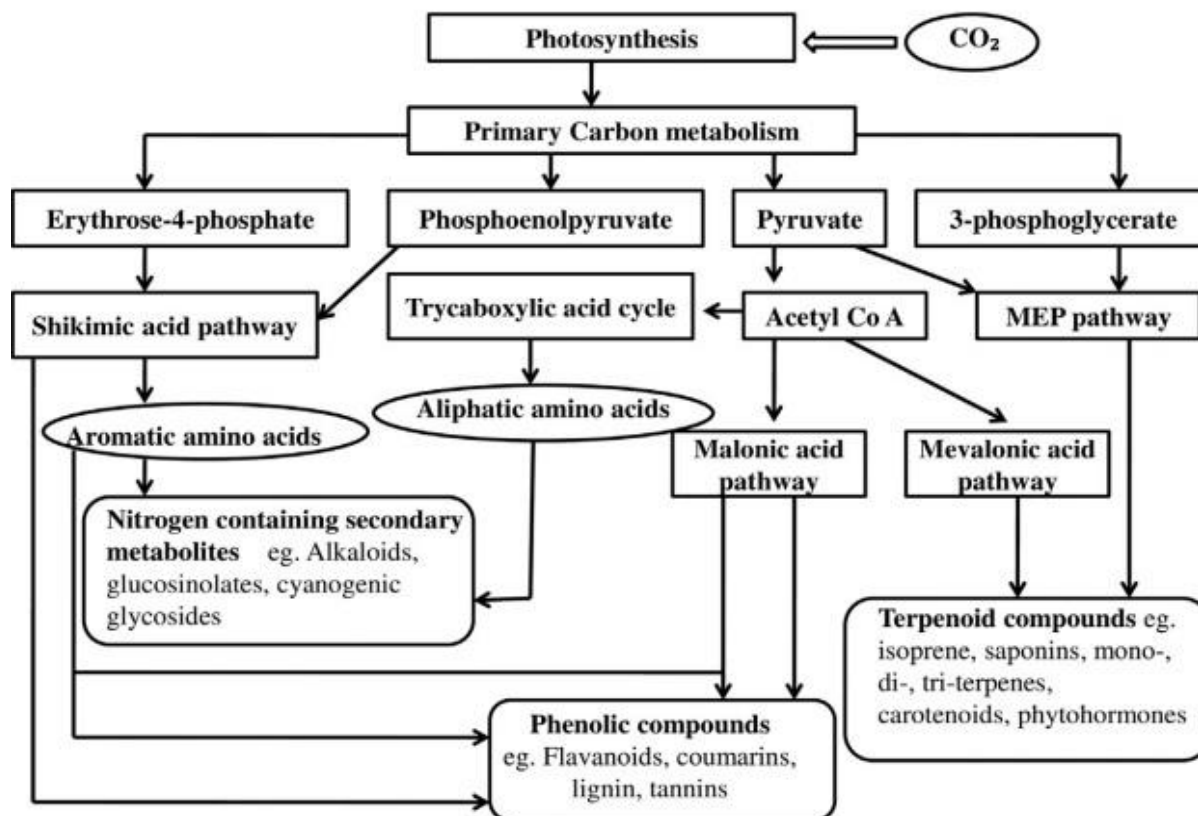
2.4.3 Alcaloides

A definição mais aceita para alcalóides é a descrita por Pelletier (1983) que diz que um alcaloide é uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio (N) em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) e possui como representantes: nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2016). São compostos farmacologicamente ativos e encontrados predominantemente em angiospermas (SIMÕES et al., 2010). Essa classe de compostos é conhecida pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos. (PERES, 2016).

Os alcaloides milonina, warifteína e metilwarifteína apresentaram diminuição entre os meses de fevereiro e abril, período de frutificação da espécie *Cissampelos sympodialis* (MARINHO, 2011).

Figura 2- Esquema geral da biossíntese do metabolismo secundário em plantas

Fonte: Verma e Shukla, 2015.



3.5 Variações anatômicas e estruturas secretoras

A anatomia é uma área de fundamental importância para qualquer estudo na área vegetal, pois a estrutura da planta e seus mecanismos de defesa são métodos que delimitam a sobrevivência da espécie em seu ambiente (ISOBE, 2012).

Fatores como luz, temperatura, água e condições edáficas são alguns componentes do meio que influenciam, de maneira decisiva, o desenvolvimento da vegetação. Dentre esses fatores, a luz, especialmente nos planos qualitativo e quantitativo, age regulando vários processos do desenvolvimento, como a taxa de fotossíntese, biossíntese de pigmentos, assimilação de nitrogênio e anatomia foliar, entre outros processos (FERREIRA et al., 1977; SCHLUTER et al., 2003). Adaptações de plantas da mesma espécie aos diferentes habitats estão associadas a características fisiológicas e morfológicas distintas (LARCHER, 2000). A idade e o

desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Quando submetidas a qualquer prática de manejo, as plantas devem receber atenção, ao passo que o vegetal está dinamicamente relacionado ao ambiente em que se encontra. Como exemplos dessas interações pode-se citar a quantidade de radiação e fotoperíodo os quais causam interferência na estrutura anatômica das folhas, modificando a espessura de parênquima, cutícula, aumento ou diminuição do número de estômatos, espaçamento entre células, entre outras características (SILVA et al., 2005; VENTRELLA, 2000).

Fatores ambientais influenciam diretamente a anatomia foliar, sendo que a condição hídrica é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento foliar (CASTRO et al., 2009) e a anatomia foliar se destaca nas relações com a produção vegetal (SILVA et al., 2005).

Além dos nutrientes minerais outras características como por exemplo, das condições do solo, da água, da luz, da temperatura, exercem influência sobre as características estruturais do vegetal. Por exemplo, plantas do mediterrâneo são submetidas a estresse de seca e calor durante o verão. Essas condições influenciam no desenvolvimento e produtividade das plantas cultivadas. Muitas plantas dessa região, por mutações adquiriram mecanismos morfológicos e fisiológicos que possibilitaram sua sobrevivência. Esses mecanismos compreendem, na folha, principalmente, a redução do tamanho, capacidade de enrolamento, alta densidade de tricomas, estômatos profundos, acúmulo de mucilagem e outros metabólitos secundários e aumento da compactação do mesofilo (BOSABALIDIS & KOFIDIS 2002).

A anatomia vegetal pode indicar características que atribuem tolerância a diferentes condições ambientais para os vegetais, como tolerância ao déficit hídrico (BATISTA et al., 2010; GRISI et al., 2008) e características da radiação, tais como a qualidade e intensidade da radiação que incidem sobre as folhas das plantas (SANTIAGO et al., 2001) ou mesmo demais estresses (SOUZA et al., 2007; SOUZA et al., 2010) promovendo modificações na espessura do mesofilo, nos tecidos vasculares, na espessura da epiderme, na espessura da cutícula, na densidade e demais características estomáticas para a tolerância a essas condições.

Os aspectos histológicos, tais como presença e ausência de tricomas, tamanho e forma dos mesmos, ocorrência e posição das células, a organização das células epidérmicas, orientação das nervuras, tipos de estômatos podem ser utilizados na identificação de espécies no geral (SILVA et al., 2005).

Nas plantas, a secreção compreende os complexos processos de formação – podendo incluir a síntese e isolamento de determinadas substâncias específicas em compartimentos do protoplasto da célula secretora e posterior liberação para espaços intercelulares ou para a superfície externa do corpo do vegetal. As estruturas secretoras podem ser individualizadas, como os idioblastos, ou serem multicelulares e de diferentes formas como os tricomas, emergências, cavidades, bolsas, ductos e canais (CASTRO; MACHADO 2006).

As secreções das plantas são sintetizadas ou simplesmente armazenadas e eliminadas em células especializadas, que ocorrem em isoladas (idioblastos secretores) ou que constituem estruturas glandulares altamente diferenciadas (tricomas, emergências, bolsas, canais e laticíferos). É extremamente ampla a diversidade morfológica de qualquer destas estruturas, não existindo geralmente nenhum tipo de relação entre a morfologia e a secreção produzida (FAHN 1990; MATCALFE; CHALK 1983; DICKISON, 2000).

Em funcho (*Foeniculum vulgare*) foi detectado por Sousa e colaboradores (2005) que ductos secretores, o teor de óleo essencial e os constituintes químicos estão relacionados a fatores sazonais e dependentes dos estádios fenológico da planta.

CAPÍTULO 1

FENOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E FITOQUÍMICA DO ASSA-PEIXE (*Vernonia polyanthes* Less.) EM ÁREA DE CERRADO, BOTUCATU-SP, BRASIL

Autora: Jordany Aparecida de Oliveira Gomes

RESUMO

Vernonia polyanthes Less. destaca-se como uma das plantas de interesse ao SUS. Conhecida como assa-peixe ou mata-pato, possui propriedades terapêuticas tais como anti-hipertensivo e diurético, antiulcerogênica, antifúngica, leishmanicida e antimicrobiano. A compreensão do ciclo de vida da espécie pode viabilizar informações para programas de manejo e conservação de recursos genéticos, como melhor período para coleta de frutos e sementes para produção de mudas, época de maior desenvolvimento vegetativo. Além disso, a importância de se correlacionar estas fases fenológicas com as variáveis climáticas, a morfoestruturura foliar e fitoquímica. Diante do exposto, o estudo teve como objetivo descrever o comportamento fenológico de *V. polyanthes*, em área de Cerrado, procurando subsidiar o processo de domesticação da espécie, por meio do estudo da ocorrência e duração das fenofases vegetativas e reprodutivas da espécie, bem como verificar a influência das variáveis climáticas do local em cada fenofase, e ainda avaliar a sincronia dessas fenofases entre os indivíduos. Além de se conhecer a variação fitoquímica e anatômica da espécie nestas fases. Quarenta indivíduos foram avaliados mensalmente no período de agosto de 2014 a agosto de 2016, quanto à intensidade e sincronia das fenofases de brotamento, folhas maduras, senescência foliar, queda foliar floração e frutificação. Para estudos anatômicos e fitoquímicos foram selecionados dez indivíduos semelhantes para as análises destes parâmetros. A espécie estudada apresentou comportamento fenológico cíclico sazonal com periodicidade anual, sendo que a sincronia entre os indivíduos avaliados ao longo dos 24 meses foi elevada. Este um fator é um facilitador do manejo da espécie. A temperatura média foi o fator abiótico que mais influenciou as fenofases. O assa-peixe apresentou a floração no período de junho a agosto, enquanto a frutificação alcançou o pico de intensidade no mês de outubro. A espécie apresenta crescente aumento nos teores de compostos fenólicos e óleo essencial com o

desenvolvimento das folhas. O perfil do seu óleo essencial não foi alterado com as fases de desenvolvimento, no entanto, compostos apresentaram diferença em suas proporções relativas, variando como majoritário o germacreno-D, trans-cariofileno e espatulenol. As avaliações anatômicas mostraram que o desenvolvimento inicial de tecidos cerca de 75% do que a planta vai apresentar quando a folha já estiver em fase de senescência.

Palavras-chaves: fenofases, assa-peixe, variações climáticas, sincronia.

SUMMARY

Vernonia polyanthes Less. stands out as one of the plants of interest to the SUS. Known as assa-peixe or mata-pasto, has therapeutic properties such as antihypertensive and diuretic, antiulcerogenic properties, antifungal, and antimicrobial leishmanicida. Understanding the life cycle of the species can enable information to management programs and conservation of genetic resources, as the best period for gathering fruits and seeds to seedling production, the time of greatest vegetative development. In addition, the importance of correlating phenological stages with climatic variables, the leaf morfoestrurura and phytochemistry. On the above, the study aimed to describe the behavior of phenological v. polyanthes in Cerrado area, looking for subsidizing the process of domestication of the species through the study of the occurrence and duration of reproductive and vegetative phenophases of species, as well as verify the influence of climatic variables on each fenofase, and also evaluate the timing of these phenophases between individuals. In addition to knowing the phytochemical and anatomical variation of the species in these stages. 40 individuals were evaluated monthly in August 2014 period to August 2016, about the intensity and timing of the budding phenophases, mature leaves, leaf senescence, leaf fall flowering and fruiting. For anatomical studies and phytochemicals have been selected ten individuals similar to the analyses of these parameters. The species studied showed phenological behavior seasonal cyclic periodicity yearly, and the sync between the individuals assessed over the 24 months was elevated. This one factor is a facilitator of the management of the species. The average temperature was the abiotic factor that influenced the fenofases. The assa-

fish presented the flowering in the period from June to August, while the fruiting reached peak intensity in the month of October. The species presents growing increase in levels of phenolic compounds and essential oil with the development of the leaves. The essential oil profile has not changed with the phases of development, however, showed difference in their relative proportions, varying the content of germagrene D, *trans*-caryophyllene and espatulenol. Anatomical assessments showed that the initial development of tissues around 75% of what the plant will present when the leaf is already at the stage of senescence.

Keywords: phenophases, assa-peixe, climatic variables, synchrony.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae possui uma abundante e diversificada quantidade de metabólitos especializados que têm função de armazenamento ou defesa química, o desenvolvimento destes metabólitos é fator de imensurável importância no sucesso evolutivo da família. Quimicamente é conhecida por produzir monoterpênicos, diterpênicos, triterpênicos, sesquiterpênicos e lactonas sesquiterpênicas, poliacetilenos, flavonóides, ácidos fenólicos, benzofuranos, cumarinas e alcalóide de pirrolizidina que são, com poucas exceções, restritos as tribos Senecioneae e Eupatorieae (ANDERBERG et al., 2007; CALABRIA et al., 2009).

O gênero *Vernonia* (Asteraceae) é composto por mais de 1000 espécies, que podem ser encontradas nas áreas tropicais e subtropicais do continente asiático, africano e americano Ásia, e destas, aproximadamente 350 estão localizadas na América do Sul, ocorrendo com maior frequência no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia (ROBINSON,1999). Muitas espécies desse gênero possuem propriedades medicinais, sendo utilizadas em alguns países africanos para o tratamento da malária, amebíase, infecções e doenças sexualmente transmissíveis (HAMILL et al, 2000; TONA et al, 2004).

A espécie *V. polyanthes* possui diversas propriedades farmacológicas. De acordo com Lorenzi e Matos (2002) a espécie possui alcaloide, glicosídeos, flavonoides e óleos essenciais em sua composição fitoquímica. No entanto, é importante o estudo da fenologia para se desenvolver o regaste, a conservação que são processos fundamentais para um manejo sustentável e ferramentas para a domesticação das espécies (RIBEIRO et al., 1981; VIEIRA; ALVES, 2003). A variação dos teores dos metabólitos especializados que são efeitos da sazonalidade é confundida com as alterações metabólicas que possuem controle do processo de desenvolvimento interno controlado pela planta, o contrário também é observado. Por isso esta avaliação deve ser realizada em conjunto (GOBBO NETO, LOPES 2007; HARTMANN, 1996)

O desenvolvimento anual dos vegetais de porte herbáceo do Cerrado possui as fenofases bem definidas, cada fenômeno ocorre em uma determinada época do ano (MANTOVANI & MARTIN, 1998). A brotação das gemas nos órgãos subterrâneos se inicia na primavera, posteriormente o crescimento aéreo rápido e desenvolvimento floral que segue durante o verão, até o início do outono. O caule então cessa o

crescimento e as folhas começam a mostrar os primeiros sinais da senescência, o que acarretará na abscisão das partes aéreas e à dormência do vegetal. Por fim, ao término do inverno inicia-se o brotamento de novas gemas e a quebra da dormência (ASEGA,2007).

O período para a coleta do material vegetal e consequente o período de seu desenvolvimento é uma das fases mais importantes, uma vez que tanto a quantidade quanto a natureza dos compostos ativos pode variar durante diversos períodos do ano. Há estudos que descrevem a relação de interferência direta entre a sazonalidade e todas as classes de compostos secundários: desde óleos essenciais, lactonas, alcaloides, taninos, entre outros (SCHWOB, 2004; PITAREVIC, 1984; ZIDORN e STUPPER,2001; SCHMIDT et al, 1998; ELGORASHI et al, 2002; ROCA-PÉREZ et al, 2004). Todas as práticas de manejo, devem ser realizadas cuidadosamente sempre estando de acordo com as questões adaptativas de cada espécie, pois o vegetal e o ambiente em que está inserido, encontram-se altamente relacionados. Estudos realizados por Ventrella (2000), Silva e colaboradores (2005), relataram que a quantidade de radiação e fotoperíodo alteram a anatomia das folhas, levando a parênquima e cutículas espessos, redução das células estomáticas, entre outras alterações.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo acompanhar e descrever a fenologia de *Vernonia polyanthes*, com o intuito de obter informações importantes para a domesticação da espécie e também analisar a influência da sazonalidade nas fenofases, além de determinar se ocorre sincronia nesses eventos fenológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O presente estudo foi realizado na Fazenda Experimental Lageado, da Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP, Campus de Botucatu. (A área situa-se na Fazenda Experimental Lageado, da UNESP, Campus de Botucatu, que dista cerca de 3 km da sede do Município de Botucatu - SP. As coordenadas geográficas da sede municipal são de 22°52'20" Latitude S e 48°26'37" longitude W Gr, enquanto as do município de Botucatu são de 22°30' a 23°05' de latitude S e 48°52' W Gr). Na classificação de Koppen (1948), o clima da região é o Cfa (clima temperado quente (mesotérmico) úmido, com temperatura média do mês mais quente superior a 22°C). O território de Botucatu está sob o domínio predominante do Cerrado, pressionado pela Floresta Estacionaria Semidecidual.

Entretanto, essas áreas de contato entre as vegetações (Cerrado e Floresta Estacionai Semidecidual) também formam linhas ou áreas de tensão ecológica importantes, caracterizadas, no caso de Botucatu, pelo relevo de Cuesta, que influencia na disposição e seleção das espécies da flora existente no local (altitude, inclinação do terreno, solo, entre outros) (CUNHA, 2009).

O único curso d'água significativo que corta a área de estudo é o Rio Lava-pés, tributário da Bacia do Tiete. Esse curso d'água, antes de percorrer a Fazenda Experimenta I Lageado atravessa a parte urbana da cidade de Botucatu. Os solos dessa unidade de mapeamento são argilosos, de coloração vermelha escura, com relevo predominantemente ondulado; em certos locais restritos a topografia e mais suave, porém, próximo as áreas de solos rasos (Latosolos), o relevo se torna mais acentuado, com uma rede de drenagem mais densa, vertentes mais inclinadas e menos extensas (SOUSA; CAVALHEIRO, 1988).

Observações fenológicas

Foi adotado o método de amostragem em trilhas, descrito por d'Eça Neves & Morellato (2004). Selecionou-se, ao acaso, 40 indivíduos de *Vernonia polyanthes* Less., adultos e em condições fitossanitárias aparentemente satisfatórias (ausência de doenças e parasitas). As observações e coletas dos dados fenológicos foram

realizadas mensalmente, de agosto de 2014 a agosto de 2016, totalizando 24 meses de observações. Toda a população foi considerada adulta, uma vez que todos os indivíduos floresceram e/ou frutificaram durante o período de estudo.

Foram registradas a presença ou ausência e intensidade das seguintes fenofases: (1) Brotamento: tendo início a partir do aparecimento de brotos foliares até a expansão total das folhas novas; (2) Folhas maduras: folhas completamente expandidas, com coloração verde escura; (3) Senescência foliar: notada pelo amarelecimento progressivo das folhas; (4) Floração: aparecimento dos botões florais até antese das últimas flores; (5) Frutificação: notada pelo fim da antese e posterior confirmação da existência de sementes; (6) Queda foliar: sempre que se notavam espaços vazios nos ramos ou quando eram observadas folhas caídas no solo logo abaixo do indivíduo.

No nível individual, este método de análise tem caráter qualitativo. No nível populacional, entretanto, assume caráter quantitativo, indicando a porcentagem de indivíduos da população que estão manifestando determinado evento fenológico. Este método também foi utilizado para estimar a sincronia entre os indivíduos de uma população, considerando-se que quanto maior o número de unidades manifestando a fenofases ao mesmo tempo, maior é a sincronia desta população.

Adotou-se a metodologia proposta por Fournier (1974) para quantificar as fenofases, a qual avalia individualmente, utilizando uma escala intervalar semi-quantitativa de cinco categorias (0 a 4) e intervalo de 25% entre cada categoria, sendo 0 = ausência da fenofase; 1 = presença da fenofase com magnitude entre 1 e 25%; 2 = presença da fenofase entre 26 e 50%; 3 = presença da fenofase entre 51 e 75% e 4 = presença da fenofase entre 76 e 100%. Considerando a intensidade de cada fenofase, foi calculada a porcentagem de Fournier, segundo Fournier (1974).

Percentual de intensidade de Fournier - Neste método, os valores obtidos em campo através de uma escala intervalar semi-quantitativa de cinco categorias (0 a 4) permitem calcular a porcentagem de intensidade da fenofases. Em cada mês, faz-se soma dos valores de intensidade obtidos para todos os indivíduos da espécie e divide-se pelo valor máximo possível (número de indivíduos multiplicado por quatro). O valor obtido, que corresponde a proporção, então é multiplicado por 100, para transformá-lo em um valor percentual (FOURNIER, 1974).

Para verificar a sincronia da população em relação às fenofases avaliadas, foi adotado o método descrito em Bencke; Morellato (2002), que consideraram a

seguinte proporção de indivíduos manifestando determinado evento fenológico: < 20% assincrônico; 20-60% pouco sincrônico; > 60% sincrônico. Esse cálculo foi estimado no período de máxima atividade de cada fenofase.

Os dados meteorológicos foram fornecidos pelo Departamento de Solos e Recursos Ambientais e obtidos na Estação Meteorológica do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, localizada no mesmo local da área de estudo. A normalidade da distribuição dos dados foi testada. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizada a análise de correlação de Pearson (r) para verificar a relação entre as variáveis climáticas (precipitação total mensal, temperaturas média, umidade relativa média mensal) e a intensidade das fenofases.

Coleta do material vegetal para análises fitoquímicas

Foram selecionados indivíduos de área nativa, localizada do pomar didático do Departamento de Horticultura, que possuíam características fitotécnicas (altura e diâmetro) uniformes. Para esta seleção foi utilizado a estatística descritiva, medidas de dispersão tais como, coeficiente de variação, desvio padrão e médias para o agrupamento destas plantas. Estas medidas de dispersão para a população estudada de *V. polyanthes* em relação à altura e diâmetro à altura do peito (DAP), foram respectivamente: $\sigma = 0,21$; $CV = 3,94\%$; $\bar{X} = 5,4$ e $\sigma = 2,79$; $CV = 9,55\%$; $\bar{X} = 29,1$.

Foram coletadas amostras em quatro fases fenológicas (Outubro- Folhas novas; Janeiro- Completamente expandidas; Maio- Folhas maduras; Julho- Folhas senescentes). O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar forçada a 45 °C para quantificação do teor de óleo essencial e para quantificação o teor de compostos fenólicos as amostras secas foram moídas em moinho de faca. Dados climáticos do período de estudo são apresentados na Tabela 1.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos representados pelos períodos sazonais: (Outubro- Folhas novas; Janeiro- Completamente expandidas; Maio- Folhas maduras; Julho- Folhas senescentes) e cinco repetições. Foi realizada a amostragem composta das plantas selecionadas, com posterior divisão em repetições.

Tabela 1. Dados meteorológicos da Fazenda Experimental Lageado no período experimental.

Datas das Coletas	Temp. Média (°C)	Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)
18/10/2014	25,3	58	0
20/01/2015	27,7	88,9	4,8
18/05/2015	17,7	80	0
28/06/2015	15,8	70	0

Fonte: Estação Meteorológica do Lageado

Teor de óleo Essencial

O óleo essencial das folhas foi extraído pelo processo de hidrodestilação em aparato do tipo de Clevenger. Foram utilizados 40 gramas de biomassa seca das folhas em 1,5L de água destilada em balão de 2L, por 120 minutos. O teor foi determinado com base em 100 gramas de biomassa seca de folhas.

Análise da composição química do óleo essencial

A análise da composição química do óleo essencial de foi realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP. A análise quantitativa da composição química foi realizada por meio de cromatografia á gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste, vazão de 1,0 mL min⁻¹, injetor a 240°C, detector a 230°C, split 1/20 e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 120°C, 8°C/min.; 120°C - 200°C, 3°C/min.; 200°C - 240°C, 8°C/min.; split: 1/20; fluxo: 1,0 ml/min.. A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹), split: 1/20, injetor a 240°C, detector a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C-

230°C, 3°C min⁻¹. A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib), literatura e índice de retenção das substâncias com os obtidos por meio da injeção de uma serie homóloga de n-alcenos no programa de temperatura anteriormente descrito , aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL E KRATZ, 1963; ADAMS, 2007).

Teor de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo total de compostos fenólicos do extrato etanólico da polpa foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999). O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropolíácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 760nm.

Para tanto, pesou-se aproximadamente 0,2 g de folhas secas e moídas de assa-peixe, adicionado com 10 mL de etanol a 80% durante dois minutos e, em seguida, foi levada para o banho ultrassônico por quinze minutos e realizada a centrifugação a 3500 rpm por trinta minutos. Para a realização da análise, uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo e adicionado 2,5mL do reagente Folin Ciocalteu, diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co) a 760nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico, com base em uma curva de calibração de ácido gálico.

Análises Anatomia foliar e Histoquímica

Para a análise morfoestrutural foram coletadas folhas em quatro fases fenológicas (Outubro- Folhas novas; Janeiro- Completamente expandidas; Maio- Folhas maduras; Julho- Folhas senescentes). As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool etílico 50%) (JOHANSEN, 1940),

levadas ao Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, localizada na cidade de Botucatu-SP, e posteriormente porções da região mediana foliar foram desidratadas em séries etanólica até 100% de concentração, seccionadas em fragmentos menores e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin) para obtenção de blocos. Estes blocos foram seccionados (10 µm de espessura) em micrótomo rotativo e as secções coradas em azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'BRIEN et al., 1964). Lâminas permanentes foram montadas com Entellan[®]. As análises e a documentação dos resultados foram realizadas em fotomicroscópio *Leica*. Para caracterização de cada tratamento, em cada repetição as variáveis foram medidas em três pontos distintos do corte. As variáveis analisadas foram: espessura da epiderme das faces adaxial (EPAD) e abaxial (EBAD), dos parênquimas paliádico (PP), esponjoso (PE), limbo (LB), área do floema (AF), área do xilema (AX), área total do feixe vascular (AT), número de feixes vasculares.

Para o estudo histoquímico, amostras do material vegetal foram levadas para o Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica no Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP. Para identificar e localizar as principais classes químicas de metabólitos secundários presentes nas folhas foi utilizado o material fresco seccionado a mão livre. Utilizaram-se os seguintes reagentes: Reagente de Nadi para óleos essenciais (DAVID; CARDE, 1964), solução de cloreto férrico 10% para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), reagente de Dittmar para identificação de alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981). Foram analisadas cinco folhas em cada um dos quatro períodos de coleta, mesmos descritos para análise morfoestrutural.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade através do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie estudada apresentou comportamento fenológico cíclico sazonal com periodicidade anual, sendo que a sincronia entre os indivíduos avaliados ao longo dos 24 meses acompanhados, em geral, foi elevada (tabela 2).

Tabela 2. Grau de sincronia por fenofases, em porcentagem de indivíduos, estimado no período de máxima atividade das espécies, Botucatu- SP, 2014/2015.

	Brotamento	Folhas maduras	Senescência foliar	Floração	Frutificação	Queda Foliar
<i>V. polyanthes</i>	90	100	80	100	95	80

A diminuição da precipitação, da umidade e da temperatura foi paralela ao aumento gradual na queda foliar da população avaliada, evidenciando, portanto, existe relação com o aumento da evapotranspiração. Esse aumento da evapotranspiração está associado à maior retirada de nutrientes do solo, sendo que ao final dessa estação a absorção de nutrientes é dificultada pela baixa umidade do ar e a diminuição da disponibilidade de água no solo, ocasionando assim, a perda das folhas da maioria das espécies do cerrado (MORELLATO, 1992). É provável que durante a estação seca ocorra um desvio de recursos da fase vegetativa para a fase reprodutiva, uma vez que estas espécies decíduas investem na produção de flores e na formação dos frutos durante o período de intensa senescência foliar (FOSTER, 1990) (figura 3).

Figura 3- Fenofases de *V. polyanthes*. A-brotação, B- folhas maduras, C-folhas senescentes, D- floração, E- frutificação.

Fonte: a autora.



A *V. polyanthes* emitem seus primeiros brotos a partir da primeira quinzena de agosto. As espécies caducifólias apresentam brotamento imediatamente após as primeiras chuvas que pequena quantidade de água disponível já seria suficiente para quebrar a dormência de gemas e induzir o brotamento (BORCHERT et al, 2002). Em relação às folhas maduras, a intensidade máxima foi atingida no mês de fevereiro, exatamente um mês após a máxima precipitação registrada, contrapondo com a queda foliar, que apresentou a maior intensidade no mês de junho. Estas fenofases apresentam comportamento antagônico, pois as folhas maduras correlacionam positivamente com as variáveis climática, enquanto a queda foliar e a senescência tem correção negativa (Figura 4). A redução da pluviosidade como fator desencadeador da queda foliar em ambiente de cerrado (SANTOS et al., 2009).

A floração foi anual, com duração de dois meses e se correlacionou negativamente (Tabela 3) com todas as variáveis climáticas analisadas, principalmente com a temperatura (figura 5). No entanto, o pico de floração ocorre no mês de julho, no período mais seco do ano. Esse comportamento provavelmente está associado a maior proteção aos órgãos reprodutivos e aumento da eficiência dos polinizadores, uma vez que, chuvas intensas podem danificar as peças florais e dificultar a ação dos polinizadores, afetando a produção de sementes pelas plantas (JACKSON, 1978; PEDRONI et al., 2002). Em geral, a floração na seca ocorre após a abscisão das folhas e quebra de dormência dos meristemas apicais da parte aérea das plantas, coincidindo com a retomada do crescimento. Essas seqüências de eventos fenológicos durante a seca é um padrão típico de espécies arbóreas decíduas de savanas e cerrados (Opler et al. 1980, Miranda 1995) ficando evidente que a floração ou a antese seja induzida por reidratação devido a redução da transpiração (BORCHET 1994).

Tabela 3. Correlações de Pearson entre as fenofases avaliadas de *Vernonia polyanthes* Less. e os fatores climáticos (temperatura, umidade e pluviosidade média), no Fazenda Lageado- FCA/UNESP, Botucatu. 2014-2015.

	Brotamento	Folhas Maduras	Senescência Foliar	Floração	Frutificação	Queda Foliar
T°C Média	0,11	0,72	-0,81	-0,81	0,12	-0,62
Pluviosidade (mm)	-0,29	0,61	-0,34	-0,56	-0,28	-0,52
Umidade (%)	-0,38	0,55	0,04	-0,49	-0,32	-0,52

Figura 4- Queda foliar e floração em relação à temperatura (°C) e precipitação (mm).

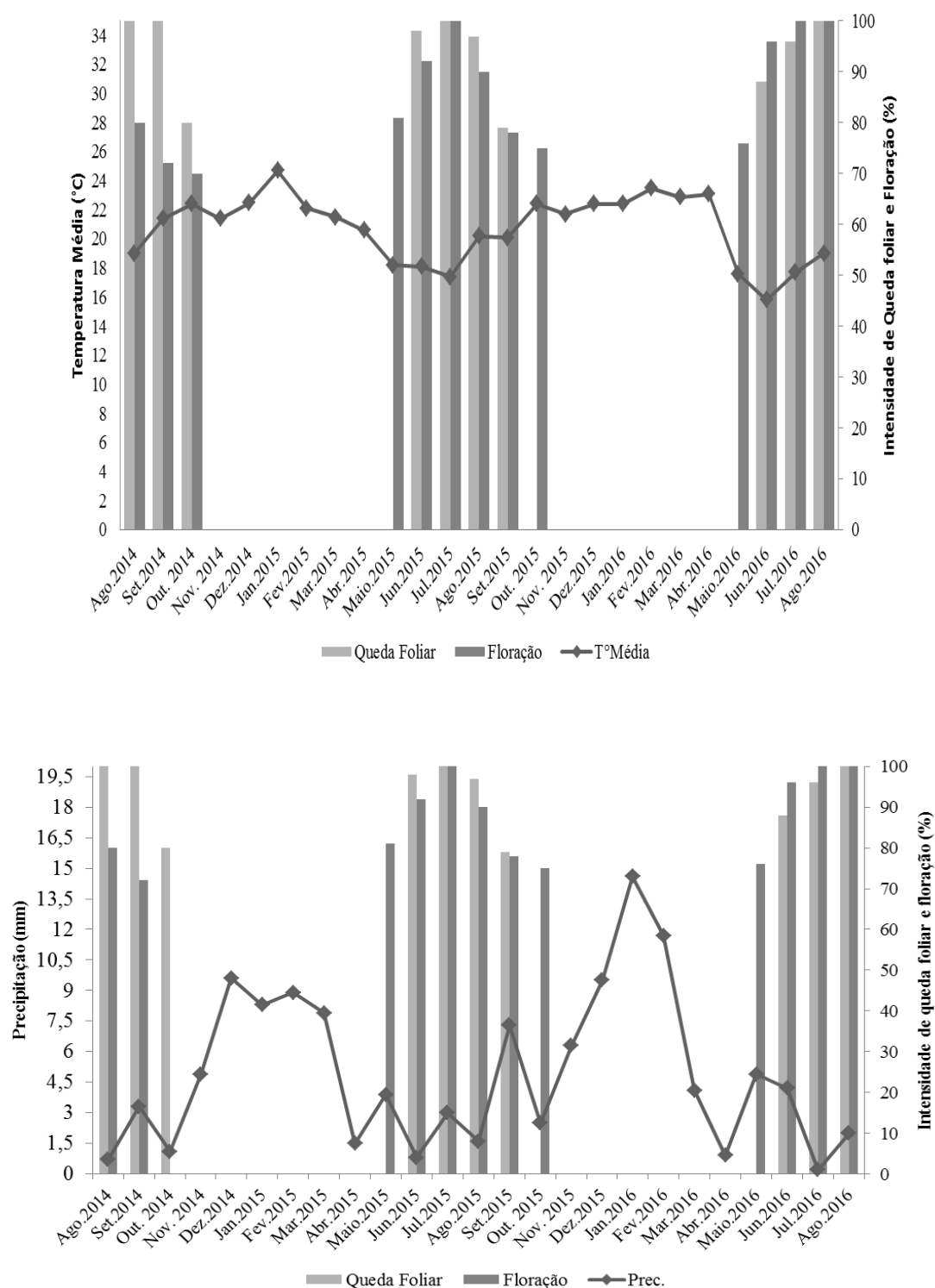
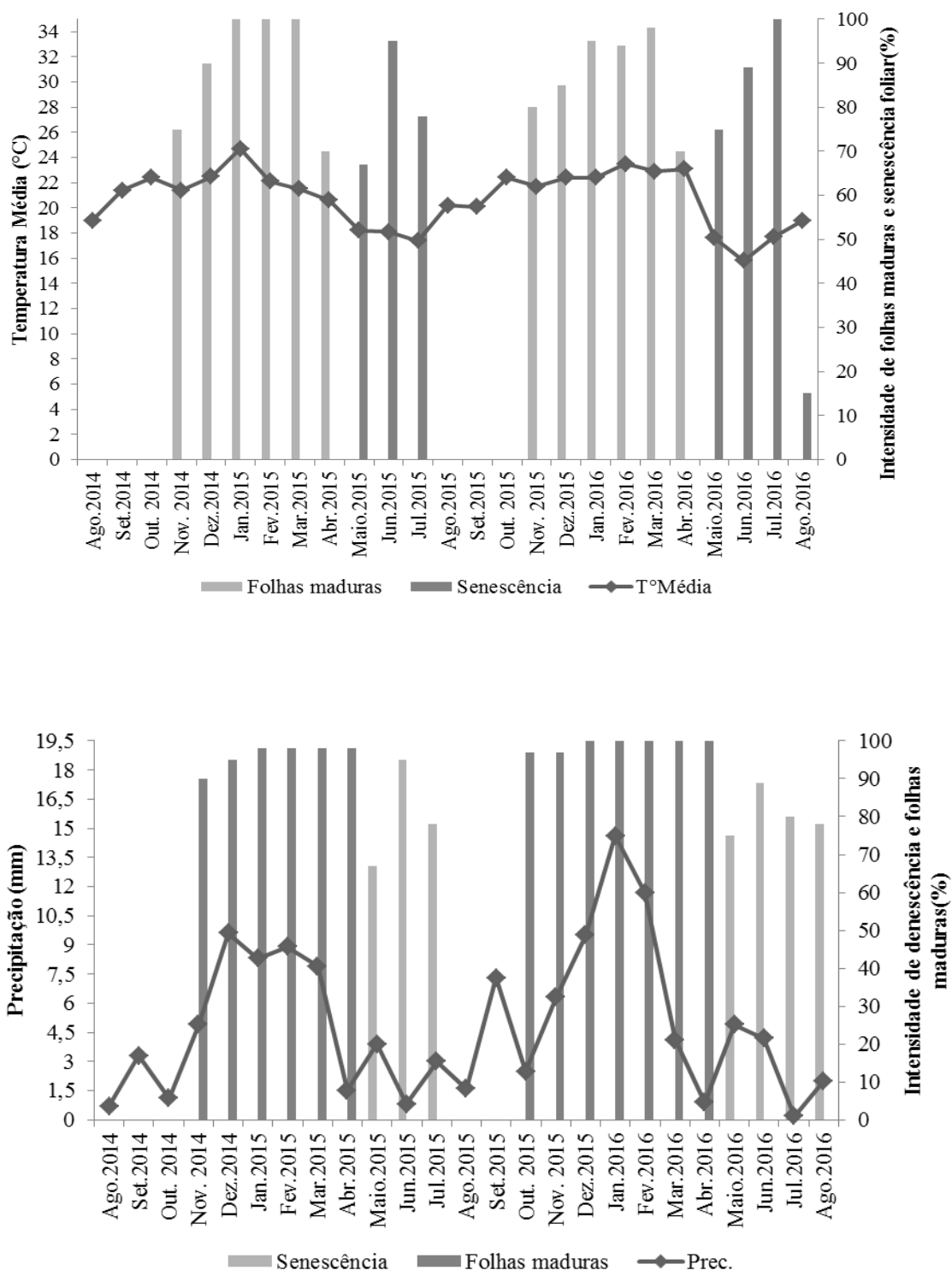


Figura 5- Senescência e folhas maduras em relação a temperatura (°C) e a precipitação (mm).



A fenofases de frutificação tem início em agosto e sua intensidade máxima ocorre em na primeira quinzena de outubro. A deiscência dos frutos ocorre quando o clima é propício à dispersão de seus propágulos anemocóricos (SCHAİK et al.,

1993). Em vegetação de Cerrado as plantas lenhosas, dispersam suas sementes durante a estação seca parecem germinar prontamente, enquanto espécies com dormência têm sido disseminadas predominantemente na estação chuvosa (OLIVEIRA, 2008).

No estudo anatômico foi observado que a epiderme foliar de *V. polyanthes*, em seção transversal, é unisseriada, em ambas as faces e revestida por uma cutícula delgada. A folha apresenta estômatos na face abaxial, situados no mesmo nível das demais células da epiderme. O mesofilo é do tipo dorsiventral, constituído por uma camada de parênquima paliçádico com células altas e estreitas. Possui três a cinco camadas de parênquima esponjoso, delimitando espaços intercelulares de dimensões variadas. Apresenta tricomas dos tipos tectores e glandulares em ambas as faces da epiderme, com mais frequência na face abaxial. Na secção transversal, foi observada a presença de cristais na nervura principal e grande quantidade de cavidades secretoras (Figura 6).

A diferenciação dos tricomas ocorre ainda quando as células ainda estão em processo de divisão e antes da diferenciação dos demais sistemas de tecidos, o que explica mais em folhas jovens. A epiderme é um tecido multifuncional, com importante papel nas relações hídricas, defesa e atração de polinizadores. Tais funções são desempenhadas por diferentes células especializadas que atuam simultaneamente e que se diferenciam cedo na protoderme, em padrões e frequências significativas do ponto de vista adaptativo (GLOVER 2000; FAHN, 1990).

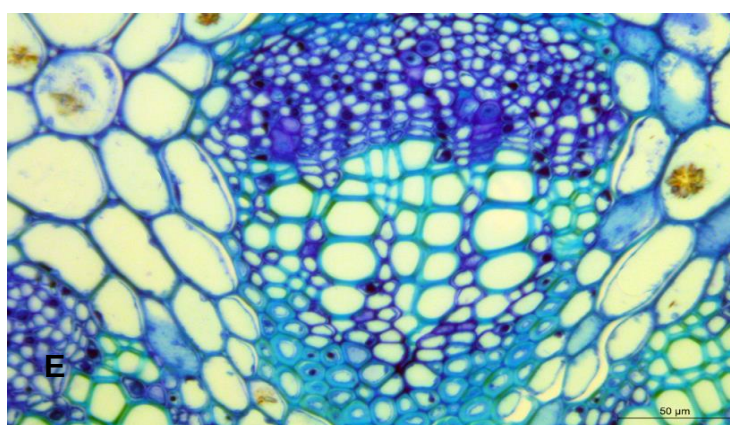
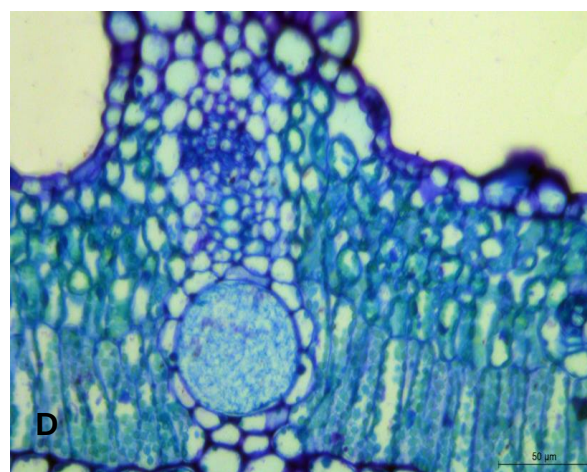
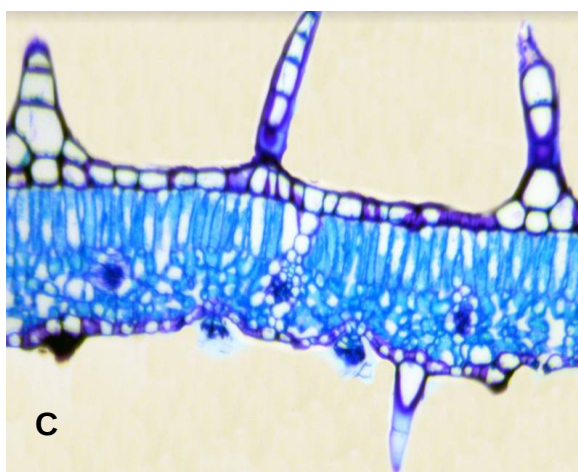
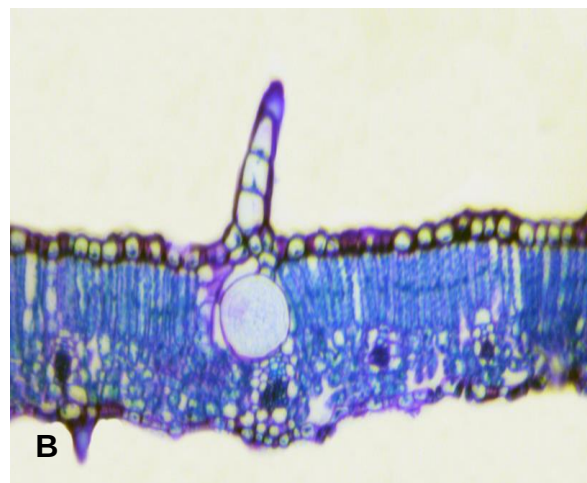
Na análise morfoestrutural, constatou-se que a espessura do parênquima paliçádico de uma folha jovem já possui cerca de 75% da espessura de quando a mesma se encontrar em fase de senescência. A espessura do parênquima paliçádico apresentou aumento aproximado de 25% nos fases fenológicas de folha madura e senescente (Tabela 4). O formato destas células facilita a penetração da luz direta para o interior do mesofilo e ao ajustar a espessura, propicia maior eficiência na distribuição da luz no interior da folha (VOGELMANN, NISHIO; SMITH 1996). Revelando ser o tecido que mais apresenta plasticidade em resposta aos fatores abióticos (JUSTO et al., 2005). A espécie *Lessingianthus buddleiifolius* (Mart. ex DC.) H. Rob. e *Chrysolaena simplex*, ambas pertencentes a família Asteraceae apresentaram comportamento semelhante ao da *V. polyanthes*, menores espessuras de parênquima paliçádico em folhas mais novas (SANTOS, 2013).

O número de feixes vasculares variou de três a seis feixes vasculares, sendo que nas fases de folhas maduras e senescentes aparecem em maior número que nas folhas jovens e em expandidas. A área dos feixes vasculares teve o mesmo comportamento citado acima. Este fato pode ser explicado pela fenologia da espécie, pois nestes períodos as folhas se encontram adultas e totalmente expandidas.

Tabela 4. Valores médios de espessura de parênquima paliçádico (μm), área do feixe vascular (μm^2) e número de feixes vasculares de folhas de *Vernonia polyanthes* Less. em diferentes estágios fenológicos . UNESP/FCA, Botucatu 2015.

Estágios fenológicos	Médias		
	Parênquima Paliçádico	Área do feixe vascular	Número de feixes vasculares
Folhas novas	53,2	23564,9	3,6
Folhas expandidas	60,9	23033,9	3,2
Folhas maduras	70,6	31324,8	5,2
Folhas senescentes	71,7	29436,1	4,8

Figura 6. Secção transversal da folha de *V. polyanthes* Less. A- Nervura principal; B- Lamina foliar, organização do mesofilo e tricoma tector na epiderme adaxial; C- Detalhe da cavidade secretora; D-Presença de estômatos na face abaxial; E- Detalhe do feixe condutor central e presença de cristais.



Óleos essenciais da espécie *V. polyanthes* foram histoquimicamente detectados nas células epidérmicas e no lume de cavidades secretoras, em tricomas glandulares e tectores localizados em ambas as faces do limbo foliar e em células parenquimáticas comuns do mesofilo, nas quatro épocas de coleta. Plantas deste gênero são ricas em glândulas oleíferas e muitos dos seus óleos essenciais apresentam atividades biológicas, como antimicrobiana e inseticida, antiespasmódica, anticâncer e outras (JING LIU et al., 2009; SIMÕES et al., 2001).

Verificou-se a presença de compostos fenólicos no verão e outono em todas as estruturas secretoras analisadas, exceto nas células do parênquima no período do verão. Em contrapartida, na primavera e inverno não ocorreu à produção deste metabólito secundário nas cavidades secretoras e nas células do parênquima. Dentre os compostos fenólicos, estão os flavonoides, marcadores quimiotaxonomicos para a família Asteraceae, que já foram observados nesta espécie. Possuem como atividades biológicas capacidade de diminuir a permeabilidade dos capilares e reforçar a resistência (SOUSA et al., 2008).

Não foi observada a presença dos alcaloides nas células do parênquima na primavera, outono e inverno, sendo verificada a produção e armazenamento nas demais estruturas. No verão os alcaloides não foram identificados pela histoquímica, nas cavidades secretoras e células parenquimáticas. Podem ser encontrados na família Asteraceae os alcalóides pirrolizidínicos, trôpanicos, piridínicos, quinolínicos e mistos (HENRIQUE et al., 2001). A ação dos alcaloides é vasta para a fitoterapia, como antitumoral, anti-hipertensivo, amebicida, no entanto algumas classes deste composto apresenta alta toxicidade (FRACARO et al. 2004) (Tabela 5). Diante deste fato a importância de se fazer estudos futuros quanto sua classificação destes alcaloides.

Tabela 5. Histoquímica em folhas de *Vernonia polyanthes* Less. em períodos fenológicos, Botucatu-SP, 2015.

Substância	Época de Coleta																			
	Folhas Jovens					Folhas Expandidas					Folhas Maduras					Folhas Senescentes				
	(Primavera)					(Verão)					(Outono)					(Inverno)				
	CE	CS	TG	TT	CP	CE	CS	TG	TT	CP	CE	CS	TG	TT	CP	CE	CS	TG	TT	CP
Óleos Essenciais	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Compostos fenólicos	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Alcaloides	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

CE- Células Epidérmicas; CS- Cavidades Secretoras; TG-Tricomas glandulares; TT- Tricomas Tectores; CP- Células do Parênquima; + positivo; - negativo.

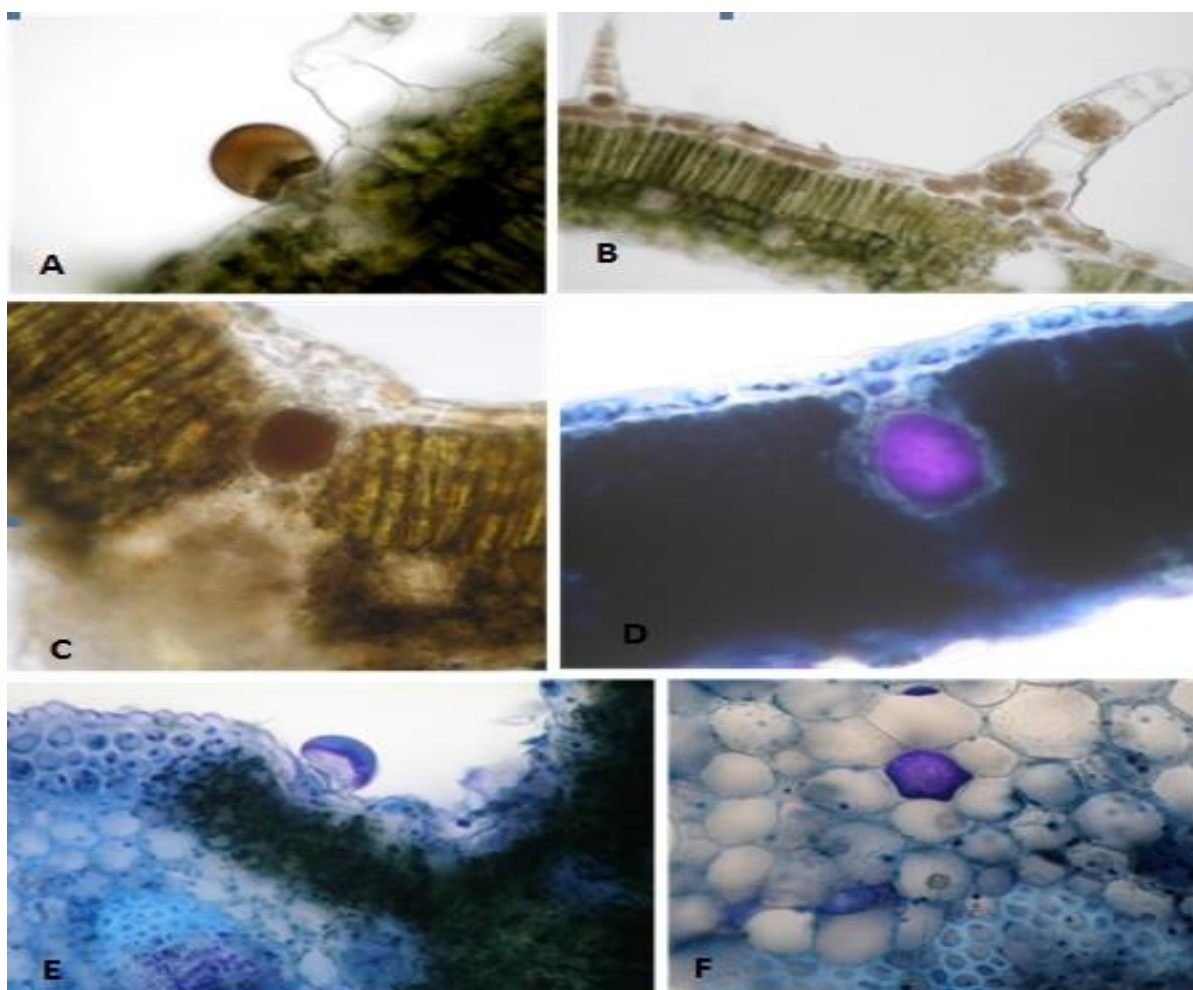
Devido à diversidade de estruturas secretoras da espécie não foi realizada a análise de densidade de tricomas, uma vez que, este resultado não seria eficiente para uma possível correlação com o teor de óleos essenciais. A diversidade e a localização de estruturas secretoras e metabólitos secundários podem auxiliar na identificação de espécies, sendo utilizados como parâmetro no controle de qualidade farmacêutica (VON POSER; MENTZ, 2001). As estruturas secretoras, comuns em muitos representantes da família Asteraceae, têm recebido atenção especial pela sua importância e diversidade. A *V. polyanthes* produz e acumula os três grandes grupos de metabólitos secundários em todos os períodos sazonais estudados (Figura 7).

Tricomas glandulares são expansões epidérmicas, uni ou multicelulares, originadas a partir da protoderme (FAHN 1979; WERKER 2000; EVERT 2006). Estudos indicam que a secreção produzida pelos tricomas glandulares pode apresentar composição química bastante variável podendo ser completamente hidrofílica, completamente hidrofóbica, ou ainda de natureza mista (EVERT 2006; WERKER 2000). A extremidade desses tricomas é formada por uma cabeça uni ou multicelular, que pode apresentar grande variedade de formas e tamanhos. A cabeça une-se a epiderme por meio de uma haste ou pedúnculo uni ou multicelular. O pedúnculo varia no comprimento, e muitas vezes são pequenas que parece um disco. Muitos tricomas glandulares as paredes anticlinais das células do pedúnculo cutinizados ou suberizadas. A secreção pode ser armazenada entre a parede e a

cutícula e eliminada pelos poros cuticulares ou pelo rompimento cuticular (CASTRO; MACHADO, 2003).

Comumente, os sítios de secreção de compostos fenólicos e alcaloides são os idioblastos e células epiteliais que delimitam cavidades ou ductos que secretam material complexo de natureza mista. A presença de compostos fenólicos em órgãos totalmente diferenciados é relacionada com os mecanismos de interação entre plantas e animais, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbivoria. Nos casos em que as plantas estão com estresse hídrico, os compostos fenólicos acumulados nos vacúolos garantem a manutenção da estrutura celular e da integridade dos tecidos (CASTRO; MACHADO, 2003).

Figura 7. Caracterização histoquímica das principais classes de metabolitos secundários presentes no secretado em diferentes sítios de produção em folhas de *Vernonia polyanthes* Less. A e B- Compostos fenólicos (tricoma glandular, epiderme e tricoma tector); C- Alcaloides (cavidade secretora); D, E e F- Óleo essencial (cavidade secretora, tricoma glandular e célula do parênquima).



Os teores de óleo essencial e de compostos fenólicos sofreram influência significativa ($P > 0,001$) nas diferentes fases fenológicas. Observou-se que nas fases de folhas maduras e folhas senescentes, períodos secos e com temperaturas mais amenas, apresentaram maiores concentrações destes metabólitos. Isso pode ser explicado, pois as condições climáticas podem influenciar as atividades enzimáticas em certas espécies de plantas, consequentemente interferir na biossíntese de certos metabólitos secundários (BARROS et al., 2009; GOBBO-NETO, 2007). A enzima fenilalanina amonialiase (PAL) é responsável pela produção dos metabolitos da via chiquimato. Esta enzima se apresenta como o ponto intermediário entre o metabolismo primário e secundário (para a rota metabólica dos fenilpropanóides) é codificada por fatores multigênicos que controlam caracteres quantitativos, ou seja, a regulação da expressão gênica sofre interferência dos fatores ambientais que resulta em um determinado fenótipo (ZIAEI et al., 2012; PIRES et al., 2011).

A água é uma molécula fundamental nas atividades fisiológicas do vegetal, tem função de transporte de metabólitos e nutrientes para os diferentes órgãos da planta. Quando essa se torna limitante, provoca o estresse hídrico e estresse salino (VERMA; SUKLA, 2015). A baixa umidade relativa do ar e a deficiência hídrica do solo provocam redução do potencial hídrico da planta e sua turgescência (TIPPMANN ET AL., 2006; LISAR ET AL., 2012), fechamento estomático, danos a membranas e redução da atividade fotossintética (AZHAR et al., 2011). Tais fatores causam declínio das atividades fisiológicas normais, colocando a planta em situação de estresse (VALENTOVIC et al., 2006).

O teor de óleo essencial produzido pela *Vernonia polyanthes* na fase de folhas senescentes (julho) foi aproximadamente 52% maior que na fase de folha expandida (janeiro). Estes teores não apresentaram diferenças estatísticas nos períodos da primavera, verão e outono. Em algumas espécies os teores de compostos fenólicos variam em relação à sazonalidade e fases fenológicas e em outras permanecem praticamente constantes. No presente estudo foi observado que os teores de compostos fenólicos aumentaram nas folhas maduras e senescentes, teores relativos a fase folhas senescentes se mostraram cerca duas vezes maiores quando comparadas a folhas jovens. A fase de folhas maduras não se diferiu estatisticamente dos demais períodos, ao passo que o teor de compostos fenólicos nas folhas senescentes apresentou diferenças de folhas jovens e expandidas (tabela 6).

A redução do óleo tem relação direta com o mecanismo natural chamado fonte-dreno que degrada metabolitos secundários e direciona seus compostos para a manutenção dos metabolitos primários (TAIZ; ZEIGER, 2013). Através de pesquisas pode-se comparar o mesmo efeito em algumas plantas com propriedades medicinais, por exemplo; na *Hyptis marruboides* que no verão foi registrado teor de óleo de 0,42% que também coincide com o período de florada desta espécie (BOTREL et al., 2010); assim como, da *Mentha piperita* L. que no verão teve 1,43% de óleo também coincide com a floração da hortelã pimenta (CERVEZAN et al., 2011). Sendo assim, a época de floração é de grande importância para garantir um maior teor de óleo essencial, não sendo diferente para *Vernonia polyanthes* Less. Em *Porophyllum ruderale* e em *Salvia officinalis*, a melhor época de coleta de folhas para maior rendimento de óleo essencial foi prefloração, mesma fase encontrada neste trabalho, quando as folhas estão senescentes (FONSECA et al., 2007; ARRAIZA et al., 2012).

Os compostos fenólicos possuem função protetora para as plantas em situações de estresse, desempenham papel de filtro de raios solares quando são acumulados na epiderme (BERTOLLUCI et al., 2013; GOBBO; NETO, 2007), o que protege os tecidos internos. Plantas de guaco, espécie pertencente a mesma família botânica da *V. polyanthes* também apresentou aumento nos teores de compostos fenólicos quando submetidos a baixas temperaturas (ALMEIDA et al., 2016). Também foi observado que no período seco há maior produção de flavonoides em *Cecropia glaziovii* (LUENGAS-CAICEDO et al., 2007).

Tabela 6. Valores médios do teor de óleo essencial (%) e compostos fenólicos (mg de ác. Gálico por 100 g massa seca) de folhas de *Vernonia polyanthes* Less. em diferentes períodos sazonais (folhas jovens, folhas expandidas, folhas maduras e folhas senescentes). UNESP/FCA, Botucatu 2015.

Tratamentos	Médias	
	Teor de Óleo Essencial (%)	Compostos Fenólicos (mg de ác. Gálico por 100 g massa seca)
Folhas jovens (Primavera)	0,146 b	1017,486 b
Folhas expandidas (Verão)	0,120 b	1347,729 b
Folhas maduras (Outono)	0,168 b	1428,501 ab
Folhas senescentes (Inverno)	0,280 a	1911,066 a

- As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Nas fases de desenvolvimento das folhas constatou-se que não houve diferenças significativas para os seguintes componentes do óleo essencial: α -pineno, β - pineno e β -muroleno. Em folhas jovens e expandidas, o componente majoritário encontrado foi o Germacreno-D, enquanto que para folhas maduras foi identificado em menor quantidade. Para essa mesma fase o β - copaeno e di-cadieno apresentaram-se ausentes e o majoritário foi o espatulenol. Em folhas senescentes o Trans-cariofileno apresentou-se como componente predominante. Para as fases fenologias, folhas jovens expandidas e senescentes foram identificadas cerca de 85% de constituintes. Para folhas maduras essa porcentagem atingiu a marca de 68% (tabela 7).

O decréscimo no teor de óleo essencial em plantas aromáticas, em relação à idade da planta, também foi descrito para *Lippia sidoides* (FIGUEIREDO et al., 2009) e *Cymbopogon citratus* (LEAL et al., 2003). À medida que a planta envelhece ocorre uma redução proporcional dos seus processos biossintéticos e a síntese de metabólitos secundários pode ser atenuada (MATOS & INNECCO, 2002). O maior teor de óleo essencial pode estar relacionado com a idade da planta, aliado às condições ambientais de aumento gradual da temperatura média e de redução da precipitação, já que a produção e o acúmulo dos óleos essenciais nos vegetais podem ser influenciados pela temperatura do ar e pela disponibilidade de água (LIMA et al., 2003). Estudos anteriores comprovaram aumento do teor de óleo

essencial e dos seus constituintes majoritários em *Ocimum basilicum* e *Ocimum americanum* submetidas a estresse hídrico (KHALID, 2006).

Em trabalho realizado por Murakami (2009) foi observado que os óleos voláteis das folhas apresentaram redução dos compostos na fase de floração, resultado que se assemelha ao encontrado nesse estudo, onde as folhas senescentes (fase que precede o início da floração) de assa-peixe apresentaram maior teor de óleo essencial.

Em estudo realizado por Bülow & König (2000), é proposto que o germacreno D pode ser convertido em cadinenos, muurolenos e elemenos, a medida que o biciclogermacreno pode converte-se em, alloaromadendreno, e este por sua vez pode oxidar e originar espatulenol, globulol, epiglobulol e cadinóis. Essa transformação pode ser observada neste estudo na fase de transição de folha madura para senescente, onde com diminuição o germacreno D ocorre um aumento na porcentagem relativa de β - elemeno e di-cadieno. Nessa mesma fase, o comportamento do biciclogermacremo também segue esse padrão, sua diminuição culmina com o aumento do alloaromadendreno, e este por sua vez diminui na fase de transição de folhas jovens para expandidas, onde ocorre o aumento do espatulenol, componente ausente na fase de folha jovem.

Tabela 7. Substâncias identificadas e médias de suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de *Vernonia polyanthes* Less. sob diferentes fases fenológicas. Botucatu/SP, 2015.

Substâncias	Folhas	Folhas	Folhas	Folhas	IRc	IRI
	Jovens	Expandidas	Maduras	Senescentes		
	(Primavera)	(Verão)	(Outono)	(Inverno)		
α -pineno ^{ns}	0,74	1,29	1,48	0,51	929	929
β - pineno ^{ns}	3,86	1,75	3,63	1,31	934	939
α - copaeno	7,45 ab	7,01 ab	7,69 a	5,68 b	1377	1376
β - elemeno	7,27 b	7,26 b	2,88 b	9,04 a	1388	1390
trans-cariofileno	18,18 b	16,23 b	3,45 c	25,51 a	1420	1419
β -copaeno	0,99 a	0,94 a	0 c	0,56 b	1429	1432
α -humuleno	15,07 a	7,01 b	5,46 b	13,75 a	1454	1454
allo- aromadendreno	2,8 a	1,67 ab	2,74 a	1,22 b	1461	1460
δ -muroleno ^{ns}	0,48	0,30	0,27	0,31	1477	1479
germacreno-D	21,01 a	21,5 a	0,22 c	15,58 b	1482	1485
biciclogermacreno	6,09 b	11,03 a	0,67 c	8,36 ab	1497	1500
α -amorfenol	0,35 ab	0,44 a	0,47 a	0,26 b	1514	1512
d-cadineno	1,65 ab	2,01 a	0 c	1,52 b	1635	1636
espatulenol	0 b	7,60 b	39,03 a	6,73 b	1577	1578
Total	85,94	86,04	67,99	81,98		

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey

CONCLUSÃO

Os eventos fenológicos da população de *Vernonia polyanthes* estudada são sincrônicos, ou seja, os picos de atividade e intensidade das fenofases ocorrem no mesmo período. O crescimento é periódico e sazonal e a variável climática que se correlaciona fortemente com as fenofases é a temperatura. As fenofases vegetativas se concentram de outubro a maio e as reprodutivas de junho a primeira quinzena de outubro. O teor de óleo essencial e o conteúdo de compostos fenólicos totais são maiores nas fases de folhas maduras e senescentes. Quanto ao estudo da anatomia, o parênquima paliçádico é o tecido vegetal que apresenta maior plasticidade, o número de feixes e sua área ficam maiores com o desenvolvimento das folhas. A *V. polyanthes* secreta e acumula alcaloides, óleos essenciais e compostos fenólicos em todas as fases avaliadas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. L. et al. Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. **International Journal of Mass Spectrometry**.

ANDERBERG, A. A. et al. Compositae. Pp 61-87. In: Kadereit, J., Jeffrey, C. (Eds.). **The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering plants, Eudicots, Asterales**. Springer, Berlin. 2007.

ARRAIZA, M.P.; ARRABAL, C.; LÓPEZ, J.V. Seasonal variation of essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). **Not Bot Horti Agrobo**, v.40, n.2, p.106-108, 2012.

ASEGA, A.F. **Mobilização de frutanos durante a brotação em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby: purificação e expressão gênica de frutano-exohidrolases**. Tese (Doutor em Biodiversidade Vegetal e meio ambiente). São Paulo, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.191p. 2007.

AZHAR, N. et al. Water stress mediated changes in growth: physiology and secondary metabolites of desi ajwain (*Trachyspermum ammi* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v.43, p.15–19, 2011.

BARROS, F.M.C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Quim. Nova**, v.32, p.861–867, 2009.

BENCKE, C.C.; MORELLATO, L.P.C. Comparação de dois métodos de avaliação de fenologia de plantas, sua interpretação e representação. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p. 269-75, 2002.

BERTOLUCCI, S.K.V. et al. Seasonal variation on the contents of coumarin and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* leaves under different shade levels, **Chem.Biodivers**. v.10, p. 288–295, 2013.

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, p.557-564, 2007.

BORCHERT, R. 1994. Soil and stem water storage determine phenology and distribution of tropical dry forest trees. **Ecology**, v.75, p.1437-1449, 1994.

BORCHERT, R.; RIVERA, G.; HAGNAUER, W. Modification of vegetative phenology in a tropical semideciduous forest by abnormal drought and rain. **Biotropica**, v.34, p.381-93, 2002.

BOTREL, P.P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**: Maringá, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BÜLOW, N.; KÖNIG, W.A. 2000. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v.55, p. 141-168, 2000.

CALABRIA, L.M., et al. Secondary Chemistry of Compositae. Pp 73-88. In: FUNK, V.A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T.F.; BAYER, R.J. (Eds.). **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. IAPT, Austria. 2009.

CERVEZAN, T.C.M.; ROBANATO, A.A.C.; FIGUEIRA, G.M. Avaliação sazonal do rendimento em óleo essencial da espécie *Mentha piperita* L. **Congresso dos profissionais das Universidades de São Paulo**. 2001.

CHINNUSAMY, V. et al. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, p.444–451, 2007.

CRISTINE, P. J. et al. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings, **Planta**, v. 194, p. 541-549, 1994.

CUNHA, F.C. **Atlas escolar histórico e geográfico**, 2009.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration differentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. C.R. **Acad. Sci. Paris**, v.258, p.1338-1340, 1964.

D'EÇA NEVES, F.F.; MORELLATO, P.C. Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.1, p.99-108, 2004.

ELGORASHI, E. E. et al. Organ to-organ and season variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. **Fitoterapia**, v.73, p. 490, 2002

EVERT, R.F. **Esau's Plant Anatomy**. 3a. ed. Wiley-Interscience, new Jersey, 2006.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, London, 1979.

FAIRBAIRN, J. W.; SUWAL, P. N. The alkaloids of hemlock (*Conium maculatum* L.) – II: Evidence for a rapid turnover of the major alkaloids; **Phytochemistry**. v.1, n. 1, p. 38. 1961.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO LS, et al. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, p.154-158. 2009

FONSECA, M.C.M. et al. Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.9, n.2, p.75-79, 2007.

FOSTER, R. B. 1990. Ciclo estacional de caída de frutos en la isla de Barro Colorado. In: Leight, E.G.; Rand, A.S. & Windsor, D.M. (Ed.). **Ecología de un bosque tropical: ciclos estacionales y cambios a largo plazo**. Balboa, Smithsonian Institution, pp. 219-241.

FOURNIER, L.A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, v.24, n.4, p.422-3, 1974.

FRACARO, S.N.; DECONTO, I.; NAKASHIMA, T. **Potencial de toxicidade reprodutiva do extrato de Tillandsia usneoides Linnaeus, 1762 (barba-de-pau) em coelhas gestantes**. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004, 60 p.

FURR, M.; MAHLBERG, P.G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **J. Nat. Prod**, v.44, p.153-159, 1981.

GLOVER, B.J. Differentiation in plant epidermal cells. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.497-505, 2000.

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

HAMILL, F.A, et al. Traditional herbal drugs of Southern Uganda, I. **J. of Ethnopharmacology**. v.70, p. 281-300.2000.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomol. Exp. Appl.** v.80, p. 177. 1996.

HENRIQUES, A.T. et al. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L .A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3a. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2001. p. 765-91.

JING LIU et al. New vernocuminosides from the stem barks of *Vernonia cumingiana* Benth. **Steroids**, v.74, p.51–61, 2009.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Com. Inc., 1940, 423p.

KHALID, K.A. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.) **International Agrophysics**, v.20, p.89-296, 2006.

KOC, E. et al. Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Gazi. **Journal of Science**, v.23, p.1–6, 2010.

KOPPEN, W. **Climatologia: Com um estudo de los climas de la tierra**. Fondo de cultura Economica. México, 479p. 1948.

KUTCHAN, T.M. Ecological and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant physiology**, v. 125, p. 58, 2001.

KOPPEN, W. **Climatologia: Com um estudo de los climas de la tierra**. Fondo de cultura Economica. México, 479p. 1948.

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, p.61-64, 2003.

LIMA, H.R.P., Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenoides em plantas. Floresta e ambiente. **Seropédica**, v.10, p.71-77, 2003.

LINDROTH, R. L., et al. Seasonal patterns in the phytochemistry of three populus species. ; **Biochem. Syst. Ecol.** v.15, p. 681. 1987.

LISAR, Y. S. S. et al. Water stress in plants: causes, effects and responses. In: Rahman IMM (Ed.), Water Stress. **InTech Publishers, Croatia**, pp. 1–14, 2012.

LORENZI, H; MATOS, A.F. J. **Plantas Mediciniais: nativas e exóticas**. Nova Odessa: instituto Plantarum, 2002. 512p.

LUENGAS-CAICEDO, P.E; BRAGA, F.C.; BRANDÃO, G.C.; OLIVEIRA, A.B. Season and Interspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* Sneth. Leaves from native and cultivated specimens. **Z Naturforsch C**, v.62, n.9-10, p.701-709, 2007.

MANTOVANI, W. & MARTINS, F.R. (1988). Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica** 11: 101-112.

MATOS, S.H. & INNECCO, R. Idade ideal de corte de *Mentha arvensis* L. como produtora de óleo essencial e mentol no Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, p.15, 2002.

MIRANDA, I. S. Fenologia do estrato arbóreo de uma comunidade de Alter-do-Chão, PA. **Revista Brasileira de Botânica**, v.18, n.2, p.235-240, 1995.

MORELLATO, L. P. C. Sazonalidade e dinâmica de ecossistemas florestais na Serra do Japi. In: MORELLATO, L. P. C. (Ed.). **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 1992. p. 98-110.

MURAKAMI, C. **Estudo da composição química e atividades biológicas de óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King & Rob. em diferentes fases fenológica.** Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2009 , 95p.

O'BRIEN, T. P., FEDER, N., McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, p.368-373, 1964.

OLIVEIRA, P. E. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Orgs.). Cerrado: ecologia e flora. Planaltina, DF. EMBRAPA, 2008. p. 273-290.

OPLER, A. P., FRANKIE, G. W. & BAKER, H. G. 1980. Comparative phenological studies of treelet and shrub species in a tropical wet and dry forest in the lowlands of Costa Rica. **Journal of Ecology**, v.68, p.167-188, 1980.

PITAREVIC, I., et al. Seasonal variation of essential oil yield and composition of dalmatian sage, *Salvia officianlis*. **J. Nat. Prod.** v.47, p.409. 1984.

RIBEIRO, J.F. et al. **Aspectos fenológicos de espécies nativas do cerrado.** In Congresso Nacional de Botânica, 32. 1981.

ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of American Vernonieae Smithsonian. **Contr. Bot.** v. 89, p 1-116. 1999.

ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants; **Science**, v.184, p.430-435.

ROCA-PÉREZ, L., et al. Seasonal cardenolide production and dop5Br gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. ; **Phytochemistry** ,v. 65,p. 1869,2004.

SANTOS, L.W.; COELHO, M.F.B.; PIRANI, F.R. Fenologia de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) em Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.12-7, 2009.

SCHAIK, C. P. V.; TERBORGH, J. W.; WRIGHT, S. J. The phenology of tropical forest: adaptative significance and consequences of consumers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 353-377,1993.

SCHMIDT, T. J., et al. Sesquiterpenes lactone content in leaves of in vitro and field cultivated *Arnica montana*. **Planta Med.**, v.64, p.268. 1998.

SCHWOB, et al. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phonological cycle. **Biochem. Syst. Ecol.** v.32, p.735. 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, **Methods of Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SILVA, L.M., et al. Inter-relacoes entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, Sao Paulo, v. 19, n. 1, . 183-194 p., 2005.

SOUSA, C. F. et al. Medicinal plants and their bioactive constituents: a scientific review of bioactivity and potential benefits in the anxiety disorders in animal models. **Rev. bras. farmacogn.**, v.18, n.4, p.642-654, 2008.

SOUSA, MALB; CAVALHEIRO, L. Planejamento paisagístico do campus universitário DA Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, SP. **Acta bot. bras.** 1(2):155-163 (1988) supl.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TIPPMANN, H. F. et al . Common themes in biotic and abiotic stress signalling in plants. **Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology** v.3, p.52–67, 2006.

TONA, L. et al. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **J. of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 27-32. 2004.

VALENTOVIC, P. et al. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. **Plant, Soil and Environment**, v. 52, p.186–191, 2006.

VENTRELLA, M.C. **Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita**. 2000. 95 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciência Agronômica/Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

VERMA, N., SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2 , p.105–113, 2015.

VIEIRA, F.R.; ALVES, R.B.N. Desafios para conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas no Brasil In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P. DOMBROS, J.L.D. **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**, Cuiabá. UNICEN, 2003. P. 157-181.

ZIDORN, C; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). *Taxon*. v. 50,p.115. 2001.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE HIDRODESTILAÇÃO, HORÁRIO DE COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Vernonia polyanthes* Less.

Autora: Jordany Aparecida de Oliveira Gomes

RESUMO

Vernonia polyanthes Less. é uma espécie medicinal da família Asteraceae, nativa dos cerrado do cerrado brasileiro e produtora de óleo essencial . O tempo de hidrodestilação e o horário de coleta da espécie medicinal são informações importantes, pois permitem otimizar o processo de extração e potencializar o teor de óleo essencial. Sendo assim, o objetivo do estudo foi determinar o tempo de hidrodestilação e do horário de coleta no teor do óleo essencial e composição química de *V. polyanthes*. O trabalho foi realizado na Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu no ano de 2014. Foram selecionados indivíduos de área nativa de ocorrência no cerrado, localizada no município de Botucatu, que apresentavam características fitotécnicas (altura e diâmetro) uniformes. Os tratamentos basearam-se em cinco tempos de extração (30, 60, 90, 120, e 180 min) e cinco horários de coleta (07h00min, 10h00min, 13h00min, 16h00min e 19h00min) com quatro repetições, dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância, para o experimento de hidrodestilação foi aplicado análise de regressão e para o experimento do horário de coleta, as médias foram testadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Observou-se ajuste quadrático para o teor de óleo essencial em função dos tempos de hidrodestilação, verificando que com 106 minutos de extração se obtém o máximo do teor de óleo essencial de 0,3%. O horário ideal para a coleta de folhas de assa-peixe é as 13h00min, onde ocorre maior acúmulo de óleo essencial, o horário das 19h00min foi verificado menor teor de óleo essencial da espécie (0,16%).

Palavras-chave: Assa-peixe, terpenos, hidrodestilação.

ABSTRACT

Vernonia polyanthes Less. is a medicinal species in the Asteraceae family, native to the cerrado the cerrado and essential oil production. The hidrodestilação time and the time of collection of the medicinal species are important information because they allow optimizing the extraction process and enhance the content of essential oil and chemical composition. Therefore, the objective of this study was to determine the time of hidrodestilação and the collection schedule in the content of essential oil of *V. polyanthes*. The work was carried out on the Experimental Farm Faculty of Agronomic Sciences Lageado UNESP, Botucatu in the year 2014. Selected individuals of native range, of occurrence of the cerrado. The treatments were based on five extraction time (30, 60, 90, 120, and 180 min) and five hours of collection (7:00, 10:00, 1:00 pm, 4:00 pm and 7:00 pm) with four replications, arranged in completely randomized design. The data were subjected to analysis of variance, for the hidrodestilação experiment was applied regression analysis and experiment of the collection schedule, the averages was tested by Tukey test at 5% probability. Quadratic adjustment was observed for the essential oil content in the light of the hidrodestilação times, noting that with 106 minutes if it gets the maximum extraction of the essential oil content of 0.3%. The ideal time for collecting leaves of assa-fish is the 1:00 pm, where greater accumulation of essential oil, 19:00 hours hours verified less essential oil content of species (0.16%).

Keywords: Assa-peixe, terpenes, hydrodistillation

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae possui grande número de espécies que são utilizadas como medicinais, devido à presença de várias classes de metabólitos secundários (CRONQUIST, 1988). *Vernonia polyanthes* Less., é uma planta pertencente a esta família, utilizada na medicina popular para combater tosses, resfriados e inflações. Possui como compostos secundários, os alcaloides, compostos fenólicos e óleos essenciais, substâncias que lhe confere ação terapêutica (ANDREÃO, 1999). Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos especializados voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas e odoríferas obtidas de partes de plantas via destilação por arraste com vapor d'água (SIMÕES e SPITZER, 2003).

Aspectos como a genética e fatores ambientais influenciam no teor e na composição química dos óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2012), outro fator que interfere nas características é o tempo de hidrodestilação das espécies. Dentre as técnicas para extração de óleos essenciais mais usuais destaca-se a hidrodestilação, a qual possui registros de 3000 a.C (FRASER; WISH, 1997). Nesta técnica o material vegetal é imerso na água em aquecimento até a fervura, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos voláteis, os quais, após condensação, separam-se da fase aquosa por decantação. A composição dos óleos essenciais pode ser influenciada pelo contato com a água, tempo de extração e velocidade de aquecimento (PRINS et al., 2006).

O vegetal produz algumas substâncias aromáticas com a finalidade de proteção contra raios UV, perdas excessivas de água por evapotranspiração, atração por polinizadores e dispersão de sementes (JAKIEMI, 2008). Sendo assim os ciclos circadianos e sazonais podem influenciar no teor e na composição dos constituintes dos óleos essenciais para cada espécie (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). As respostas fisiológicas relacionadas às flutuações climáticas nos ciclos circadianos possuem padrões de respostas fisiológicas com modificações menores e mais rápidas, quando comparadas as respostas de mudanças sazonais (BLANK et al., 2005).

Relatos sobre a forma correta de coleta de plantas medicinais existem desde o século IV a.C. A espécie *Conium maculatum*, por exemplo era coletada de manhã, pois

as variações nas quantidades de seu princípio ativo, estavam diretamente relacionadas com as oscilações de clima, temperatura, pluviosidade, etc. Mesmo quando existe um controle genético, a expressão pode sofrer alterações, pois os processos fisiológicos, bioquímicos tem sua síntese alterada de acordo com as variações do ambiente (ROBINSON, 1974; FAIRBAIRN e SUWAL, 1961; LINDROTH et al, 1987; HARTMANN, 1996; KUTCHAN, 2001).

Tendo em vista o aprimoramento da técnica de hidrodestilação e a busca por boas práticas de coleta de plantas medicinais, o presente trabalho teve como objetivo definir o melhor tempo de hidrodestilação, horário de coleta e o perfil do óleo essencial de folhas de *Vernonia polyanthes* Less.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal e Delineamento Experimental

O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus Botucatu. A fazenda está localizada no município de Botucatu/SP, situada entre os paralelos 22° 30' a 23° 05' de latitude Sul e os meridianos 48° 15' a 48° 52'.

Foram selecionados indivíduos de área nativa, localizada do pomar didático do Departamento de Horticultura, que possuíam características fitotécnicas (altura e diâmetro) uniformes. Para esta seleção foi utilizado à estatística descritiva, medidas de dispersão tais como, coeficiente de variação, desvio padrão e médias para o agrupamento destas plantas. Estas medidas de dispersão para a população estudada de *V. polyanthes* em relação à altura e diâmetro à altura do peito (DAP), foram respectivamente: $\sigma = 0,21$; $CV = 3,94\%$; $\bar{X} = 5,4$ e : $\sigma = 2,79$; $CV = 9,55\%$; $\bar{X} = 29,1$.

O experimento consistiu na determinação do melhor tempo de hidrodestilação de folhas de *V. polyanthes*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos: T1- 60 minutos, T2- 90 minutos, T3- 120 minutos, T4- 150 minutos e T5- 180 minutos e quatro repetições.

O experimento de horário de coleta de folhas de *V. polyanthes* consistiu na coleta de folhas em cinco horários durante o dia (07h00min, 10h00min, 13h00min; 16h00min e 19h00min) e quatro repetições. Para os dois experimento foi realizada a

amostragem composta das plantas selecionadas, com posterior divisão em repetições.

Teor de óleo essencial

A massa padronizada foi de 40 gramas de folhas secas fragmentadas em frações de aproximadamente 1 cm e submetidas à técnica de hidrodestilação pelo aparato do tipo Clevenger. Após a obtenção do óleo essencial puro, a massa e o teor de óleo foram calculados pela seguinte fórmula: $T\% = \text{Massa do óleo (g)} \times 100 / 40\text{g}$.

Análise de composição química do óleo essencial

A análise da composição química do óleo essencial de foi realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP. A análise quantitativa da composição química foi realizada por meio de cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), hélio como gás de arraste, vazão de 1,0 mL min⁻¹, injetor a 240°C, detector a 230°C, split 1/20 e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 120°C, 8°C/min.; 120°C - 200°C, 3°C/min.; 200°C - 240°C, 8°C/min.; split: 1/20; fluxo: 1,0 ml/min. A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais foi conduzida em cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹), split: 1/20, injetor a 240°C, detector a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 120°C, 8°C/min.; 120°C - 200°C, 3°C/min.; 200°C - 240°C, 8°C/min.; split: 1/20; fluxo: 1,0 ml/min. A identificação dos constituintes químicos foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib), literatura e índice de retenção das substâncias com os obtidos por meio da injeção de uma serie homóloga de n-alcanos no programa de

temperatura anteriormente descrito , aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL E KRATZ, 1963; ADAMS, 2007).

Análise estatística

Para experimento de tempo de hidrodestilação, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e realizada análise de regressão, a equação foi ajustada. Para o experimento de melhor horário de coleta de folhas, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e testados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

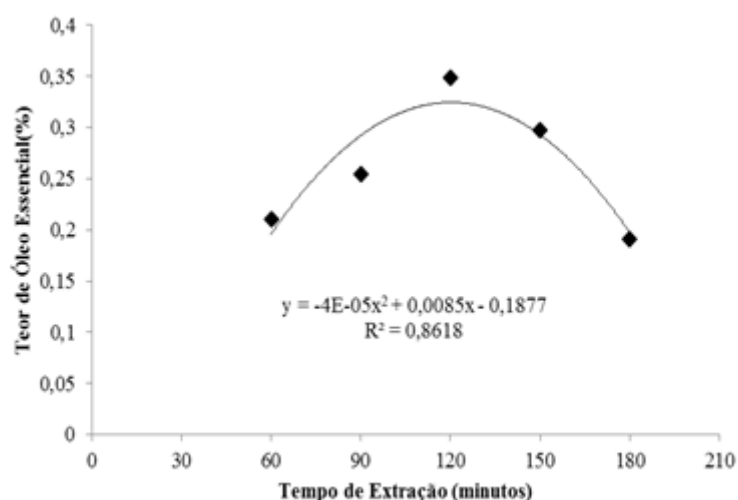
O rendimento do óleo essencial de folhas de *V. polyanthes* hidrodestiladas por 180 minutos foi de 0,19 %. Observou-se ajuste ao modelo quadrático, a partir da derivada da equação verificou-se que a maior parte do óleo essencial (0,35%) é extraída no tempo de 106 minutos, mantendo os níveis de rendimento satisfatório nas primeiras duas horas, diminuindo-se consideravelmente até o último tratamento de 180 minutos de hidrodestilação (Figura8). No início da hidrodestilação é favorecida a extração de compostos oxigenados, pois são de maior solubilidade em água (FRASER; WISH, 1997).

O rendimento do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae foi de 6,07 % (v/m), do qual grande parte foi extraída na primeira hora de hidrodestilação (NAKASHIMA et al., 2005). Os tempos ideais para extração de maior teor de óleo essencial foram 160 minutos para *Lippia sidoides* e 230 minutos para *Eucalyptus globulus* (EHLERT et al., 2000). Diferentes espécie necessitam de tempos específicos de hidrodestilação para se obter melhor rendimento. Para a menta observou-se que o tempo de máxima extração do óleo essencial em aparelho de Clevenger é de 60 minutos (OLIVEIRA et al., 2012).

Os teores de óleo essencial divergentes em relação ao tempo de hidrodestilação na literatura podem ser relacionadas ao tipo de estrutura secretora das espécies produtoras de óleos essenciais, que podem facilitar ou dificultar sua saída dos tecidos que as produzem, bem como as características de sua solubilidade ou

volatilidade, atribuídas principalmente aos compostos terpênicos, metabólitos secundários classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e carotenóides respectivamente. Os monoterpenos são muito voláteis, normalmente, predominantes no óleo essencial (WATERMAN, 1993; MANN, 1994).

Figura 8- Teor de óleo essencial (%) x tempo de hidrodestilação (min).



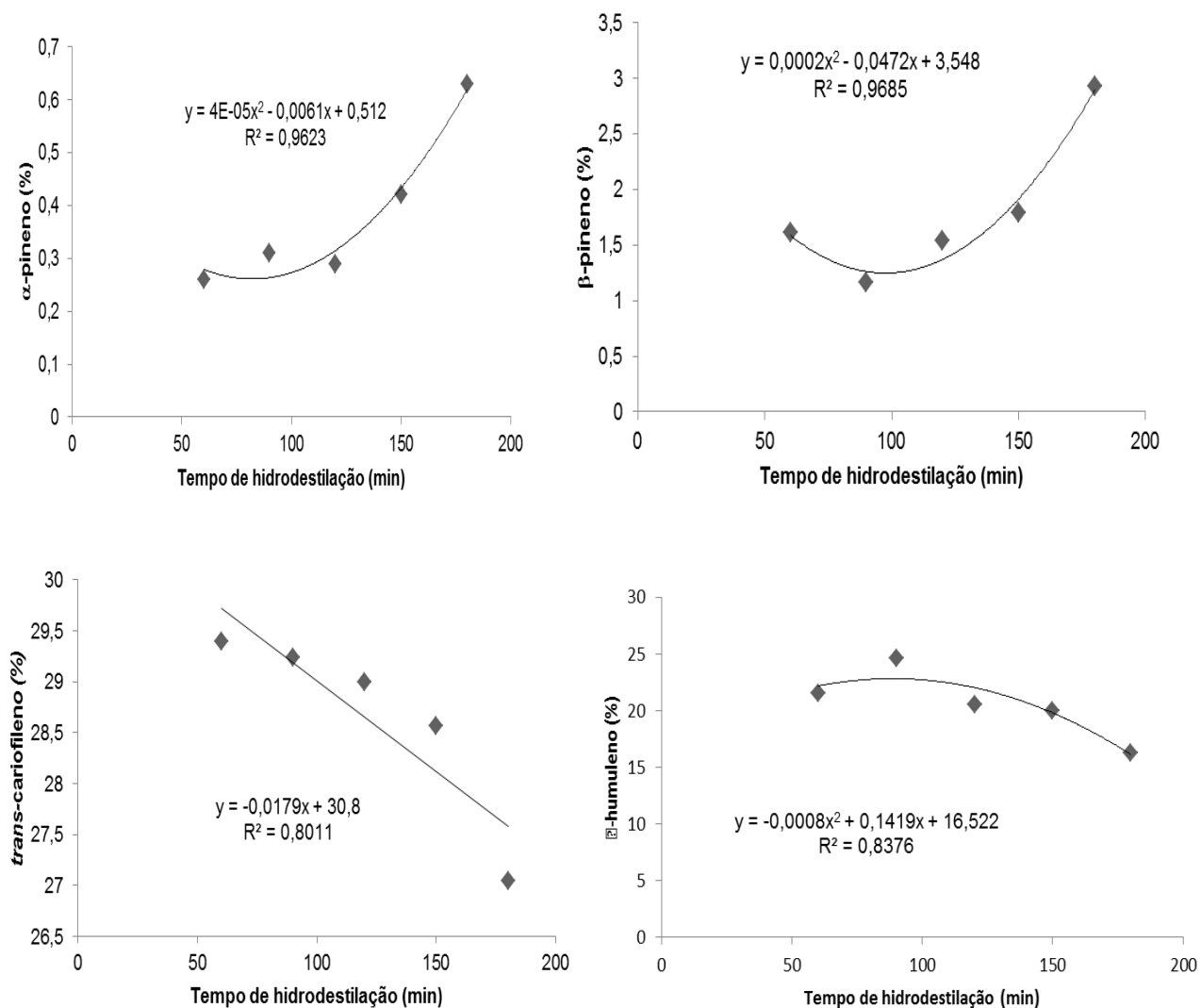
Foram identificadas 14 substâncias, que representa aproximadamente 90% da composição química do óleo essencial do assa-peixe, em sua maioria do grupo dos sesquiterpenos. Não se verificou mudança significativa às proporções relativas (%) das substâncias α -copaeno, β -elemeno e β -copaeno nos diferentes tempos de hidrodestilação (60min, 90 min, 120min e 150min e 180min).

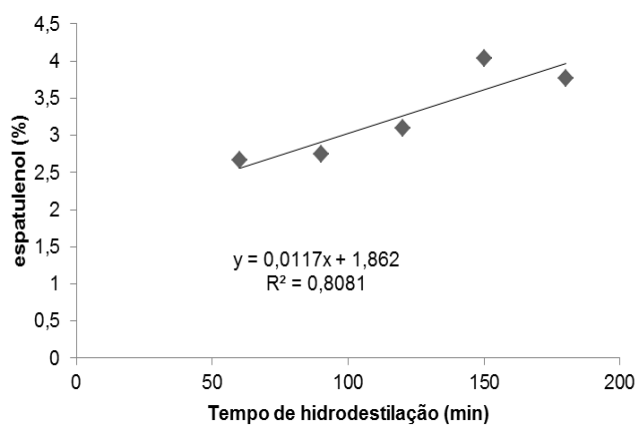
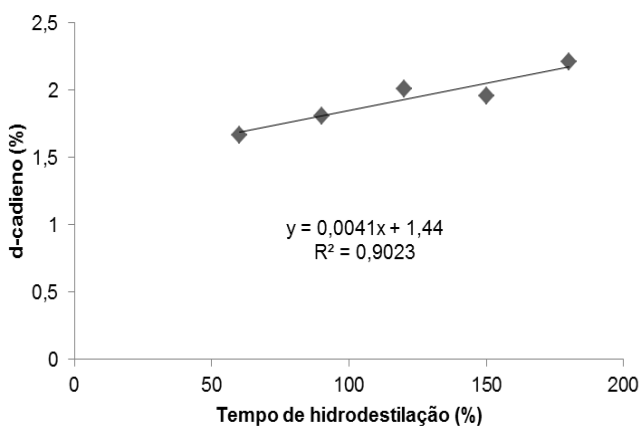
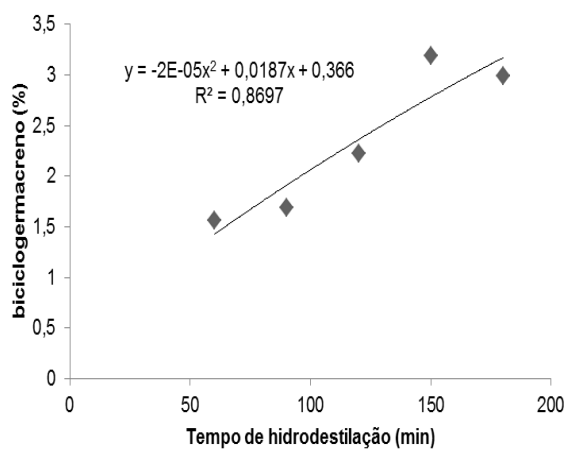
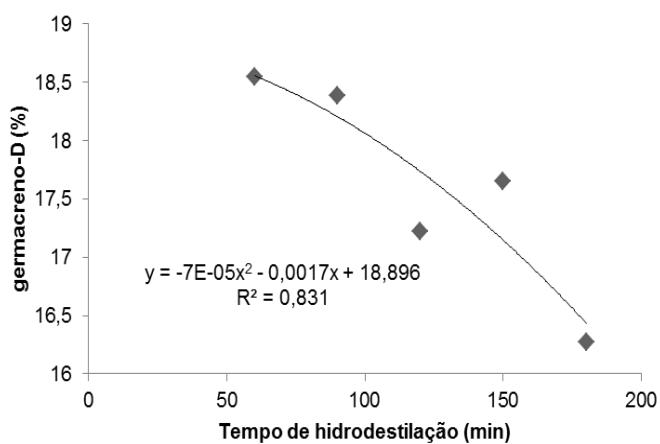
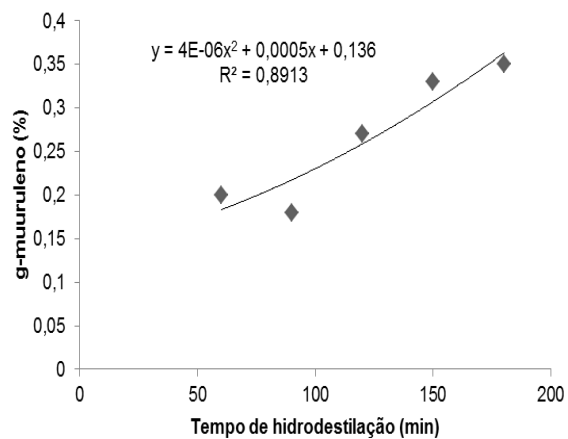
O trans-cariofileno, componente majoritário no óleo essencial, é superior estatisticamente nos quatro primeiros tempos de hidrodestilação (60min, 90 min, 120min e 150min), tendo seu teor reduzido quando submetido a um maior tempo de hidrodestilação. O α -humuleno, Germacreno-D e biciclogermacreno também tiveram comportamento similar, diminuindo sua proporção à medida do aumento do tempo de exposição das folhas à água fervente. As substâncias α -pineno, α -pineno, β -muuroleno, espatulenol e biciclogermacreno foram observados em maiores quantidades no maior tempo de hidrodestilação quando comparadas ao menor tempo (60 min). Este fato pode ser explicado a conversão de algumas substâncias em outras, por exemplo, o germacreno-D pode converter em cadinenos, muurolenos

e elemenos, enquanto que o biciclogermacreno converte-se em sesquiterpenos tricíclicos como aromadendreno, alloaromadendreno e viridifloreno, que por oxidação originam espatulenol, globulol, epiglobulol e cadinóis. O que ocorreu no presente estudo. Outra hipótese é o fato da análise ser baseada na proporção relativa e não na massa molecular de cada substância presente no óleo essencial, o aumento da proporção das demais substâncias conforme o tempo pode acarretar no decréscimo de outras, degradação das substancias (MATANA et al., 2015).

Em alecrim (*R. officinalis*) foi verificado que a concentração dos compostos majoritários α -pineno e β -mirceno foram favorecidos significativamente nos tempos de extração com 90 e 120 minutos em relação aos tempos de 30 e 60 minutos. A hidrodifusão favorece a extração de compostos oxigenados no início da hidrodestilação devido a maior solubilidade deste, porém com o progressivo domínio da volatilidade sobre a hidrodifusão, há uma tendência dos compostos oxigenados apresentarem relativa redução em função do aumento do teor dos compostos mais voláteis, como α -pineno e β -mirceno (PRINS et al. 2006).

Figura 9. Substâncias identificadas e médias de suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de *Vernonia polyanthes* Less. sob tempo de hidrodestilação. Botucatu/SP, 2015





Em experimento realizado em Lavras-MG com a mesma espécie (SILVA et al., 2015), nota-se que apesar do composto majoritário (germacreno D) ser o mesmo em ambos os locais, há diferenças nos níveis de cada substância, demonstrando a influência do ambiente na composição química do óleo essencial. O rendimento de óleo essencial e a concentração de cada um dos constituintes deste óleo podem variar com o desenvolvimento, o ambiente no qual o vegetal se desenvolve também interfere na composição química dos óleos essenciais e no seu rendimento, a temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta na composição e rendimento, e ainda, diferentes órgãos de um mesmo vegetal podem apresentar óleos essenciais com composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos (PRICE; PRICE 1999; SIMÕES; SPITZER 2000).

Espécies do mesmo gênero como a *Vernonia brasiliiana* e *Vernonia remotiflora* também apresentaram no óleo essencial uma pequena fração de monoterpenos, representada por um único constituinte, α -pineno (2,8%) e 1,0%, respectivamente. Como componentes majoritários, no óleo de *V. brasiliiana*, destacam-se também germacreno-D (35,5%) e α -humuleno (11,7%). Biciclogermacreno, com um teor de 35,5%, aparece também como constituinte principal do óleo de *V. remotiflora* (MAIA et al., 2010). Semelhante ao óleo essencial da *V. polyanthes*.

O teor de óleo essencial foi maior na coleta realizada às 13h: 00min, diferindo estatisticamente da coleta das 19h: 00min. Não foi verificada diferenças estatísticas nas médias dos teores de óleo essencial de folhas de plantas de *V. polyanthes* coletadas às 07h00min, 10h00min, 16h00min (tabela 8). A maior produção de metabólitos secundários sob altos níveis de radiação solar são explicadas pelo fato de que as reações biossintéticas são dependentes de suprimentos de esqueletos carbônicos, realizados por processos fotossintéticos e de compostos energéticos que participam da regulação dessas reações (TAIZ; ZEIGER, 2013). Em *Aloysia triphylla*, foi observado maiores teores de óleo essencial em folhas frescas, colhendo-as às 14 e 16 horas. A colheita nos horários de 08, 10, 12 e 18 horas resultou em teores significativamente menores (EHLERT et al., 2003). Em *Cordia curassavica* (Jacq.) Roen. & Schult., não houve diferença significativa no teor de óleo de folhas coletadas às 9, 12, 15 e 18 horas (CORRÊA et al., 2002). Em menta o melhor horário de colheita também ocorreu às 13h00min (OLIVEIRA et al. 2012). Trabalho realizado com *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini, Asteraceae, o melhor

horário de colheita visando maior teor de óleo essencial é na parte da manhã (FONSECA et al., 2007).

Foram encontraram rendimentos de óleo essencial significativamente maiores em material vegetal coletado por volta das 14:00h em *Alpinia zerumbet* (colônia) . Os autores também observaram a estabilidade do perfil químico, que não se alterou diante dos diferentes horários do dia (SANTOS et al., 2012)

Tabela 8. Médias do teor de essencial nos diferentes horários de coleta de *Vernonia polyanthes* Less.. Botucatu, 2015.

Horários de Coleta do Material Vegetal	Médias
	Teor de Óleo Essencial (%)
07h00min	0,27ab
10h00min	0,28ab
13h00min	0,42a
16h00min	0,31ab
19h00min	0,16b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey

Foi observado que em todos os tratamentos o componente majoritário da composição do óleo essencial de *V. polyanthes* foi o Germacreno-D e este não variou significativamente entre os horários de coleta, alcançando média de 28,77% na sua proporção relativa. O trans-cariofileno, o α -humuleno, β - elemeno, g-muuruleno, α -amorfenol e espatulenol também não diferiram, tendo o mesmo comportamento. O biciclogermagreno teve picos de maiores proporções relativas nos horários de 13h00min e 19h00min. O β - pineno e o α -pineno é mais presente nas primeiras horas do dia (tabela 9). A variação de alguns componentes, em relação ao horário de colheita, pode ter sido em virtude da velocidade do metabolismo da planta, da atividade dos sítios de produção de secreção dos e influência das flutuações climáticas diárias. Estes fatores podem afetar a síntese e secreção de óleos essenciais.

A maior proporção relativa de terpenos, principalmente os monoterpenos, no

período de maior radiação fotossinteticamente ativa, pode estar relacionada ao fato de que a biossíntese desses compostos é dependente da fotossíntese (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005).

Tabela 9. Substâncias identificadas e médias de suas proporções relativas (%) em amostras de óleo essencial de *Vernonia polyanthes* Less. sob diferentes horários de coleta. Botucatu/SP, 2015.

Substâncias	7h00min	10h00mi	13h00min	16h00min	19h00min	IRc	IRI
α -pineno	0,64a	0,80a	0,79a	0,71a	0,32b	929	929
β - pineno	4,98ab	6,09a	5,46a	5,49a	2,97b	934	939
α - copaeno	5,99a	5,86ab	5,84ab	5,61ab	5,48b	1377	1376
β - elemeno ^{ns}	4,29	4,31	4,42	4,30	4,42	1388	1390
Trans-cariofileno ^{ns}	13,97	14,08	13,94	13,88	13,80	1420	1419
β -copaeno	0,87a	0,84ab	0,84ab	0,82b	0,84ab	1429	1432
α -humuleno ^{ns}	11,95	12,04	12,08	12,14	12,40	1454	1454
Allo- aromadendreno	2,03a	1,92b	1,95ab	1,88b	1,91b	1461	1460
δ -muuroleno ^{ns}	0,35	0,24	0,26	0,25	0,32	1477	1479
germacreno-D ^{ns}	28,97	28,71	28,47	28,69	29,04	1482	1485
biciclogermacreno	12,34c	12,46bc	13,02a	12,92ab	13,26a	1497	1500
α -amorfeno ^{ns}	0,37	0,34	0,37	0,35	0,37	1514	1512
d-cadineno	1,91bc	1,89c	2,02b	1,98bc	2,17a	1635	1636
espatulenol ^{ns}	2,31	2,10	2,07	2,39	3,11	1577	1578
Total	90,98	91,69	91,54	91,38	90,41		

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey

CONCLUSÃO

O melhor tempo de hidrodestilação de folhas de *V. polyanthes* é 106 minutos, visto que é alcançado o maior rendimento de óleo essencial, sem mudanças na sua composição química. O maior teor de óleo essencial é encontrado as 13h00min, onde o componente majoritário é o germacreno-D.

RERERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oils Components by Gas chromatography/Mass Spectrometry**, 4. ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.

ANDREÃO, A. **Estudo do óleo essencial de *Vernonia polyanthes***. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA-MG, 8., 1999, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: SBQ, 1999. p. 149.

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, p. 73-78, 2005.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. p.1021-1028. 1988.

EHLERT, P. A. D. et al. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.79-80, 2006.

FRASES, S. ; WISHER, J.P.M. A commercial Herb Industry for NSW-an infant Enterprise. Australia. Rural Industries Research Development Corporation. 133p. 1997.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

MATTANA, R.S. et al. Efeitos de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial de folhas de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.]. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.1, p.150-156, 2015.

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

NAKASHIMA, J. F. T. et al. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo., v.15, p.191-194, 2005.

OLIVEIRA, A. R. M. F. et al. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**, v.30, p.155-159, 2012.

PRICE S, PRICE L 1999. **Aromatherapy for health professionals**. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone.

PRINS, C. L. et al. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.92-95, 2006.

SILVA, J. L. et al. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants research**, v. 9, p.243-253, 2015.

SILVA, A. I. V. et al. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 584-586, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. cap. 18, p. 467-495.

SIMÕES CMO, SPITZER V. Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCPD, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 387-415, 2000.

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

WATERMAN, P. G. **The chemistry of volatile oils**. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. Essex: Longman Group, p.41-61, 1993.

3. CONCLUSÃO GERAL

Os eventos fenológicos da população de *Vernonia polyanthes* interferem na fitoquímica e na morfoestrutural foliar. Maiores teores de óleo essencial e compostos fenólicos são encontrados na preflorescência, quando as folhas estão senescentes. No entanto, o perfil químico do óleo essencial sofre algumas mudanças durante as quatro épocas avaliadas. A espécie é rica em sesquiterpenos. As três substâncias majoritárias trans-cariofileno, espatulenol e Germacreno-D. Em folhas mais jovens o Germacreno-D é o componente majoritário, enquanto que em folhas mais velhas nota-se a predominância de espatulenol e o trans-cariofileno. Ao que se diz respeito ao tempo de hidrodestilação e horário de coleta os melhores teores são encontrados aos 106 minutos de extração e as 13h00min, respectivamente, também sofrendo pequenas alterações do perfil cromatográfico. Substâncias monoterpênicas são encontradas em maiores concentrações nas primeiras horas do dia.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. M.; ALVES, M. A. S. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. brasiliensis* (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica do sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 14, p. 335-346, 2000.

ALZUGARAY, D & AZUNGARAY, C. 1984. Flora Brasileira – Primeira Enciclopédia de Plantas do Brasil. 1:65-66.

AMOROZO, M. C.M.; GELY, A. **Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas; Barcarena: PA**; Museu Paraense Emílio Goeldi, 1988, 4, p. 47.

ANDREAO, A.; DA SILVA, P.S.; NASCIMENTO, E.A. La educacion a traves de la investigation-proyecto *Vernonia polyanthes*. **Revista Cubana de Educacion Superior**. Word Count, 161, 2003.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMA-LIMA, C.A.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A.R.M. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, p. 545–551, 2007.

BATALHA, M.A., ARAGAKI, S. & MANTOVANI, W. 1997. Variações fenológicas das espécies do cerrado em Emas (Pirassununga, SP). **Acta Botanica Brasilica**.v. 11, p. 61-78

BATISTA, L. A. et al. Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de cultivares de café ao estresse hídrico. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 03, p. 475-481, 2010.

BONET, M.A. **Estudi etnobotànic del Montseny. Aspectes metodològics**. Ponències, anuari del Centre d'Estudis de Granollers, 1998, pp. 133-158.

BOSABALIDIS, A.M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive Cultivars. *Plant Science*, v.163, p. 375-379, 2002.

BRASIL 2006 a. Ministério da Saúde. **Portaria no. 971, de 03 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 04 mai. 2006.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Bioma Cerrado. Disponível no www.mma.gov.br/biomas/cerrado . Acessado em 02 de novembro de 2016.

BRASIL 2006 b. Presidência da República. **Decreto no. 5813.CF**

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol.** 2006, 11, 396–402.

BREMER, K. **Asteraceae, cladistics e classification**. Portland: Timber Press. 1994. 752p.

BROOKS, J.S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochem. Syst. Ecol.** v.32, p.769. 2004

CABRERA, A. L; KLEIN, R. M. Fascículo Composta. Tribo Veminiaceae in REITZ, R. Flora Ilustrada Catarinense. **As plantas, Parte I**. Itajaí, p.324-326, 1980.

CAMACHO, M.; OROZCO, L. Patrones fenológicos de doce especies arbóreas del bosque montano de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 3, p. 533-542, 1998.

CAMARGO, M.T.L.A. **As plantas medicinais e o sagrado: A etnofarmacobotânica em uma revisão historiográfica da medicina popular no Brasil**. 1ªed. São Paulo, Ícone, 2014.

CARVALHO et al. Pigmentos e nutrientes foliares em decíduas e sempre-verdes de Cerrado. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.1, p.19-27, jan.-mar. 2007.

CARVALHO, C.C. O poder das palavras, às palavras do poder. **Revista portuguesa de psicossomática**. Sociedade Portuguesa de Psicossomática v.6,n.001,p.55-62.2004.

CASTELLANI, T.T., et al. Fenologia de uma comunidade de duna frontal no sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v.13, n.1, p. 99-114.1999.

CASTRO, MM & MACHADO, SR 2006. Células e tecidos secretores. In **Anatomia vegetal** (Appenzato-da-Glória, B & Carmello-Guerreiro, SM eds). Universidade Federal de Viçosa, 2ed.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estrutura e Função de Órgãos Vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CARVALHO JÚNIOR, W.G.O.; et al. Fenologia do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em área de Cerrado, no norte de Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.223-229, 2011.

CUNHA, et al. **Plantas aromáticas em Portugal- Caracterizações e utilizações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2007.

DEMATTEIS, M. FERNÁNDEZ, A. **Chromosome studies on nine South American**. 2000.

DIAS, J.P.S. História da farmácia e dos medicamentos. Ricardo Fernandes de Menezes (Org) Disponível em www.acd.ufjf.br/consumo/leituras/lm_historiafamaciamed.pdf . Acesso em 29 de outubro de 2016.

DICKISON WC. 2000. **Integrative Plant Anatomy**. Academic Press, New York, London, Tokyo.

FAHN A. 1990. Plant Anatomy. 4th Edition. Pergamon Press, Oxford.

FAHN A. Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London, New York, San Francisco.

FERREIRA, M. G. M. et al. Efeito do sombreamento na produção de mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Árvore**, v.1, n. 2, p. 121-133, 1977.

FOURNIER, L. A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, San José, v. 25, n. 4, p. 422-423, 1974.

GRACE, S. C., et al. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. **Plant Cell Environ.** v. 21, p.213, 1998.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuaí' e 'Siriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 06, p. 1730-1736, 2008.

GUILHERME, F.A.G. et al. Fenologia de *Cyrtanthus antisiphilitica* (MART.) MART. (Bignoniaceae) na região urbana de Jataí, Goiás. **Biosci. J.**, v. 27, n. 1, p. 138-147, 2011.

HEIDEN, G. et al. A família Asteraceae em São Mateus do Sul, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.249-251, 2007.

HEYWOOD, V. H.; **Flowering plants of the world**, Oxford University Press: New York, 1993.

JALAL, M.A., et al. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. **Phytochemistry**, v.21, p.1397. 1994.

KERSLAKE, J.E. e HARTLEY, S.E. Phenology of winter moth feeding on common heather: effects of source population and experimental manipulation of hatch dates. **Journal of Animal Ecology**. v.66, p.375-385, 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LELIS, S.M. **Biologia reprodutiva de Bidens segetum Mart. ex Colla (Heliantheae, Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado) Botânica, Universidade Federal Viçosa, 45p, 2008.

LIETH, H.; SCHULTZ, G. Contributions from biometeorological workshops focusing on seasonality. **Journal of Biogeography**, New York, v. 3, p. 229, 1976.

LIU QH, YANG JS, SUO MR. Progress in study on the chemical constituents about sesquiterpene lactones and steroidal saponins from genus *Vernonia* and their pharmacological activities. **China J Chin Mater Med**, v.32, p.10–7, 2007.

LOPES, A.M. Estudo da primeira centúria de Amato Lusitano. O uso das plantas, imagens de aromáticas da região da Serra da Estrela: abordagem da sua composição. 2004. Disponível em www.historiadamedicina.ubi.pt/cadernos . Acesso em 29 de outubro de 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MAIA, A.I.V. et al. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v.33, p.584-6, n.3, 2010.

MARTIUS, F.P.V. Natureza, doenças, medicina e remédios dos índios brasileiros (1844) 2ª Ed. Rio de Janeiro: Nacional, 1979.

MENDONÇA, R. C. et al. Flora vascular do cerrado. In- **Cerrado: Ambiente e Flora**, ed. S. M. Sano and S. P. Almeida. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Distrito Federal, pp. 289-556, 1998.

METCALFE PG. 1993. **Anatomy of the Dicotyledons**. II. Wood Structure and Conclusion of General Introduction. 2 nd. Edn. Clarendon Press, Oxford

MISEREZ, F. et al. Flavonol glycosides from *Vernonia galamensis* ssp. Nairobiensis. **Phytochemistry**, v.43, p.283-286, 1996.

MONASTERIO, M. & SARMIENTO, G. Phenological strategies of plant species in the tropical savanna and the semi-deciduous forest of the Venezuelan Llanos. **Journal of Biogeography** v.3, p. 325-355, 1976.

MOONEY, H. A. et al. The study of physiological ecology of tropical plants – current status and needs. **BioScience**, v. 30, p. 22-26, 1980.

MURARO, R.M. **Breve introdução histórica**. In: Kramer Heinrich, Sprenger, James. O martelo das festiceiras- Malleus Maleficarum. Rio de Janeiro: Rosa dos Tempos. 1991.

NAKAJIMA, J.; SEMIR, J. Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.4, p.471-478. 2001

NETO, G.G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Bras.** 2003 (17): 561-584.

NEVES, E. L.; FUNCH, L. S.; VIANA, B. F. Comportamento fenológico de três espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) da Caatinga, semi-árido do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 155-166, 2010.

NEWSTROM, L. E.; FRANKIE, G. W.; BAKER, H. G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, Zurich, v. 26, n. 2, p. 141-159, 1994.

NIJS, H. C. M.; MENKEN, S. B. J. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. In: CALIGARI, P. D. S.; HIND, D. J. N. **Compositae: Systematics**. Royal Botanic Gardens: Kew, p. 665-677, 1996.

OLIVEIRA, D.G.; et al. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007, 28, 165–169.

OMS .**Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales**. Genebra:OMS. 2003

PEREIRA, et al. Fenologia de espécies arbóreas em Floresta Atlântica da Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 329-339, jul./dez. 2008.

PIRANI, J.R., SANCHEZ, M. & PEDRONI, F. Fenologia de uma comunidade arbórea em cerrado sentido restrito, Barra do Garças, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v, 23, p. 1096-1109, 2009

PITAREVIC,I., et al. Seasonal variation of essential oil yield and composition of dalmatian sage, *Salvia officianlis*. **J. Nat. Prod.**v.47,p.409. 1984.

PRANCE, G. T. **Out of the Amazon**; HMSO: London, 1992, p. 83.

RAMOS, F. N.; SANTOS F. A. M. Phenology of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae) in Atlantic forest fragments: fragments and habitat scales. **Canadian Journal of Botany**, Ontario, v. 83, p. 1305-1316, 2005.

RIZZINI,T.C.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. 3 ed. São Paulo: Âmbito Cultura. 1995

RODRIGUES, H.L. **Anchieta e a Medicina**. 2ªed. Belo Horizonte/MG: Biblioteca Mineira de Cultura, 1934. Edição Apollo.

RODRIGUES, V.E .G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande . Minas Gerais. **Ciênc. Agrotec.** 2001 (25): 102-123.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 05, p. 1035-1042, 2001.

SANMARTIN-GAJARDO, I.; MORELLATO, L. P. C. Fenologia de Rubiaceae do sub-bosque em Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, p. 299- 309, 2003.

SCHLUTER, U. et al. Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.383, p.867-874, 2003.

SCHWOB, et al. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochem. Syst. Ecol.** v.32, p.735. 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248

SIEMANN, E. et al. Experimental tests of the dependence of arthropod diversity on plant diversity. **American Naturalist**. v.152, n.5, p.738-750.1998.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós colheita e óleos essenciais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 2000.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 1, 183-194 p., 2005.

SILVA, C. S. P.; SANTOS, M. L. Comportamento fenológico no evento pós-queima e biologia reprodutiva de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. (Rutaceae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 1, p. 29-39, 2008.

SILVA, I.A., et al. 2011. Reproductive phenology of Brazilian savannas and riparian forests: environmental and phylogenetic issues. **Annals of Forest Science**, v. 68, p. 1207-1215.

SILVEIRA, R.R.; FOGLIO, M.A.; GONTIJO, J.A. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine** 2003, 10, 127–131.- b

SILVEIRA, R.R.; RÚBIO, C.R.; ALVES, M.J.Q.F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após administração de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less). **Rev. Bras. Plantas Med.** 2003, 2, 31–35-a.

SINGH–SANGWAN, N. et al. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. **New Phytol.**, Cambridge, v. 128, p. 173-179, 1994.

SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant and Cell Physiology**, v.54, n. 6, p.817-826, 2013.

SOUSA, L. A. et al. Sazonalidade dos ductos secretores e óleo essencial de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* Mill. (Apiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, p.155-161, 2005.

SOUSA, L.A. et al. Características Fenológicas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (1836) – Asteraceae – no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, n.1, p.112-116, 2014.

SOUZA, T. C. et al. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to soil flooding. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 01, p. 16-24, 2010.

SOUZA, G. S. et al. Estrutura foliar e de cloroplastídeos em *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 05. p. 78-80, 2007. Suplemento

STRONG, D.R. et al. **Insects on plants. Community Patterns and Mechanisms**. Oxford. Blackwell Science Publications.1984.

TANAY, A.E. Esforço biográfico de Guilherme Piso (1611-1678).In: **Piso, Guilherme. História do Brasil ilustrada**. São Paulo: Nacional, 1948.

TEIXEIRA-SANTOS, I. **Resíduos alimentares, infecções parasitárias e evidência do uso de plantas medicinais, em grupos pré-histórico das Américas**. (Dissertação de Mestrado) –Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,2010.

VAGIONAS, K. et al. Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 105, p.1711-1717, 2007.

VAN SCHAIK, C.P., et al. The phenology of tropical forests: adaptative significance and consequences for primary consumers. **Annual Review of Ecology and Systematics** v. 24, p.353-377,1993.

VENTRELLA, M.C. Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. 2000. 95 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciência Agronômica/Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

VERDI, L. G. et al. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 1, 85-94, 2005.

WILT,F.M; MILLER, G.C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of Wyoming big dagebrush (*Artemisia tridentate* ssp. wyomingensis: Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**v.20,p.53. 1992.

WRIGHT, S. J. & CALDERON, O. Phylogenetic patterns among tropical flowering phenologies. **Journal of Ecology**, v. 83,p.937-948, 1995.

YUKAWA, J. Synchronization of gallers with host plants phenology. **Population ecology**. v.42, n.2, p. 105-113. 2000.

ZIDORN, C; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**. v. 50,p.115. 2001.