



BRUNA PAULA DA CRUZ

**COMPARAÇÃO DA ANATOMIA FOLIAR E
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Drimys brasiliensis*
MIERS (WINTERACEAE) EM UMA FLORESTA
OMBRÓFILA Densa ALTOMONTANA**

**LAVRAS – MG
2013**

BRUNA PAULA DA CRUZ

**COMPARAÇÃO DA ANATOMIA FOLIAR E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Drimys brasiliensis* MIERS (WINTERACEAE) EM UMA FLORESTA
OMBRÓFILA Densa ALTOMONTANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro

**LAVRAS – MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Cruz, Bruna Paula da.

Comparação da anatomia foliar e dos óleos essenciais de *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana / Bruna Paula da Cruz. – Lavras : UFLA, 2013.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. *Drimys brasiliensis* - Anatomia foliar. 2. *Drimys brasiliensis* - Óleos essenciais. 3. Floresta Nebular - Altitude. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.11404497

BRUNA PAULA DA CRUZ

**COMPARAÇÃO DA ANATOMIA FOLIAR E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Drimys brasiliensis* MIERS (WINTERACEAE) EM UMA FLORESTA
OMBRÓFILA Densa ALTOMONTANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de setembro de 2013.

Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Dra. Aristéa Alves Azevedo	UFV
Dra. Ricarda Riina	CSIC/ESPANHA

Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

Aos meus amados pais, Marta e Ronaldo.

À minha querida irmã, Tatiana.

Ao meu companheiro e noivo, Vinícius.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida e me guiar em todos os momentos.

Aos meus amados pais, Marta e Ronaldo, por nunca deixarem de acreditar em mim e por me darem força e carinho todos os dias.

À minha querida irmã, Tatiana, pela amizade, inspiração e por me guiar no caminho do bem.

Ao meu amado noivo, Vinícius, por me acompanhar em cada dia dessa vitória, por me aconselhar, compreender e amar.

Aos meus familiares, pelo carinho e orações.

À Silim, por me proporcionar muitas alegrias sempre.

Aos meus eternos mestres Daniel e Luciana, por inspirarem o meu amor pelos estudos.

Ao professor Evaristo e à professora Graça, por acreditarem no meu trabalho, por toda a atenção, ensinamentos e incentivo, e principalmente, por me acolherem e devolverem a mim a esperança. A vocês, meu mais estimado agradecimento.

Às minhas queridas amigas do Departamento de Química, Lidiany, Shirley, Ana Cristina, Mayra e Cristina, por estarem comigo em todos os dias deste trabalho e compartilharem minhas conquistas e dificuldades.

Aos meus chefes, Nadiel e Mário, por incentivarem meus estudos.

Aos meus colegas professores e técnicos do Departamento de Química, pela convivência amigável.

Aos meus companheiros da Botânica, por me ajudarem das mais diversas formas e por serem, assim como eu, amantes da natureza.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia e do Laboratório de Óleos Essenciais do Departamento de Química, por fazerem parte deste trabalho e me ajudarem sempre.

À Patrícia, Wedley e Katiúscia, por me acompanharem nas coletas de campo e fazerem parte desta aventura nas montanhas.

À Professora Samísia (UFS), pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pelos ensinamentos e disciplinas valiosos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia e ao Departamento de Química, que me permitiram realizar este trabalho.

E a todos que, de alguma forma, ajudaram-me e fizeram este trabalho possível.

RESUMO

Drimys brasiliensis Miers é nativa do Brasil, onde é encontrada principalmente em florestas de altitude e áreas alagadas do sul e sudeste. Objetivou-se neste trabalho comparar a anatomia foliar e a constituição química dos óleos essenciais de *D. brasiliensis* presente em duas cotas altitudinais (1900 e 2100 m), em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG. O material vegetal foi coletado a partir de quatro indivíduos/cota de altitude. A caracterização da anatomia foliar foi realizada, obtendo-se secções paradérmicas e transversais para a realização de análise estomática e medição da espessura dos tecidos foliares. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott. Também foram realizados testes histoquímicos e microscopia eletrônica de varredura. As extrações dos óleos essenciais foram realizadas por hidrodestilação, e a identificação e quantificação dos constituintes por cromatografia em fase gasosa. Para verificar a similaridade entre os óleos quanto às proporções de seus constituintes, foi utilizada a análise de componentes principais. Observou-se maior número de esclereídeos no mesófilo das folhas a 1900 m de altitude. A 2100 m, observou-se a formação de papilas na superfície abaxial das folhas, o aumento da densidade e índice estomáticos, a diminuição da espessura dos tecidos foliares e o aumento de espaços intercelulares no mesófilo. Essas características parecem otimizar a absorção de CO₂ a 2100 m, onde ocorre diminuição na pressão parcial desse gás atmosférico. Foram identificados 59 constituintes nos óleos da espécie, com predominância dos sesquiterpenos. Ocorreu o favorecimento da biossíntese de álcoois sesquiterpênicos a 1900 m, e de fenilpropanóides e da epi-ciclocolorenona, a 2100 m.

Palavras-chave: *Drimys brasiliensis*. Altitude. Floresta Nebular. Óleos essenciais. Anatomia foliar.

ABSTRACT

Drimys brasiliensis Miers is native to Brazil, where it is mainly found in montane forests and wetlands of the south and southeast regions of the country. The objective of the present work was to compare the leaf anatomy and the chemical constitution of the essential oils of *D. brasiliensis* present in two altitude levels (1900 and 2100 m), in a Montane Cloud Forest, in Itamonte, MG. The plant material was collected from four individuals/altitude level. The characterization of the leaf anatomy was carried out by obtaining paradermal and cross sections to perform the stomatal analysis and to measure the thickness of the leaf tissues. The data were submitted to a variance analysis and to the Scott-Knott test. Histochemical tests have also been carried out, as well as scanning electron microscopy. The essential oils extractions have been carried out by hydrodistillation and the identification and the quantification of the constituents by gas chromatography. In order to check the similarity among the oils regarding the proportion of their constituents, principal component analysis has been used. Higher number of sclereids was noted in the mesophyll of the leaves at 1900 m altitude. At 2100 m, the formation of papillae was noted on the abaxial surface of the leaves, as well as an increase in the stomatal density and index, the reduction of the leaf tissues thickness and an increase in the intercellular spaces of the mesophyll. It seems that these characteristics optimize the CO₂ absorption at 2100 m, where there is a reduction in the partial pressure of this atmospheric gas. Fifty-nine constituents have been identified in the species oils, with the predominance of sesquiterpenes. The biosyntheses of sesquiterpene alcohols at 1900 m, and phenylpropanoids and epicyclocolorenone at 2100 m, were favored.

Keywords: *Drimys brasiliensis*. Altitude. Cloud Forest. Essential oils. Leaf anatomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto geral das folhas de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers.....	18
Figura 2	Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.....	21
Figura 3	Representação química básica de um fenilpropanoide.....	24
Figura 4	Estrutura química do isopreno.....	25
Figura 5	Foto de um dia típico na área de estudo, evidenciando o nevoeiro constante nas florestas nebulares.....	32
Figura 6	Processo de extração dos óleos essenciais (hidrodestilação).	36
Figura 7	Secções transversais de folhas de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers coletadas a 1900 m (a, c, e) e 2100 m (b, d, f) de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG, evidenciando a nervura central das folhas (c, d), os esclereídeos (e) e a epiderme papilosa (f). E = Esclereídeo, P = Papila. Barras: 50 µm (a, b, c, d, f), 20 µm (e).....	41
Figura 8	Secções paradérmicas de folhas de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers coletadas a 1900 m (a, b) e 2100 m (c) de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG. PL = <i>Plugs</i> estomáticos, P = Papila. Barras: 10 µm.....	42
Figura 9	Secções transversais de folhas de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers coletadas a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana em Itamonte, MG, evidenciando reações positivas com Sudan IV para identificação de lipídeos totais (a, c) e reação positiva com reagente de NADI para identificação de óleos essenciais (b). I = Idioblasto secretor, C = Cavidade secretora. Barras: 10 µm..	43
Figura 10	Microscopia Eletrônica de Varredura. Superfície abaxial de	

	folhas de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers coletadas a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG, evidenciando a epiderme papilosa.....	44
Figura 11	Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers. (a) Hinesol; (b) β -Eudesmol; (c) α -Eudesmol; (d) Elemol; (e) Epiciccolorenona; (f) α -Pino; (g) Safrol.....	60
Figura 12	Constituintes majoritários dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	61
Figura 13	Constituintes majoritários dos óleos essenciais de folhas secas (FS) de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	61
Figura 14	Constituintes majoritários dos óleos essenciais de caules frescos (G) de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	62
Figura 15	Estruturas químicas da ciccolorenona (a) e da epiciccolorenona (b).....	64
Figura 16	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores para os óleos essenciais de folhas frescas (FF), folhas secas (FS) e caules frescos (G) de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG, em relação às proporções de seus constituintes químicos.*Os constituintes correspondem aos números apresentados na Tabela 4.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise estomática de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	47
Tabela 2	Espessura dos tecidos foliares de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	50
Tabela 3	Rendimento dos óleos essenciais de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.	53
Tabela 4	Composição química dos óleos essenciais de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	55

LISTA DE SIGLAS

ACP	Análise de Componentes Principais
BLU	Base Livre de Umidade
CG-DIC	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CO ₂	Dióxido de Carbono
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
FAL	Fenilalanina Amonialiase
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
O ₂	Gás Oxigênio
SISVAR	Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados
UV	Radiação Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
mL	Mililitros
g	Gramas
p/p	Peso/peso
μL	Microlitros
m	Metros
mm	Milímetros
μm	Micrômetros
ha	Hectare
km	Quilômetro
mm ²	Milímetros quadrados
cm	Centímetro
eV	Eletronvolt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	<i>Drimys brasiliensis</i> Miers (Winteraceae).....	17
2.2	Metabolismo secundário.....	19
2.3	Óleos essenciais.....	22
2.4	Óleo essencial de <i>Drimys</i> sp.....	25
2.5	Influência da altitude na produção de metabólitos secundários e nas características anatômicas de espécies aromáticas.....	26
2.6	Florestas de altitude da Serra da Mantiqueira - Bioma Mata Atlântica.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Coleta do material vegetal de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers.....	31
3.2	Caracterização da anatomia foliar.....	32
3.2.1	Testes Histoquímicos.....	34
3.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	34
3.3	Extração dos óleos essenciais.....	35
3.3.1	Determinação da Umidade.....	36
3.3.2	Cálculo do rendimento das extrações.....	37
3.4	Identificação e quantificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais.....	37
3.5	Dados microclimáticos.....	38
3.6	Análises estatísticas.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	Caracterização da anatomia foliar.....	40
4.2	Caracterização química dos óleos essenciais.....	52
4.2.1	Rendimento dos óleos essenciais.....	52
4.2.2	Composição química dos óleos essenciais.....	54
4.2.3	Análise de Componentes Principais (ACP).....	64
5	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Na Serra da Mantiqueira, domínio da Mata Atlântica, estão localizadas florestas de altitude que podem ser classificadas como nebulares, por estarem parcialmente cobertas pelo nevoeiro em grande parte do ano (WEBSTER, 1995). Essas florestas representam ecossistemas de elevada biodiversidade e endemismo que, geralmente, encontram-se fragmentados e ameaçados e abrigam uma vegetação ainda pouco estudada e conhecida (ALDRICH et al., 1997; BERTONCELLO et al., 2011). Pesquisas de Bertoncello et al. (2011) mostraram que *Drimys brasiliensis* Miers foi considerada uma das espécies indicadoras das florestas nebulares do Sul e Sudeste do Brasil. Além disso, trabalhos de Meireles, Shepherd e Kinoshita (2008) sugeriram que a espécie apresenta seu melhor desenvolvimento em ambientes altimontanos.

D. brasiliensis é uma espécie aromática pertencente à família Winteraceae. É nativa do Brasil, onde é popularmente conhecida como cataia ou casca-d'anta e é encontrada principalmente em florestas de altitude e áreas alagadas do Sul e Sudeste (LORENZI; MATOS, 2008; SOUZA; LORENZI, 2008). A espécie possui uma estrutura anatômica peculiar entre as angiospermas da flora brasileira, já que não apresenta elementos de vaso no xilema e os poros estomáticos são obstruídos com *plugs* compostos de cutina e cera (FEILD; ZWIENIECKI; HOLBROOK, 2000; SOUZA; LORENZI, 2008; MARQUÍNEZ et al., 2009).

A cataia produz um óleo essencial rico em sesquiterpenos que despertam a atenção pela variedade de atividades biológicas que apresentam, como atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica e antifúngica (LIMBERGER et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; LAGO et al., 2010). Sabe-se que a produção dos óleos essenciais nas plantas e demais metabólitos secundários é constantemente influenciada pelos fatores ambientais (GOBBO-

NETO; LOPES, 2007), que também provocam modificações nas estruturas anatômicas foliares dos vegetais (KOFIDIS; BOSABALIDIS; MOUSTAKAS, 2007; ZARINKAMAR; TAJIK; SOLEIMANPOUR, 2011). Nas florestas de altitude, a pressão atmosférica, a temperatura, a radiação, a umidade e a velocidade do vento são alguns dos fatores que sofrem alterações com a elevação da altitude e influenciam diretamente a vegetação (KÖRNER, 2007).

Avaliações da anatomia foliar, como análises de densidade e índice estomáticos, são essenciais na compreensão das trocas gasosas entre as plantas e a atmosfera, e tornam-se relevantes, principalmente se são considerados os novos cenários de mudanças climáticas para o futuro (ZHOU et al., 2012), com o aumento da concentração de CO₂ atmosférico, entre outros impactos (JOLY, 2007). Objetivou-se neste trabalho comparar a anatomia foliar e os óleos essenciais de *Drimys brasiliensis* Miers presente em duas cotas altitudinais (1900 e 2100 m), em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana na Serra da Mantiqueira, em Itamonte, MG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae)

A família Winteraceae foi inicialmente descrita por Lindley em 1836 e, atualmente, compreende 5 gêneros (*Drimys*, *Pseudowintera*, *Takhtajania*, *Tasmannia* e *Zygogynum*), com aproximadamente 79 espécies. Essas espécies encontram-se distribuídas pela Austrália, Tasmânia, Bornéu, Celebes, Molucas, Nova Caledônia, Nova Guiné, Nova Zelândia, Madagascar, Filipinas, América do Sul e América Central (MARQUÍNEZ et al., 2009). As Winteraceae foram consideradas durante muitas décadas como “angiospermas primitivas”, pela ausência de elementos de vaso no xilema e por possuírem carpelos plicados. Entretanto, os estudos filogenéticos indicam que essas características são derivadas (FEILD; ZWIENIECKI; HOLBROOK, 2000; FEILD; HOLBROOK, 2000; SOUZA; LORENZI, 2008; MARQUÍNEZ et al., 2009).

Outras características peculiares da família Winteraceae são a presença de cutículas espessas, estômatos localizados na superfície abaxial das folhas e a obstrução dos poros estomáticos com *plugs* compostos de cutina e cera. Esses *plugs* são responsáveis pela reflexão esbranquiçada das superfícies abaxiais das folhas das Winteraceae. Essas características foram consideradas por muitos anos como xeromórficas e, aparentemente, atuam como estratégias que evitariam a perda de água e compensariam o sistema de condução de água (baseado em traqueídes) das Winteraceae. No entanto, tais características parecem estar relacionadas à adaptação dessas plantas a ambientes úmidos, como as florestas nebulares. As estruturas hidrofóbicas da superfície foliar impediriam o encharcamento excessivo das folhas, possibilitando as trocas gasosas em plantas que crescem em ambientes com a presença constante de

nevoeiro (FEILD et al., 1998; FEILD; ZWIENIECKI; HOLBROOK, 2000; FEILD; HOLBROOK, 2000).

O gênero *Drimys* compreende cerca de 4 a 6 espécies de arbustos e árvores (LIMBERGER et al., 2007), e é o único gênero nativo do Brasil entre os representantes da família Winteraceae. No Brasil, são encontradas duas espécies: *Drimys brasiliensis* Miers, principalmente em áreas alagadas e em florestas de altitude do Sudeste e Sul do país, e *Drimys angustifolia* Miers, que é um pouco mais restrita ao Sul (SOUZA; LORENZI, 2008).

D. brasiliensis ocorre na faixa de 750 a 2550 m de altitude (TROPICOS, 2013), é uma espécie aromática, representada por árvores ou arbustos grandes. É popularmente conhecida no Brasil como cataia ou casca-d'anta e possui folhas simples, de 8 a 12 cm de comprimento, com reflexão esbranquiçada na superfície abaxial (Figura 1) e flores brancas e pequenas reunidas em inflorescências terminais. Possui fruto pequeno, do tipo cápsula, de cor verde-amarelada, com muitas sementes pretas brilhantes (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 1 Aspecto geral das folhas de *Drimys brasiliensis* Miers.

D. brasiliensis possui uma madeira peculiar entre as angiospermas da flora brasileira, já que não apresenta elementos de vaso no xilema. A estrutura anatômica do caule compõe-se de traqueídes longitudinais, parênquima axial e raios (ABREU et al., 2005).

Na medicina tradicional, infusões das cascas do caule de espécies do gênero *Drimys* são utilizadas para o tratamento de úlcera, câncer, afecções do trato respiratório e como substituto do quinino no tratamento da malária e febres de outras origens (LIMBERGER et al., 2007).

Lorenzi e Matos (2008) relataram que a espécie *D. brasiliensis* é reconhecida em todo o mundo pelas propriedades carminativas, estomáquicas e tônicas de sua casca. Tradicionalmente, no Brasil, a espécie é recomendada para todos os tipos de problemas gástricos e estomacais, incluindo dispepsia, disenteria, náuseas, dores intestinais e cólicas, além de febres e anemia. A espécie também é considerada sudorífica, antiescorbútica, antiespasmódica (para cólicas intestinais), expectorante na bronquite crônica, sendo especialmente indicada como tônico revigorante durante convalescença.

2.2 Metabolismo secundário

O metabolismo primário é responsável pela síntese de moléculas essenciais à vida, como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Os organismos apresentam um alto grau de similaridade nos processos metabólicos associados a essas moléculas. Esse metabolismo também é descrito por alguns autores como metabolismo intermediário, ou seja, composto pelos processos envolvidos na transformação de moléculas de nutrientes nas unidades constitutivas essenciais de cada célula (SANTOS, 2004).

Em contrapartida, o metabolismo secundário está presente em um grupo mais restrito de organismos e representa a “individualidade” de cada espécie.

Esses metabólitos não são produzidos em todas as condições e, muitas vezes, sua função para o organismo produtor ainda é desconhecida; porém, sabe-se que eles desempenham papel vital no bem-estar do produtor (DEWICK, 2002).

Os metabólitos secundários foram considerados por muitos anos como produtos de refugo metabólico, ou produtos de excreção vegetal. Atualmente, sabe-se que esses metabólitos desempenham uma variedade de atividades essenciais à vida dos vegetais. Alguns atuam na defesa contra a herbivoria e micro-organismos, outros na proteção contra a radiação danosa, principalmente a radiação UV, outros na atração de polinizadores (SANTOS, 2004). Esses metabólitos fornecem ao homem uma variedade de produtos naturais farmacologicamente ativos, podendo também ser potencialmente tóxicos (DEWICK, 2002).

Gottlieb (1990) designou o metabolismo secundário como “metabolismo especial”, visando a representar sua essencialidade à vida dos vegetais. Em memória a esse pesquisador, recentemente foi publicado um trabalho que relaciona a função dos metabólitos especiais com suas características: pequena massa molecular, polaridade diferenciada, meia-vida curta e variável, enorme variabilidade estrutural, ocorrência esporádica e potencial antioxidante (GOTTLIEB; BORIN, 2012). Para os mesmos autores, os metabólitos especiais seriam mensageiros da informação, ou a linguagem do organismo vegetal, responsáveis pela comunicação das plantas com a sua biota associada.

Assim, do ponto de vista funcional, produtos naturais são vocábulos da linguagem ecológica/evolutiva, responsáveis pela existência, sincronização e modulação de redes metabólicas, orgânicas e biogeográficas (“auto-organização” e “autorregulação”) (GOTTLIEB; BORIN, 2012, p. 2108).

Como demonstrado na Figura 2, os metabólitos secundários são originados a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (Acetil-CoA). A partir do ácido chiquímico,

originam-se os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, como os fenilpropanoides, os taninos hidrolisáveis e os alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos (SANTOS, 2004).

Da via do acetato derivam os aminoácidos alifáticos (e os alcaloides deles derivados), os terpenoides, os esteroides, os ácidos graxos e os triglicérides. Os aminoácidos alifáticos são originados a partir do ciclo do ácido cítrico, e os demais metabólitos são derivados da condensação de unidades de acetato e da via do mevalonato. Alguns metabólitos secundários derivam da combinação de unidades de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste. São exemplos os flavonoides, as antraquinonas e os taninos condensados (SANTOS, 2004).

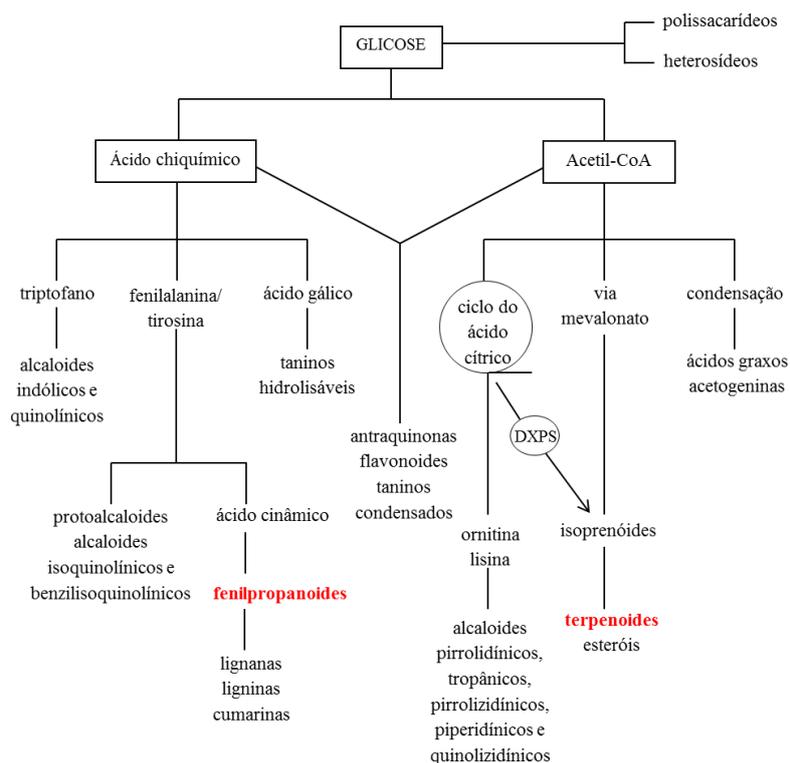


Figura 2 Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários. Adaptada de Santos (2004).

A biossíntese de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores, incluindo os ambientais. Alguns fatores que influenciam a produção desses metabólitos nas plantas são a sazonalidade, o ritmo circadiano, a idade e o desenvolvimento das plantas, a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação, os nutrientes, a poluição e a composição atmosférica, os estímulos mecânicos (como ferimentos ou estímulos causados por chuva, granizo, vento, areia, pastagem de herbívoros) e o ataque de patógenos. Na maioria das vezes, esses fatores estão influenciando em conjunto o metabolismo secundário (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários têm sido utilizados na medicina tradicional desde a antiguidade devido à variedade de atividades biológicas que apresentam. Atualmente, eles são considerados compostos valiosos, utilizados na indústria farmacêutica, química, cosmética, em nutracêutica, na agricultura etc (BOURGAUD et al., 2001).

2.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais representam uma classe de metabólitos secundários também chamada de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que se diferem dos óleos fixos (misturas de substâncias lipídicas geralmente extraídas de sementes) principalmente pela volatilidade. Quando recém-extraídos, a maioria dos óleos é incolor ou ligeiramente amarelada, com poucas exceções, como na camomila e milfolhas, que produzem óleos essenciais de coloração azulada, devido à presença do azuleno e derivados. Outra característica dos óleos voláteis é a pouca estabilidade, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES; SPITZER, 2004).

De acordo com a definição clássica da ISO (*International Standard Organization*), os óleos essenciais são produtos obtidos de todas as partes das plantas por hidrodestilação, destilação por arraste com vapor d'água, bem como produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. Outros métodos de extração dos óleos essenciais são a enfloração ou *Enfleurage*, a extração com solventes orgânicos e a extração por fluidos supercríticos, entre outros (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os óleos voláteis podem ser produzidos e estocados em todos os órgãos dos vegetais, como nas flores (laranjeira), nas folhas (capim-limão, eucalipto), nas cascas dos caules (canela), na madeira (pau-rosa), nas raízes (vetiver), nos rizomas (gingibre), nos frutos (funcho, erva-doce) e nas sementes (noz-moscada) (SIMÕES; SPITZER, 2004). As plantas produtoras de óleos voláteis não estão restritas a um clado específico, pelo contrário, elas ocorrem de forma generalizada em todo o reino vegetal. Essa vasta distribuição é acompanhada de uma variedade de estruturas celulares que produzem e/ou armazenam os óleos essenciais e de uma infinidade de combinações qualitativas e quantitativas dos constituintes químicos desses óleos (SANGWAN et al., 2001).

Os óleos essenciais podem ser produzidos e/ou armazenados nas plantas em diversas estruturas secretoras, como os pelos ou tricomas glandulares, as cavidades secretoras e as células ou idioblastos secretores. Os tricomas são estruturas secretoras externas que apresentam uma variedade de formas e são abundantemente encontrados na família Lamiaceae. Já as cavidades são estruturas secretoras internas de origem lisígena ou esquizógena. Essas estruturas com conteúdo oleoso são comuns na família Rutaceae. As células secretoras oleíferas aparecem como células parenquimáticas diferenciadas e são comuns nas famílias Lauraceae, Piperaceae, Poaceae, Calycanthaceae, Magnoliaceae, Simarubaceae e Winteraceae (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais pertencem a duas classes distintas, a dos terpenoides e a dos fenilpropanoides. Os fenilpropanoides são originados a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico, constituídos de um anel aromático ligado a uma cadeia lateral de três carbonos, que apresenta uma dupla ligação (Figura 3). Por meio de várias reações de redução, oxidação e ciclização, esses ácidos levam à formação dos fenilpropanoides (SIMÕES; SPITZER, 2004).

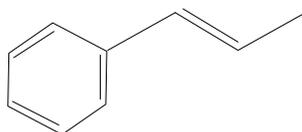


Figura 3 Representação química básica de um fenilpropanoide.

Os terpenoides são originados a partir da via do ácido mevalônico, pela rota citosólica e da via da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), pela rota plastídica, e tem como unidade básica um composto de cinco carbonos, o isopreno (Figura 4) (SANGWAN et al., 2001; DEWICK, 2002). Os compostos terpênicos são considerados a maior classe química de constituintes ativos de plantas, com mais de 30.000 substâncias já descritas (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003). Os terpenoides mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos, presentes em cerca de 90% dos óleos, e os sesquiterpenos (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Muitos desses constituintes estão presentes apenas em quantidades traço, ou seja, em pequenas proporções no óleo essencial. Apenas alguns compostos

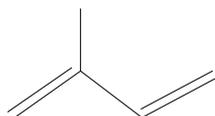


Figura 4 Estrutura química do isopreno.

são encontrados em maior quantidade, sendo considerados os constituintes majoritários do óleo (SANGWAN et al., 2001; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Atualmente, os óleos essenciais estão sendo largamente empregados na produção de perfumes, cosméticos e produtos de higiene e limpeza. São utilizados também em aromaterapia, na agroindústria (ex. defensivos naturais) e na indústria alimentícia (ex. antioxidantes, aromatizantes) (SANGWAN et al., 2001).

2.4 Óleo essencial de *Drimys* sp.

Vários autores relataram a presença dos sesquiterpenos drimanicos nos extratos e óleos essenciais de *Drimys*, como o drimaniol, drimenol, valdiviolide, poligodial, 1-b-(*p*-metóxicinamoil) poligodial e 1-b-(*p*-cumaroiloxi) poligodial. Essa classe de sesquiterpenos ocorre em um grupo pequeno de angiospermas, como as Winteraceae, Solanaceae, Canellaceae, Taxaceae e Polygonaceae, também em algumas briófitas, pteridófitas, fungos e organismos marinhos, principalmente moluscos e esponjas. Esses compostos atraem atenção particular dos pesquisadores, pela variedade de atividades biológicas que apresentam, como atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, antifúngica, antinociceptiva, antitripanossômica, antileishmania, e pelas propriedades sensoriais (VICHNEWSKI; KULANTHAIVEL; HERZ, 1986; BROWN, 1994;

CICCIÓ, 1997; CECHINEL FILHO et al., 1998; MALHEIROS et al., 2001, 2005; MUÑOZ-CONCHA; VOGEL; RAZMILIC, 2004; LIMBERGER et al., 2007; MUÑOZ-CONCHA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; LAGO et al., 2010; MONSÁLVEZ et al., 2010; CORRÊA et al., 2011).

O gênero *Drimys* também é caracterizado pela presença de monoterpenos e fenilpropanoides nos óleos essenciais, além de flavonoides (CECHINEL FILHO et al., 1998; MUÑOZ-CONCHA; VOGEL; RAZMILIC, 2004; LIMBERGER et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; LAGO et al., 2010; GOMES et al., 2013).

Pesquisas recentes de Gomes et al. (2013) avaliaram o potencial da atividade citotóxica dos óleos essenciais e nanoemulsões de *D. brasiliensis* e *D. angustifolia* contra linhagens de células do carcinoma da bexiga e glioblastoma humanos *in vitro*. Os autores mostraram que o óleo de *D. brasiliensis* apresentou maior potencial citotóxico que o óleo de *D. angustifolia*, contra as duas linhagens de células.

2.5 Influência da altitude na produção de metabólitos secundários e nas características anatômicas de espécies aromáticas

À medida que se eleva a altitude, as condições ambientais são afetadas e surgem espécies ou populações que são, geralmente, bem adaptadas a essas condições. A altitude pode ser considerada um fator-complexo, pois, por si só, não afeta o desenvolvimento das plantas, porém, está correlacionada com variações em diversos fatores ambientais que influenciam o crescimento e o estabelecimento dos vegetais ao longo do gradiente altitudinal (WHITTAKER, 1973; KÖRNER, 2007).

As mudanças atmosféricas primárias associadas às elevações na altitude são a diminuição da pressão atmosférica total e da pressão parcial de todos os

gases atmosféricos (dos quais O₂ e CO₂ são de importância particular para a vida), a redução da temperatura atmosférica, com implicações na umidade do ambiente, o aumento da radiação solar e da radiação UV-B. A redução da pressão atmosférica e da pressão parcial dos gases atmosféricos tem um efeito significativo na respiração dos animais e nas trocas gasosas das plantas. Por exemplo, a pressão parcial de O₂ e CO₂ é aproximadamente 21% mais baixa a 2000 m de altitude que ao nível do mar. Outros parâmetros meteorológicos também podem variar com a altitude, como a precipitação e a velocidade do vento (KÖRNER, 2007).

Existem relativamente poucos estudos relacionando as variações na altitude, o desenvolvimento das plantas e a produção de metabólitos secundários. Sabe-se que muitos fatores que sofrem alterações com a altitude podem coordenar ou alterar direta ou indiretamente a taxa de produção de metabólitos secundários nas plantas, incluindo a produção de óleos essenciais. Alguns desses fatores são a radiação, a temperatura, a disponibilidade hídrica e a composição atmosférica. Frequentemente, observa-se uma correlação positiva entre a elevação da altitude e a produção de flavonoides pelas plantas, pois esses compostos atuam protegendo os tecidos internos contra a radiação UV e seus efeitos danosos (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Pesquisas de Herraiz-Peñalver et al. (2013) com populações selvagens de *Lavandula latifolia* Medik. na Espanha evidenciaram relações entre a altitude da área de crescimento das populações e as porcentagens relativas de linalol e cânfora nos óleos essenciais. Os autores observaram que a biossíntese de cânfora foi favorecida em altitudes mais baixas (abaixo de 500 m), o que foi parcialmente atribuído às maiores temperaturas desses locais de coleta. De acordo com Lima, Kaplan e Cruz (2003) e Gobbo-Neto e Lopes (2007), a produção de óleos essenciais, de modo geral, parece aumentar em temperaturas

mais elevadas, apesar de temperaturas muito altas levarem a perdas excessivas desses metabólitos.

Segundo Zarinkamar, Tajik e Soleimanpour (2011), além da influência na produção de metabólitos secundários, a altitude também pode influenciar as características anatômicas das espécies aromáticas. Os autores estudaram a espécie *Crocus sativus* L. (açafreão) nas altitudes de 700 e 1400 m e observaram que o tamanho dos tricomas glandulares, presentes na superfície dos estigmas florais, diminuiu com a elevação da altitude. Kofidis, Bosabalidis e Moustakas (2007), pesquisando modificações na estrutura foliar de *Clinopodium vulgare* L. em três altitudes (200, 950 e 1.760 m), observaram que a densidade estomática aumentou com a altitude, sendo os maiores valores encontrados a 1760 m.

2.6 Florestas de altitude da Serra da Mantiqueira - Bioma Mata Atlântica

Segundo o atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica (período 2008-2010), publicado pela Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE (2011), o estado de Minas Gerais tem 46% do seu território localizado no bioma Mata Atlântica e apenas cerca de 10% de remanescentes florestais totais no bioma.

A extensão original da Mata Atlântica perfazia uma área de 1.300.000 km², estendendo-se desde os estados do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul e da costa Atlântica leste até o planalto central brasileiro, além de partes do Paraguai e da Argentina. Atualmente, o bioma está reduzido a cerca de 11,4 a 16% de sua extensão original de cobertura vegetal (BERTONCELLO et al., 2011). A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais ricos em biodiversidade e mais ameaçados do mundo, abrigando a maior parte das espécies animais e vegetais ameaçadas de extinção do Brasil (BRASIL, 2002; BERTONCELLO et al., 2011). Por essas características, a Mata Atlântica e o

Cerrado brasileiro foram classificados como *hotspots*, ou seja, áreas prioritárias para conservação no mundo (MYERS et al., 2000; BRASIL, 2002; BERTONCELLO et al., 2011).

Segundo a Lei Federal nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006, integram o bioma Mata Atlântica, as Florestas Ombrófilas Densas, Ombrófilas Mistas e Ombrófilas Abertas, as Florestas Estacionais Deciduais e Estacionais Semideciduais, bem como os manguezais, as vegetações de restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste (BRASIL, 2006).

A Serra da Mantiqueira estende-se pelos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e é parte integrante do bioma Mata Atlântica. No complexo orográfico da Serra da Mantiqueira, estão localizadas florestas de altitude que podem ser classificadas como nebulares, por estarem parcialmente cobertas por nuvens ou nevoeiros em grande parte do ano. As florestas nebulares ocorrem entre 1.000 e 3.000 m de altitude nas cadeias montanhosas da região neotropical, porém podem ocorrer variações locais e regionais nos limites altitudinais (WEBSTER, 1995; FRANÇA; STEHMANN, 2004).

As florestas nebulares de montanhas tropicais são ainda pouco estudadas, apresentam elevadas taxas de biodiversidade e endemismo e estão entre os ecossistemas mais ameaçados do mundo. A presença constante do nevoeiro ao nível da vegetação adiciona água a esses ambientes e altera seu regime hidrológico, contribuindo com características edafoclimáticas peculiares (ALDRICH et al., 1997; BERTONCELLO et al., 2011). Pesquisas de Bertoncetto et al. (2011) mostraram que *D. brasiliensis* é considerada indicadora das florestas nebulares do Sul e Sudeste do Brasil, junto à *Ilex microdonta* Reissek e *Weinmannia paulliniifolia* Pohl ex Ser.

Meireles, Shepherd e Kinoshita (2008), estudando a composição florística e a estrutura fitossociológica de uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana (1550 a 2082 m de altitude), inserida na Serra da Mantiqueira em

Monte Verde, MG, observaram que as espécies *D. brasiliensis*, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum e *Roupala rhombifolia* Mart. ex Meisn., que são encontradas preferencialmente em áreas elevadas do Sudeste brasileiro, apresentaram os maiores valores de importância no levantamento. Os autores constataram que vários indivíduos de *D. brasiliensis* exibiram grande porte e biomassa elevada e sugeriram que a espécie apresenta seu melhor desenvolvimento em ambientes altimontanos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras e a metodologia de pesquisa é descrita a seguir.

3.1 Coleta do material vegetal de *Drimys brasiliensis* Miers

O material vegetal de *D. brasiliensis* foi coletado em uma formação de Floresta Ombrófila Densa Altomontana, acima do nível de 1500 m de altitude (VELOSO; RANGEL FILHO; LIMA, 1991), inserida na Serra da Mantiqueira, pertencente ao domínio da Mata Atlântica, no município de Itamonte, Sul de Minas Gerais. As coletas foram realizadas no mês de janeiro de 2013, nas cotas de 1900 e 2100 m de altitude. Essas cotas foram escolhidas, pois a espécie *D. brasiliensis* não estava presente em outras cotas altitudinais na floresta em estudo (1500 - 2100 m de altitude). O material vegetal foi coletado em plantas adultas (com circunferência à altura do peito - CAP acima de 20 cm), na face leste da copa. Duas exsicatas da espécie, presente na área de estudo, encontram-se depositadas no Herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras sob os números de tombo: 27307 e 27216.

A área localiza-se na Fazenda Pinhão Assado, antigo Hotel Casa Alpina, e integra a Área de Proteção Ambiental Serra da Mantiqueira, caracterizando-se por uma Unidade de Conservação Federal de Uso Sustentável (Figura 5). A fazenda compreende uma área de 1026 ha, com acesso pela BR 354, a 15 km da cidade de Itamonte, MG. As coordenadas geográficas aproximadas da área são de 22°21'55"S e 44°48'32"W. A área localiza-se a 15 km da entrada do Parque Nacional do Itatiaia e faz divisa com a Serra Fina. Atualmente, a fazenda está em processo de transformação em uma Reserva Particular do Patrimônio Natural, com o nome de RPPN Alto-Montana (POMPEU, 2011).

O clima do município de Itamonte é do tipo Cwb de Köppen - clima mesotérmico de inverno seco, com verões brandos e estação chuvosa no verão. O solo predominante é o cambissolo. A temperatura média anual varia de 17,4°C a 19,8 °C e a temperatura do mês mais quente é inferior a 22 °C. A estação seca estende-se de maio a setembro e o período mais seco ocorre nos meses de junho e julho e o mais chuvoso, nos meses de dezembro e janeiro. A média histórica de precipitação anual é de 1.749 mm (PANE, 2001; POMPEU, 2011).



Figura 5 Foto de um dia típico na área de estudo, evidenciando o nevoeiro constante nas florestas nebulares.

3.2 Caracterização da anatomia foliar

A caracterização anatômica foi realizada no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras

(UFLA). Foram selecionadas folhas completamente expandidas, livres de patógenos e herbivoria, de 4 indivíduos de *D. brasiliensis*/cota de altitude (1900 e 2100 m). Foram realizadas secções paradérmicas e transversais em 3 folhas/indivíduo, sendo analisados 5 campos/folha.

As secções paradérmicas foram realizadas em ambas as superfícies foliares (adaxial e abaxial), à mão livre, com auxílio de lâmina de aço. As secções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 50%, por cerca de 1 minuto e, em seguida, foram lavadas em água destilada duas vezes por 10 minutos, e coradas com safranina 1%. As secções foram montadas entre lâmina e lamínula com glicerina 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997) e fotografadas em microscópio óptico Olympus CX 31 com câmera digital acoplada. A análise estomática foi realizada na superfície abaxial das folhas, onde os estômatos estavam presentes, por meio do software para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool[®], versão 3.0. Foram calculados a densidade (número de estômatos/mm²), a funcionalidade (relação diâmetro polar/diâmetro equatorial dos estômatos) e o índice estomáticos [(número de estômatos/número de estômatos + número de células epidérmicas) 100] de acordo com Pereira et al. (2011).

As secções transversais foram realizadas em fragmentos de aproximadamente 2 cm² retirados de região contendo a nervura central das folhas. Para a obtenção de lâminas permanentes, os fragmentos foliares foram desidratados em série crescente de etanol e conservados em álcool etílico a 70%. A inclusão foi realizada em hidroxietilmetacrilato Leica[®] segundo protocolo modificado do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo semi-automático, os cortes submetidos a coloração com azul de toluidina e as lâminas montadas em Permount[®] (FEDER; O'BRIEN, 1968). As secções foram fotografadas em microscópio óptico Zeiss com câmera digital acoplada (AxioCam ERc5s) e analisadas por meio do software UTHSCSA-Imagetool[®], versão 3.0, medindo-se a espessura dos tecidos foliares. Foram mensurados os

valores de espessura do limbo foliar, da cutícula da superfície adaxial, do parênquima paliçádico e do parênquima esponjoso.

3.2.1 Testes Histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), segundo a metodologia de Figueiredo et al. (2007). Foram realizadas secções transversais em fragmentos de aproximadamente 2 cm² retirados de região contendo a nervura central das folhas, com o auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. Os testes foram realizados em 3 folhas/indivíduo de *D. brasiliensis*, sendo 4 indivíduos/cota altitudinal (1900 e 2100 m).

Para a detecção de lipídios totais, foi utilizado o reagente Sudan IV; para a detecção dos óleos essenciais, foi utilizado o reagente de NADI e para a verificação de compostos fenólicos foi empregado o cloreto férrico. As secções foram montadas entre lâmina e lamínula com glicerina 50%, e fotografadas em microscópio óptico Olympus CX 31 com câmera digital acoplada.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observação das superfícies das folhas de *D. brasiliensis*, amostras obtidas a 1900 e 2100 m de altitude foram fixadas em solução Karnovsky até o momento das análises. No Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), as amostras foram lavadas em tampão cacodilato a 0,05M (3 vezes - 10 minutos cada) e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, durante 4 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram desidratadas em acetona em uma série progressiva (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, 3 vezes - 10 minutos

cada), submetidas ao ponto crítico de dessecamento de CO₂ em equipamento BAL-TEC, CPD-030 e fixadas em suporte metálico com cola de prata e recobertas com ouro metálico (10 nm) em aparelho BAL-TEC, SCD-050. O material foliar preparado foi observado e documentado em Microscópio Eletrônico de Varredura LEO EVO 40 XVP.

3.3 Extração dos óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais de *D. brasiliensis* foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram realizadas extrações dos óleos essenciais de 4 indivíduos de *D. brasiliensis*/cota de altitude (1900 e 2100 m). O método empregado foi o da hidrodestilação (Figura 6), utilizando-se um aparelho tipo Clevenger modificado acoplado a um balão de vidro de fundo redondo com capacidade de 1000 mL, segundo a metodologia da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

Todo o material vegetal foi previamente limpo com papel-toalha. As folhas foram picadas em pedaços pequenos e uniformes e os caules, cortados em pedaços de aproximadamente 3 cm. Foram realizadas extrações das folhas frescas, secas e dos caules frescos, sendo o peso de cada material vegetal previamente padronizado. A secagem das folhas foi realizada por aproximadamente 48 horas, em estufa de secagem com circulação de ar forçada (Fanem Modelo 320 - SE) com temperatura entre 30 e 34 °C.



Figura 6 Processo de extração dos óleos essenciais (hidrodestilação).

As folhas e caules foram colocados em balões de vidro e recobertos com água. Os balões foram aquecidos ($100 \pm 5^\circ\text{C}$) com o auxílio de mantas aquecedoras. O processo de extração foi realizado em um período de 2 horas, mantendo-se a solução em ebulição. Posteriormente, o óleo foi separado do hidrolato por centrifugação utilizando-se uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a $965,36 \times G$ por 5 minutos. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro escuro envolto com papel-alumínio e armazenado sob refrigeração.

3.3.1 Determinação da Umidade

Paralelamente às extrações, foi realizado o teste da umidade, de acordo com Pimentel et al. (2008) para posterior cálculo do rendimento das extrações. Foram utilizados 5 g de cada material vegetal (folhas frescas e caules frescos) emergidos em 50 mL de ciclohexano em balão de vidro de fundo redondo com capacidade de 250 mL, o qual foi acoplado a um condensador com coletor de

vidro graduado do tipo Dean Stark (trap para destilação). O balão foi aquecido ($100 \pm 5^\circ\text{C}$) com o auxílio de uma manta aquecedora. Após 2 horas, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. A umidade foi calculada considerando-se o teor de água contido em 100 g da amostra.

3.3.2 Cálculo do rendimento das extrações

O rendimento de cada extração foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material vegetal com Base Livre de Umidade (% p/p BLU) (GUIMARÃES et al., 2008).

3.4 Identificação e quantificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais

As análises quantitativas e qualitativas dos óleos essenciais foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Sergipe (UFS).

As análises quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas em um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamas (CG-DIC), Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetilpolisiloxano) com 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 μm de filme, usando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min⁻¹. A temperatura foi mantida a 50 °C por 2 min, seguida de um aumento a 4 °C min⁻¹, até atingir 200 °C. Em seguida, aumentada 15 °C min⁻¹, até atingir 300 °C, mantendo-se essa temperatura constante por 15 min. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura do detector (ou interface), foi de 280 °C. O volume de amostra injetado foi de 0,5 μL em acetato de etila.

As análises qualitativas dos óleos essenciais foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM), Shimadzu, modelo QP 5050A, equipado com coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm de filme, usando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min⁻¹. As condições cromatográficas das análises foram as mesmas utilizadas para CG-DIC. As condições operacionais do EM foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmento por segundo e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação de seus índices de retenção com os da literatura (ADAMS, 2007). Para o cálculo do índice de retenção, foi utilizada a equação de Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC₉-nC₁₈). Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento (NIST107 e NIST21), que permitem a comparação dos dados dos espectros obtidos com aqueles existentes nas bibliotecas.

3.5 Dados microclimáticos

Os dados microclimáticos foram fornecidos por colaboradores do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e referem-se ao período de um ano de acompanhamentos por estações meteorológicas da marca WatchDog modelo 2900ET, instaladas em cada cota altitudinal.

3.6 Análises estatísticas

Os dados referentes à anatomia foliar de *D. brasiliensis* foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 95% de confiança, utilizando-se o programa estatístico SISVAR, versão 4.6 (FERREIRA, 2003). Para estas análises, foram considerados os resultados obtidos de 5 campos/folha, sendo 3 folhas/indivíduo de *D. brasiliensis* e 4 indivíduos/cota altitudinal (1900 e 2100 m).

Devido à grande quantidade de compostos químicos presentes nos óleos essenciais de *D. brasiliensis*, a técnica de ACP (análise de componentes principais) foi escolhida para verificar a similaridade entre os óleos essenciais de folhas frescas (FF), folhas secas (FS) e caules frescos (G) nas duas cotas altitudinais, quanto às proporções de seus constituintes químicos. A análise foi realizada utilizando-se o programa CHEMOFACE (NUNES et al., 2012). Para esta análise, foram calculadas as médias das proporções dos constituintes químicos dos óleos de 4 indivíduos de *D. brasiliensis*/cota altitudinal (1900 e 2100 m).

A análise de componentes principais (ACP) é uma técnica de análise multivariada que permite transformar um conjunto de n-variáveis originais em n-componentes principais que, além de serem ortogonais entre si, são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, e assim por diante. O principal objetivo da análise de componentes principais é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis, que detém o máximo de informação contida nas variáveis originais (MOITA NETO; MOITA, 1998; FERREIRA, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados e discutidos a seguir os resultados referentes à caracterização da anatomia foliar e dos óleos essenciais de *Drimys brasiliensis* Miers.

4.1 Caracterização da anatomia foliar

As folhas de *D. brasiliensis* apresentaram epiderme unisseriada, revestida externamente por uma cutícula, cuja espessura variou com a altitude, e mesofilo dorsiventral, com parênquima paliçádico com três camadas de células e parênquima esponjoso com seis a oito camadas (Figura 7 a,b). Os estômatos estavam presentes apenas na superfície abaxial das folhas, sendo essas classificadas como hipoestomáticas, o que está em concordância com as descrições para os representantes da família Winteraceae (FEILD et al., 1998; FEILD; ZWIENIECKI; HOLBROOK, 2000). Os estômatos encontrados foram do tipo paracíticos ou “de células paralelas” (Figura 8), apresentando duas células subsidiárias com seu maior eixo paralelo ao maior eixo das células estomáticas (ESAU, 1974; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

No mesofilo, foram encontradas células de esclerênquima do tipo esclereídeos com formato arredondado e elíptico (Figura 7 a,b,e). Metcalfe e Chalk (1957) relataram a presença desses esclereídeos nos representantes da família Winteraceae. Os esclereídeos estavam presentes em maior número nas folhas de *D. brasiliensis* coletadas a 1900 m de altitude (Figura 7 a), enquanto os espaços intercelulares ocorreram em maior volume no mesofilo das folhas a 2100 m (Figura 7 b). A nervura central das folhas de *D. brasiliensis* coletadas a 1900 m de altitude (Figura 7 c) apresentou muitos esclereídeos, como os presentes no mesofilo, além de maior número de cavidades secretoras.

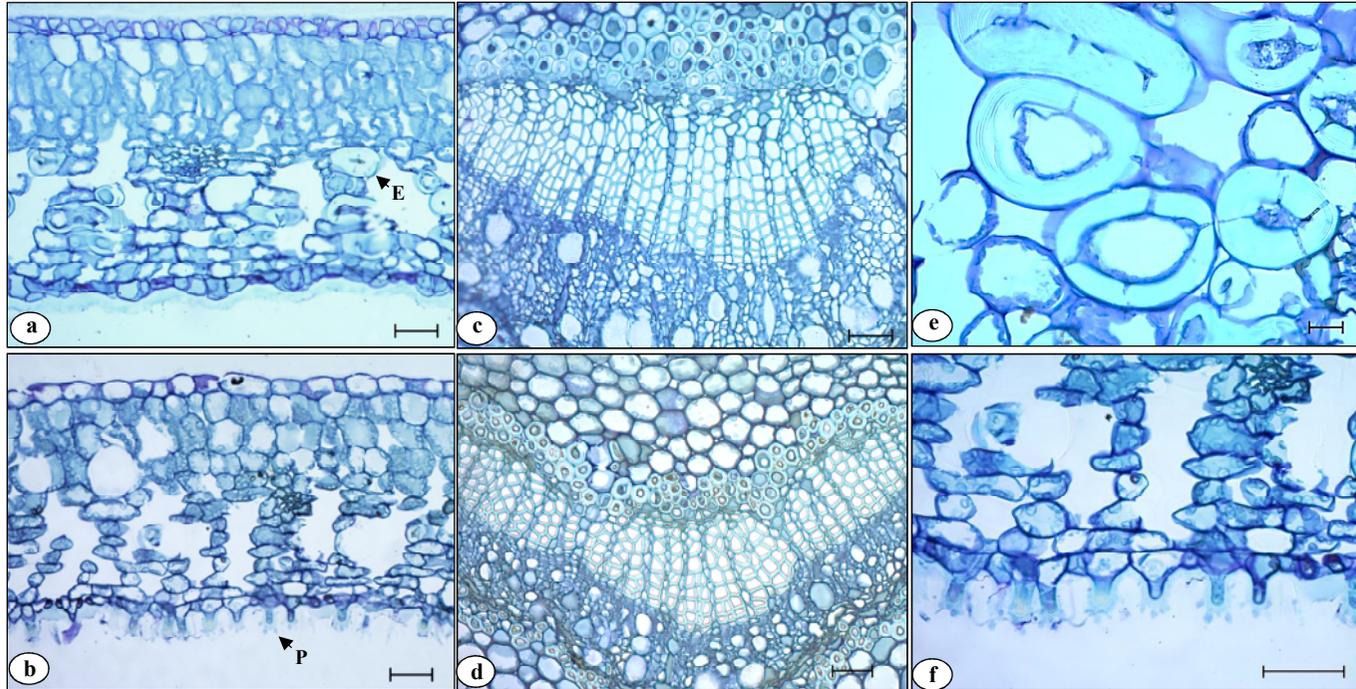


Figura 7 Secções transversais de folhas de *Drimys brasiliensis* Miers coletadas a 1900 m (a, c, e) e 2100 m (b, d, f) de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG, evidenciando a nervura central das folhas (c, d), os esclereídeos (e) e a epiderme papilosa (f). E = Esclereídeo, P = Papila. Barras: 50 μ m (a, b, c, d, f), 20 μ m (e).

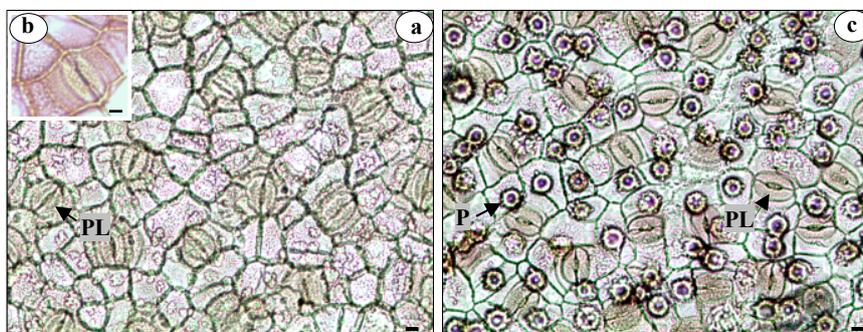


Figura 8 Secções paradérmicas de folhas de *Drimys brasiliensis* Miers coletadas a 1900 m (a, b) e 2100 m (c) de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG. PL = *Plugs* estomáticos, P = Papila. Barras: 10 μ m.

Os testes histoquímicos realizados neste trabalho auxiliaram na identificação de cavidades e de células ou idioblastos secretores com conteúdo oleoso nas folhas de *D. brasiliensis* (Figura 9). Essas estruturas foram encontradas nas duas cotas altitudinais. A presença de células secretoras já foi reportada para as espécies da família Winteraceae (METCALFE; CHALK, 1957; WEST, 1969; ESAU, 1974; READ; MENARY, 2000). Além disso, o teste histoquímico com cloreto férrico evidenciou compostos fenólicos no mesófilo das folhas de *D. brasiliensis*.

A superfície abaxial das folhas de *D. brasiliensis* coletadas a 2100 m de altitude apresentou papilas abundantes de comprimento variável (Figura 7 b,f; Figura 10). Essas estruturas epidérmicas não foram encontradas nas folhas coletadas a 1900 m. Smith (1943), Metcalfe e Chalk (1957), Ehrendorfer, Silberbauer-Gottsberger e Gottsberger (1979), Feild et al. (1998), Feild, Zwieniecki e Holbrook (2000) e Eller, Lima e Oliveira (2013) relataram a presença das papilas na superfície abaxial das folhas de *Drimys* sp., porém, os

autores não apresentaram diferenças na ocorrência dessas estruturas epidérmicas em relação aos fatores bióticos e abióticos.

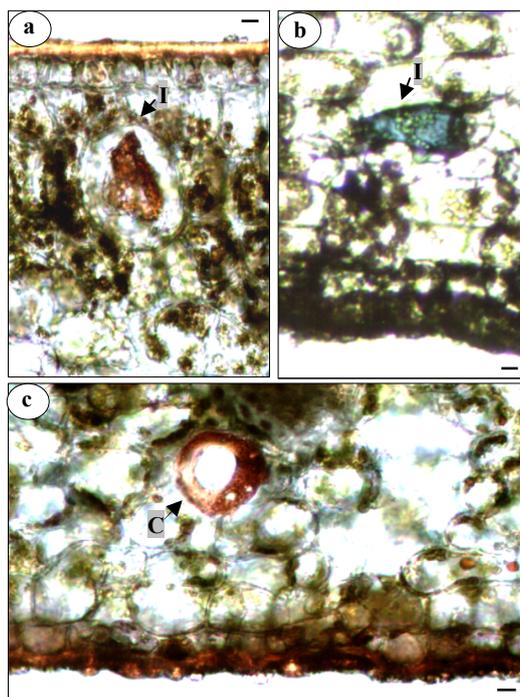


Figura 9 Secções transversais de folhas de *Drimys brasiliensis* Miers coletadas a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG, evidenciando reações positivas com Sudan IV para identificação de lipídeos totais (a, c) e reação positiva com reagente de NADI para identificação de óleos essenciais (b). I = Idioblasto secretor, C = Cavidade secretora. Barras: 10 μ m.

As papilas podem ser claviformes ou aparecer como protuberâncias provenientes das células epidérmicas. Essas estruturas podem ser recobertas por grânulos de cera e material cuticular, e podem variar em comprimento (SMITH, 1943; METCALFE; CHALK, 1957; EHRENDORFER; SILBERBAUER-

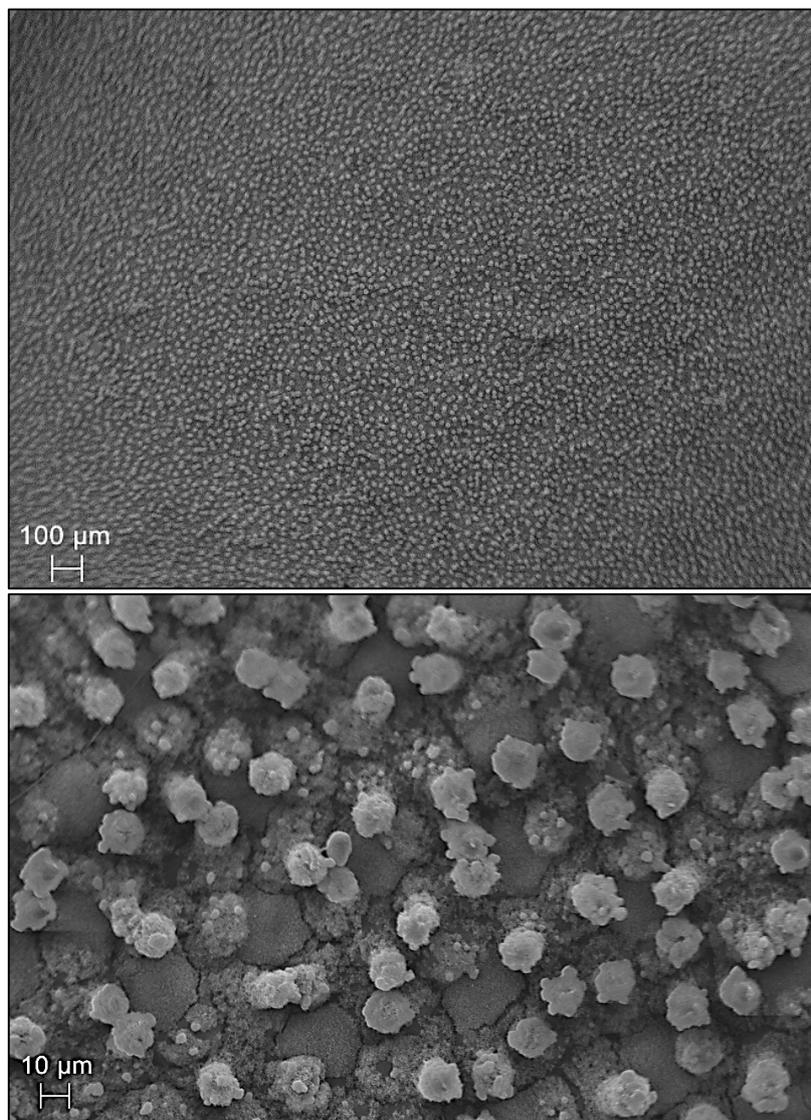


Figura 10 Microscopia Eletrônica de Varredura. Superfície abaxial de folhas de *Drimys brasiliensis* Miers coletadas a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG, evidenciando a epiderme papilosa.

GOTTSBERGER; GOTTSBERGER, 1979; FEILD et al., 1998; FEILD; ZWIENIECKI; HOLBROOK, 2000).

Vieira e Gomes (1995) atribuíram às papilas da epiderme abaxial das folhas de *Psychotria leiocarpa* Cham. e Schltl., *P. stenocalyx* Müll. Arg. e *P. tenuinervis* Müll. Arg. (Rubiaceae) a função de convergir estímulos luminosos para o mesófilo para a realização da fotossíntese, já que as folhas estudadas se desenvolveram sob luminosidade reduzida. Como no presente estudo as papilas foram encontradas em folhas a 2100 m de altitude, onde predominam maiores níveis de radiação que a 1900 m (Tabela 1A), provavelmente a função dessas estruturas em *D. brasiliensis* não está relacionada à conversão de luz para o mesófilo.

Segundo Körner (2007), plantas em altitudes elevadas têm que se adaptar a alterações atmosféricas críticas, como a diminuição da pressão atmosférica total e da pressão parcial dos gases atmosféricos (como O₂ e CO₂), a redução da temperatura atmosférica, o aumento da radiação solar e a elevação da radiação UV-B. As características microclimáticas das cotas altitudinais deste estudo podem ser verificadas na Tabela 1A e confirmam o aumento da radiação solar e da umidade, e a diminuição da temperatura atmosférica a 2100 m de altitude.

Pesquisas recentes de Eller, Lima e Oliveira (2013) provaram que *D. brasiliensis* é capaz de absorver a água do nevoeiro pela cutícula das folhas, sendo esse um processo essencial na vasta distribuição da espécie nas florestas nebulares. Os autores propõem que a absorção de água nas folhas de *D. brasiliensis* ocorra principalmente na superfície adaxial, sendo a superfície abaxial responsável pelas trocas gasosas durante e após a presença dos nevoeiros, por sua característica de hidrofobicidade e por abrigar a maior parte dos estômatos.

Feild et al. (1998), estudando a espécie *Drimys winteri* var. *chilensis* (DC) A. Gray, evidenciaram que os *plugs* dos estômatos (constituídos de material cuticular) presentes na superfície abaxial das folhas de *Drimys* (Figura 8) são responsáveis por proteger as folhas contra o encharcamento excessivo provocado pelo nevoeiro recorrente nas florestas nebulares. Os autores discutem que os *plugs*, juntamente com as papilas e as ceras epicuticulares, pela alta hidrofobicidade que possuem, compõem uma estrutura capaz de impedir a formação constante de uma lâmina de água sobre as folhas, o que dificultaria as trocas gasosas. Os autores esclarecem, ainda, que a difusão de CO₂ na água é bem mais lenta que no ar (cerca de 10.000 vezes); portanto, um filme de água sobre as folhas diminuiria as trocas gasosas, por criar uma barreira à entrada de CO₂ nas folhas. Brewer e Smith (1997), avaliando 50 espécies de montanhas a 2400 m de altitude nos EUA, também discutiram essa relação, atribuindo aos tricomas foliares um papel fundamental para evitar a formação do filme de água sobre as folhas das plantas.

Embasando-se nas evidências apresentadas, pode-se inferir que a ocorrência de papilas nos indivíduos de *D. brasiliensis* a 2100 m de altitude, possivelmente, está relacionada à maior umidade nessa cota altitudinal (Tabela 1A), e à diminuição na pressão parcial de CO₂ com a elevação da altitude (KÖRNER, 2007). As papilas presentes na superfície abaxial das folhas atuariam facilitando a absorção de CO₂ pelo mesmo processo descrito para *D. winteri* por Feild et al. (1998), ou seja, compondo uma matriz hidrofóbica que evitaria a formação de uma lâmina de água sobre as folhas. Nossos resultados corroboram com o que foi proposto por esses autores e ainda agregam conhecimento, por apresentarem a plasticidade fenotípica de *D. brasiliensis* nas florestas de altitude, sendo capaz de alterar/favorecer a formação de papilas como mecanismo compensatório à diminuição na pressão parcial de CO₂ em elevadas altitudes.

Outros resultados que complementam essa hipótese estão apresentados na Tabela 1. Pela análise dessa tabela, observa-se que as médias de densidade e índice estomáticos dos indivíduos de *D. brasiliensis* a 2100 m de altitude foram estatisticamente superiores àquelas encontradas a 1900 m. Observa-se também que a funcionalidade estomática não apresentou diferenças nas duas cotas altitudinais.

Tabela 1 Análise estomática de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

	1900	2100
DQ (μm)	19,09 \pm 0,81a	18,89 \pm 0,74a
DP (μm)	26,67 \pm 1,48a	26,49 \pm 2,20a
DE (estômatos/ mm^2)	222,02 \pm 22,11a	305,86 \pm 46,69b
IE (%)	14,56 \pm 0,99a	18,91 \pm 2,70b
FE (DP/DQ)	1,40 \pm 0,07a	1,40 \pm 0,10a

DQ = Diâmetro equatorial dos estômatos; DP = Diâmetro polar dos estômatos; DE = Densidade estomática; IE = Índice estomático; FE = Funcionalidade estomática. Todos os valores são expressos como a média \pm desvio-padrão. Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $P < 0,05$.

A estratégia da espécie seria investir na formação de um maior número de estômatos, o que compensaria a menor disponibilidade de CO_2 atmosférico a 2100 m de altitude, não alterando a funcionalidade (tamanho/formato) dos estômatos. Portanto, pode-se inferir que a superfície hidrofóbica formada pelas papilas poderia atuar junto ao aumento no número de estômatos, estabelecendo uma estratégia adaptativa que facilitaria as trocas gasosas de *D. brasiliensis*,

compensando a diminuição na pressão parcial de CO₂ atmosférico a 2100 m de altitude.

A densidade, o índice e a funcionalidade constituem parâmetros para as avaliações estomáticas (CUTTER, 2002; GREENWOOD; SCARR; CHRISTOPHEL, 2003; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; PEREIRA et al., 2011). Essas avaliações são pontos críticos na compreensão da dinâmica de trocas gasosas entre as plantas e o ambiente, especialmente se são considerados os novos cenários de mudanças climáticas para o futuro, com o aumento da concentração de CO₂ atmosférico, entre outros impactos (JOLY, 2007; ZHOU et al., 2012).

Sabe-se que a diferenciação estomática é determinada geneticamente e sofre alterações com os fatores ambientais, como a concentração de CO₂ atmosférico, a temperatura, a umidade e a luminosidade (LI et al., 2006; ZHAO et al., 2008; ZHOU et al., 2012). Experimentos de Lake et al. (2001), com *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., mostraram que folhas maduras da espécie expostas a altas concentrações de CO₂ conseguiram detectar a concentração desse gás no ambiente e transmitiram sinais de longa distância para as folhas jovens, que se desenvolveram com densidade e índice estomáticos reduzidos.

Vários autores relatam a correlação positiva entre o aumento do número de estômatos e a elevação da altitude para diversas espécies, como *Eucalyptus pauciflora* Sieb. ex Spreng. (KÖRNER; COCHRANE, 1985), *Vaccinium myrtillus* L. (WOODWARD, 1986), *Clinopodium vulgare* L. (KOFIDIS; BOSABALIDIS; MOUSTAKAS, 2007) e *Nepeta nuda* L. (KOFIDIS; BOSABALIDIS, 2008). Segundo Kouwenberg, Kürschner e McElwain (2007), a diminuição da pressão parcial de CO₂ desempenha papel essencial no aumento da formação de estômatos de muitas espécies com a elevação da altitude. Os autores discutem que entre os fatores climáticos que sofrem alterações com a altitude, como a pressão atmosférica, a temperatura, a umidade, a radiação e a

velocidade do vento, apenas a pressão atmosférica altera-se de modo independente das condições microclimáticas de cada ambiente.

Portanto, considerando-se que os estômatos desempenham papel fundamental na absorção de CO₂ para a fotossíntese (LI et al., 2006; KOUWENBERG; KÜRSCHNER; MCELWAIN, 2007; ZHAO et al., 2008; ZHOU et al., 2012) e embasando-se nas respostas de outras espécies relatadas na literatura, pode-se inferir que a diminuição da pressão parcial de CO₂ é um fator confiável para explicar o aumento na densidade e índice estomáticos de *D. brasiliensis* a 2100 m de altitude.

Pela análise da Tabela 2, percebe-se que, a 2100 m de altitude, as médias de espessura de todos os tecidos foliares de *D. brasiliensis* foram estatisticamente inferiores àquelas encontradas a 1900 m. Pode-se propor que a diminuição na espessura dos tecidos a 2100 m poderia facilitar a difusão de CO₂ nas folhas pela redução das rotas ou caminhos a serem percorridos por esse gás até os cloroplastos. Esse processo seria ainda facilitado pelo aumento de espaços intercelulares no mesofilo das folhas a 2100 m (Figura 7 b), reduzindo a resistência nos espaços intercelulares.

Pesquisas de Nautiyal e Purohit (1980) com *Artemisia sp.* em duas altitudes (550 e 3600 m) evidenciaram que a elevação da altitude contribuiu com a diminuição da espessura do limbo foliar. Segundo os autores, esse decréscimo na espessura das folhas afetaria negativamente a habilidade das plantas de evitar o início do estresse hídrico em altitudes elevadas, porém poderia aumentar a captação de CO₂.

Segundo Taiz e Zeiger (2009), a principal porta de entrada de CO₂ para a fotossíntese nas folhas são os estômatos, e após atravessar essa fenda, o CO₂ precisa difundir-se para a câmara subestomática e para os espaços de ar entre as células do mesofilo, o que compreende a fase gasosa de difusão do CO₂ para o cloroplasto. A fase líquida de difusão do CO₂ inicia-se na camada de água que

umededece as paredes das células do mesofilo e continua pela membrana plasmática, pelo citosol e pelo cloroplasto. Os autores explicam que cada ponto dessa rota impõe uma resistência à difusão desse gás nas folhas para o suprimento da fotossíntese. As principais resistências à difusão de CO₂ são a resistência da camada limítrofe, ou seja, a resistência imposta pelo ar relativamente parado junto à superfície foliar, a resistência estomática, a resistência nos espaços intercelulares e a resistência da fase líquida.

Tabela 2 Espessura dos tecidos foliares de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

	1900	2100
LF (µm)	433,55 ± 53,05a	330,94 ± 32,34b
CT (µm)	12,43 ± 3,34a	7,98 ± 1,04b
PP (µm)	130,51 ± 21,24a	102,64 ± 9,23b
PE (µm)	200,02 ± 21,09a	146,44 ± 20,96b

LF = Limbo foliar; CT = Cutícula da superfície adaxial; PP = Parênquima paliçádico; PE = Parênquima esponjoso. Todos os valores são expressos como a média ± desvio-padrão. Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P < 0,05.

Analisando-se separadamente a espessura da cutícula, neste trabalho, as folhas de *D. brasiliensis* coletadas a 1900 m de altitude apresentaram cutícula com aproximadamente 12,43 µm, e as coletadas a 2100 m, com 7,98 µm (Tabela 2). Nas plantas terrestres, essa estrutura representa a interface entre as plantas e o ambiente, desempenhando papel essencial como a última barreira contra a perda de água, a primeira defesa contra a penetração de poluentes, insetos e fungos patogênicos e a primeira camada protetora contra a radiação solar

prejudicial, principalmente a radiação UV (DODD; POVEDA, 2003; JACOBS; KOPER; URSEM, 2007; BUSCHHAUS; JETTER, 2012).

O aumento na espessura da cutícula é uma resposta adaptativa comum às espécies que crescem em ambientes com altos níveis de radiação, como as que sobrevivem em altitudes elevadas (SHEPHERD; GRIFFITHS, 2006; JACOBS; KOPER; URSEM, 2007). Por isso, considerando-se isoladamente o aumento da radiação a 2100 m de altitude (Tabela 1A), esperava-se que, nessa cota altitudinal, as folhas de *D. brasiliensis* apresentassem maior espessura da cutícula na superfície adaxial.

Esses resultados podem ser explicados por uma característica peculiar das florestas nebulares, a presença constante de nevoeiro ao nível da vegetação (ALDRICH et al., 1997). Sabe-se que nas florestas nebulares da Serra da Mantiqueira, o nevoeiro ocorre em cerca de 65 a 90% dos dias (ELLER; LIMA; OLIVEIRA, 2013). Na cota de 2100 m de altitude, o ambiente apresentou maior umidade relativa do ar que a 1900 m (Tabela 1A) e o nevoeiro, pela frequência em que ocorre nas florestas nebulares, possivelmente foi o fator que mais respondeu por esse aumento. Portanto, apesar de os níveis de radiação serem superiores a 2100 m de altitude, o nevoeiro poderia atuar como uma barreira contra a penetração direta dos raios solares nas folhas de *D. brasiliensis* nessa cota altitudinal, o que minimizaria a radiação real incidente nas folhas e, de certa forma, diminuiria a necessidade de proteção exercida pela cutícula.

Aldrich et al. (1997) explicam que nas florestas nebulares de montanhas tropicais, o nevoeiro influencia a vegetação, por reduzir a radiação solar incidente, provocar o encharcamento da copa das árvores e suprimir a evapotranspiração. Trabalhos futuros serão necessários para comprovar as taxas reais de radiação que incidem nas folhas de *D. brasiliensis* buscando-se compreender mais um mecanismo de interação da espécie com as florestas nebulares.

4.2 Caracterização química dos óleos essenciais

Os resultados de rendimento e composição química dos óleos essenciais de *D. brasiliensis* são apresentados e discutidos a seguir.

4.2.1 Rendimento dos óleos essenciais

Observa-se pelos dados descritos na Tabela 3 que o rendimento dos óleos essenciais de *D. brasiliensis* variou de 0,03 a 1,02%. Independentemente da secagem, as folhas apresentaram maior rendimento dos óleos que os caules.

Ribeiro et al. (2008) evidenciaram um rendimento de aproximadamente 0,97% para os óleos essenciais de folhas e cascas do caule de *D. brasiliensis*. Anteriormente, Limberger et al. (2007), estudando os óleos essenciais da espécie, observaram que os rendimentos variaram de 1,4 a 1,5% para os óleos de folhas frescas, 1,0% para os óleos de folhas secas, 0,4 a 0,6% para os óleos de cascas do caule e 0,4% para os óleos de frutos verdes. Gomes et al. (2013) encontraram para a mesma espécie um rendimento do óleo das folhas frescas de aproximadamente 0,3%.

Não foram encontrados trabalhos na literatura comparando os óleos essenciais de *D. brasiliensis* em diferentes altitudes. Neste estudo, observou-se uma tendência de maiores rendimentos dos óleos das folhas a 1900 m de altitude. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), existem relativamente poucos estudos relacionando as variações na altitude e a produção de metabólitos secundários nas plantas. Segundo os mesmos autores, a produção desses compostos pode ser influenciada por diversos fatores, como a sazonalidade, a temperatura, a radiação, a disponibilidade hídrica e a composição atmosférica. Sabe-se que muitos desses fatores influenciam

diretamente o desenvolvimento dos vegetais ao longo dos gradientes altitudinais (KÖRNER, 2007).

Tabela 3 Rendimento dos óleos essenciais de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

Material Vegetal	1900			2100		
	FF	FS	G	FF	FS	G
Massa (g)	55,77	36,24	80,05	55,77	35,16	80,03
Umidade (%)	67,00	0,00	50,50	53,00	0,00	51,50
*Rendimento (% p/p BLU)	0,92	1,02	0,03	0,48	0,80	0,03

FF = Folhas frescas; FS = Folhas secas; G = Caules frescos; BLU = Base Livre de Umidade; *Rendimento = Médias dos rendimentos dos óleos de 4 indivíduos de *D. brasiliensis*/cota altitudinal.

Vokou, Kokkini e Bessiere (1993), pesquisando variações nos óleos essenciais de *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* Ietsw. na Grécia mostraram que os maiores rendimentos dos óleos foram encontrados em plantas que crescem em baixas altitudes, o que, segundo os autores, é comum para a família Lamiaceae. Kizil (2010) evidenciou resultados semelhantes para *Thymbra spicata* var. *spicata* L. em regiões da Turquia, sendo os maiores rendimentos de óleo essencial encontrados para plantas presentes em baixas altitudes. Esses resultados foram atribuídos às temperaturas mais altas nas regiões de baixa altitude.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a produção de óleos essenciais parece ser favorecida por temperaturas mais elevadas, apesar de temperaturas

muito altas levarem a perdas excessivas desses metabólitos. Portanto, acredita-se que, possivelmente, a produção de óleos essenciais de *D. brasiliensis* foi favorecida por temperaturas mais altas a 1900 m de altitude (Tabela 1A), onde a espécie apresentou maior rendimento dos óleos essenciais de folhas frescas e secas.

4.2.2 Composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais de folhas frescas, secas e caules frescos de *D. brasiliensis* nas duas cotas altitudinais é apresentada na Tabela 4. Os cromatogramas de todos os óleos analisados encontram-se no Anexo B. Foram identificados 59 constituintes, representando de 92,81 a 98,75% da constituição química dos óleos. Houve predominância dos sesquiterpenos em todos os óleos, sendo os maiores valores encontrados nos óleos de caules frescos a 1900 m de altitude (81,46%). Os sesquiterpenos são derivados de três unidades de isopreno e possuem 15 átomos de carbono. Muitos desses compostos atuam na defesa das plantas como fitoalexinas, ou seja, como antibióticos produzidos pelas plantas em resposta a infecções microbianas, outros, atuam na prevenção da herbivoria (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Lago et al. (2010) evidenciaram a predominância dos sesquiterpenos nos óleos das folhas de *D. brasiliensis* (52,31%) coletadas em Campos do Jordão, SP, sendo os constituintes majoritários o α -cedreno (6,87%), o biciclogermacreno (5,31%), τ -muurolol (7,75%) e o drimenol (9,96%). Já nos óleos das cascas de caule, os autores mostraram que os monoterpenos estavam presentes em maiores proporções (90,02%). Ribeiro et al. (2008) também observaram a predominância dos sesquiterpenos (66,0%) nos óleos de folhas frescas e cascas de caule de *D. brasiliensis* coletados no Rio Grande do Sul.

Tabela 4 Composição química dos óleos essenciais de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

	Compostos	TR	IKt	IKc	FF 1900 (%)	FF 2100 (%)	FS 1900 (%)	FS 2100 (%)	G 1900 (%)	G 2100 (%)
	Monoterpenos Hidrocarbonetos				13,63	9,73	21,53	19,03	11,76	7,30
1	α -Thujeno	6,499	924	939	0,17	0,03	0,29	0,15	0,03	-
2	α -Pino	6,745	932	945	8,39	6,12	13,27	11,54	9,84	6,20
3	Canfeno	7,186	946	955	-	0,02	0,08	0,04	-	-
4	Sabineno	7,926	969	973	0,53	0,55	0,86	1,11	0,28	0,17
5	β -Pino	8,070	974	977	1,96	1,50	3,02	2,73	1,53	0,93
6	Mirceno	8,425	988	985	0,47	0,25	0,76	0,62	-	-
7	α -Terpineno	9,402	1014	1010	0,32	0,15	0,53	0,42	-	-
8	ρ -Cimeno	9,701	1020	1019	0,33	0,11	0,17	0,25	-	-
9	o-Cimeno	9,705	1022	1019	-	-	0,36	-	-	-
10	Limoneno	9,866	1024	1023	0,56	0,39	0,25	-	0,08	-
11	Silvestreno	9,869	1025	1023	-	-	0,44	1,03	-	-
12	γ -Terpineno	11,029	1054	1056	0,73	0,44	1,16	0,66	-	-
13	Terpinoleno	12,252	1086	1091	0,17	0,17	0,34	0,48	-	-
	Monoterpenos Oxigenados				2,33	1,29	2,45	1,91	5,53	3,19
14	1,8-Cineol	9,990	1026	1027	-	-	0,08	0,15	-	-
15	Linalol	12,715	1095	1103	-	-	-	-	0,07	-
16	Canfora	14,754	1146	1149	-	-	0,06	-	0,08	0,04
17	Terpinen-4-ol	16,220	1174	1182	1,92	1,00	2,16	1,38	3,64	1,29

...continua...

Tabela 4, continuação

18	p-Cimen-8-ol	16,591	1179	1190	-	-	-	-	-	0,21
19	α -Terpineol	16,827	1186	1201	0,41	0,29	0,15	0,38	1,74	1,65
	Sesquiterpenos Hidrocarbonetos				2,99	7,48	7,27	14,48	0,07	0,25
20	β -Elemeno	25,869	1389	1396	0,21	0,20	0,19	0,46	-	-
21	α -Funebreno	26,415	1402	1409	-	-	0,15	0,15	-	-
22	α -Gurjuneno	26,702	1409	1415	-	0,54	-	1,94	-	-
23	α -Cedreno	26,857	1410	1419	-	-	-	0,11	-	-
24	(E)-Cariofileno	27,135	1417	1425	-	-	1,11	0,55	-	-
25	β -Cariofileno	27,137	1417	1425	0,60	0,40	-	-	-	-
26	α -trans-Bergamoteno	27,736	1432	1439	-	-	-	0,09	-	-
27	Aromadendreno	27,979	1439	1445	-	-	0,13	-	-	-
28	cis-Muurola-3,5-dieno	28,452	1448	1456	-	-	-	0,08	-	-
29	α -Humuleno	28,617	1452	1460	-	-	0,39	0,18	-	-
30	(E)- β -Farneseno	28,630	1454	1460	-	0,48	-	0,37	-	-
31	(E)-9-epi-Cariofileno	28,940	1464	1467	-	-	-	0,13	-	-
32	trans-Cadina-1(6),4-dieno	29,441	1475	1479	-	-	-	0,16	-	-
33	γ -Curcumeno	29,644	1481	1483	0,35	2,86	2,36	5,32	-	0,12
34	β -Selineno	30,044	1489	1493	-	-	0,30	0,09	-	-
35	trans-Muurola-4(14),5-dieno	30,311	1493	1499	-	-	-	0,17	-	-
36	Biciclogermacreno	30,484	1500	1503	1,69	2,03	2,30	2,73	0,07	0,13
37	β -Curcumeno	30,995	1514	1515	-	0,55	0,26	0,68	-	-
38	δ -Cadineno	31,543	1522	1529	0,14	0,42	0,08	1,14	-	-
39	Zonareno	31,664	1528	1532	-	-	-	0,13	-	-
	Sesquiterpenos Oxigenados				74,62	59,92	56,56	50,23	81,39	73,90

...continua...

Tabela 4, continuação

40	Elemol	32,749	1548	1558	6,72	6,08	4,62	4,60	9,91	4,01
41	(E)-Nerolidol	33,127	1561	1568	-	0,15	0,10	-	-	0,09
42	Palustrol	33,487	1567	1577	-	0,22	-	0,35	-	0,03
43	Espatulanol	33,916	1577	1587	0,70	1,06	0,68	0,86	1,65	3,23
44	Viridiflorol	34,509	1592	1602	-	1,02	-	0,53	0,25	0,18
45	Ledol	34,942	1602	1613	-	-	-	0,16	-	-
46	10-epi- γ -Eudesmol	35,615	1622	1630	0,45	0,29	0,10	0,19	0,09	-
47	β -Acorenol	36,023	1636	1640	-	-	-	-	-	0,91
48	Hinesol	36,290	1640	1647	21,42	15,20	15,85	11,91	20,61	8,73
49	α -Cadinol	36,954	1652	1664	-	-	-	0,20	-	-
50	β -Eudesmol	37,016	1649	1665	26,16	15,92	19,63	12,70	29,27	11,10
51	α -Eudesmol	37,112	1652	1668	19,17	13,53	15,37	10,78	19,61	8,69
52	Epi- β -Bisabolol	37,456	1670	1676	-	0,92	0,21	0,63	-	0,31
53	β -Bisabolol	37,459	1674	1677	-	-	-	-	-	0,15
54	Epi-Ciclocolorenona	41,114	1774	1775	-	5,53	-	7,32	-	36,47
Fenilpropanoides					2,02	14,39	7,11	7,48	0,00	8,95
55	Safrol	21,334	1285	1295	1,87	11,84	5,42	7,48	-	5,04
56	Eugenol	24,435	1356	1364	-	-	0,34	-	-	0,12
57	Metil Eugenol	26,439	1403	1409	0,15	-	-	-	-	-
58	Miristicina	31,658	1517	1532	-	2,55	1,35	-	-	2,94
59	2,6-Dimetóxi-4-alilfenol	34,956	*	1613	-	-	-	-	-	0,85
Total identificado (%)					95,59	92,81	94,92	93,13	98,75	93,59

TR = tempo de retenção em minutos fornecido pelo CG/EM; IKt = índice de Kovats tabelado (ADAMS, 2007); IKc = índice de Kovats calculado; FF = óleos das folhas frescas; FS = óleos das folhas secas; G = óleos dos caules frescos; % = porcentagem do componente; * Fonte: WILEY8.

Pesquisas de Limberger et al. (2007) mostraram que, nos óleos de folhas frescas e secas de *D. brasiliensis*, foram encontrados teores equivalentes de monoterpenos (31,2% a 53,9%) e sesquiterpenos (37,1% a 65,4%), já nos óleos de frutos e cascas do caule, houve predominância dos sesquiterpenos (75,5% a 93,4%).

No presente estudo, não foram detectados os sesquiterpenos drimanicos drimenol e poligodial, comuns aos óleos de *Drimys* sp. (CICCIÓ, 1997; MALHEIROS et al., 2001; MUÑOZ-CONCHA et al., 2007). Porém, ressalta-se que os sesquiterpenos foram os constituintes mais abundantes em todos os óleos analisados neste trabalho, o que está em concordância com a literatura.

Além de sesquiterpenos, foram encontrados monoterpenos e fenilpropanoides nos óleos essenciais de folhas e caules de *D. brasiliensis* (Tabela 4). As maiores proporções de monoterpenos foram encontradas nos óleos de folhas secas (23,98% a 1900 m, e 20,94% a 2100 m de altitude). Já os fenilpropanoides, parecem ser os constituintes que mais responderam à elevação da altitude. Nas folhas frescas e caules frescos, essa resposta é ainda mais evidente, pois a 1900 m, os fenilpropanoides foram identificados em proporções de 2,02% e 0%, respectivamente. A 2100 m, as proporções elevaram-se para 14,39% e 8,95%. Infere-se, portanto, que a elevação da altitude favoreceu a biossíntese dos fenilpropanoides em *D. brasiliensis*.

Os fenilpropanoides mais simples (C6C3) possuem em suas estruturas um anel aromático ligado a uma cadeia lateral de três carbonos, que apresenta uma dupla ligação (DIXON et al., 2002; BRIELMAN et al., 2006). Grande parte dos fenilpropanoides é derivada do ácido cinâmico, que é formado a partir do aminoácido fenilalanina pela atividade de desaminação da fenilalanina amonialiase (FAL) (DIXON; PAIVA, 1995; DIXON et al., 2002; ZIAEI et al., 2012). A enzima fenilalanina amonialiase exerce um papel fundamental na regulação da produção de fenilpropanoides em plantas. Essa enzima encontra-se

bastante estudada e representa o ponto chave entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário dos fenilpropanoides. Sabe-se que muitos fatores afetam a biossíntese de fenilalanina amonialiase e, conseqüentemente, a síntese de fenilpropanoides em plantas, como a idade da planta, a herbivoria, a radiação UV e baixas temperaturas (ZIAEI et al., 2012).

Muitos fenilpropanoides são produzidos em resposta a algum estresse biótico ou abiótico. Alguns desses compostos possuem propriedades antimicrobianas e são considerados fitoalexinas, pois atuam na defesa das plantas contra ataques de patógenos, apresentando concentrações consideravelmente elevadas perto do local da infecção. Outros fenilpropanoides têm sua biossíntese estimulada em plantas com ferimentos e sob o ataque de herbívoros. Alguns destes constituintes, como as antocianinas e os flavonoides, aumentam suas concentrações em resposta a elevadas taxas de radiação visível e UV. Sabe-se, também, que muitos têm a biossíntese favorecida por baixas temperaturas e estresse nutricional, porém a influência desses fatores na produção de fenilpropanoides ainda é incerta (DIXON; PAIVA, 1995).

É importante ressaltar que, na maioria das vezes, a produção de metabólitos secundários nas plantas é influenciada por diversos fatores atuando em ação sinérgica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Desse modo, argumenta-se que a temperatura é, possivelmente, um dos fatores que podem influenciar a composição química dos óleos essenciais de *D. brasiliensis*. Temperaturas mais baixas a 2100 m de altitude (Tabela 1A), provavelmente, podem ter favorecido a rota dos fenilpropanoides.

Neste trabalho, os fenilpropanoides identificados foram o safrol, o eugenol, o metil eugenol, a miristicina e o 2,6-dimetóxi-4-alilfenol. Com exceção do 2,6-dimetóxi-4-alilfenol, todos esses compostos já foram encontrados nos óleos essenciais de *D. brasiliensis* (LIMBERGER et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; LAGO et al., 2010; GOMES et al., 2013).

Os compostos majoritários presentes nos óleos de *D. brasiliensis* foram o hinesol, o β -eudesmol, o α -eudesmol, o elemol, a epi-ciclocolorenona, o α -pineno e o safrol (Figura 11). As Figuras 12, 13 e 14 representam a porcentagem desses constituintes nos óleos de folhas frescas, secas e caules frescos da espécie a 1900 e 2100 m de altitude.

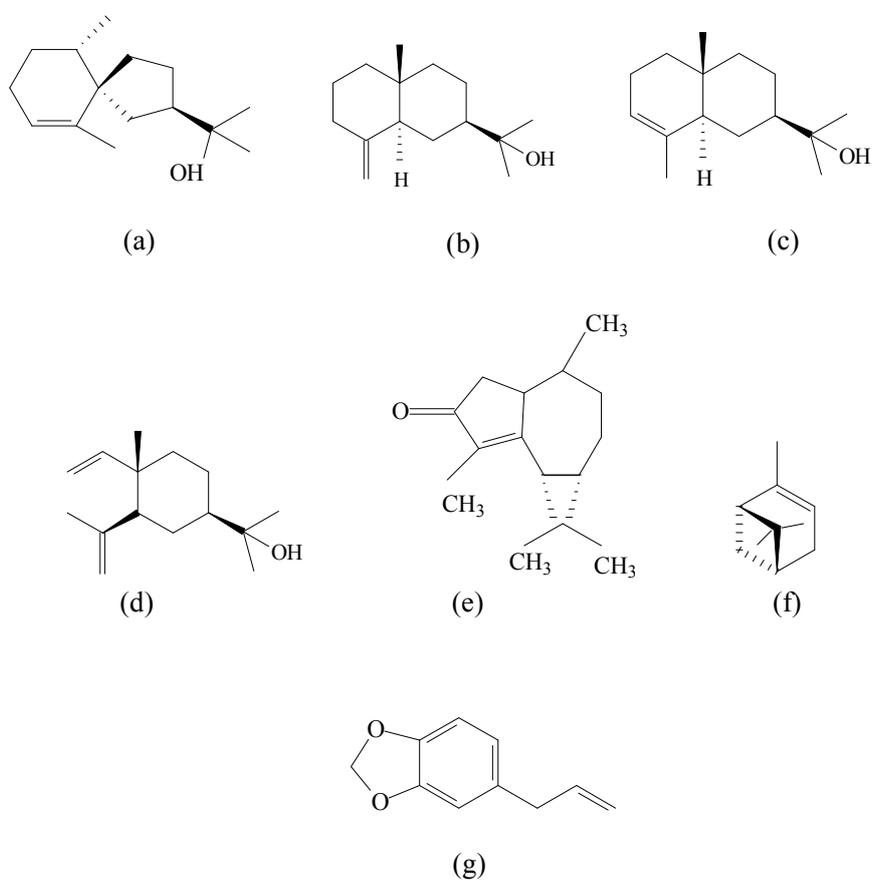


Figura 11 Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Drimys brasiliensis* Miers. (a) Hinesol; (b) β -Eudesmol; (c) α -Eudesmol; (d) Elemol; (e) Epi-ciclocolorenona; (f) α -Pineno; (g) Safrol.

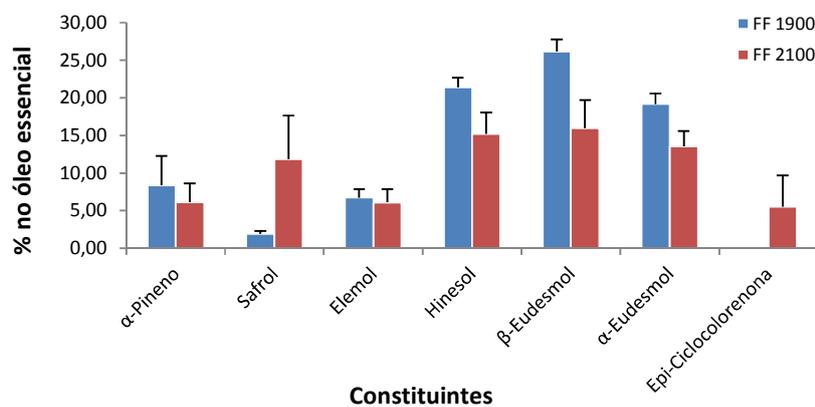


Figura 12 Constituintes majoritários dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

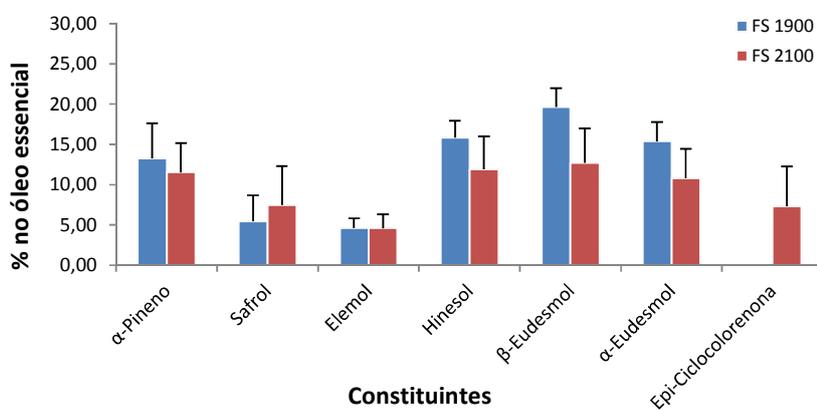


Figura 13 Constituintes majoritários dos óleos essenciais de folhas secas (FS) de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

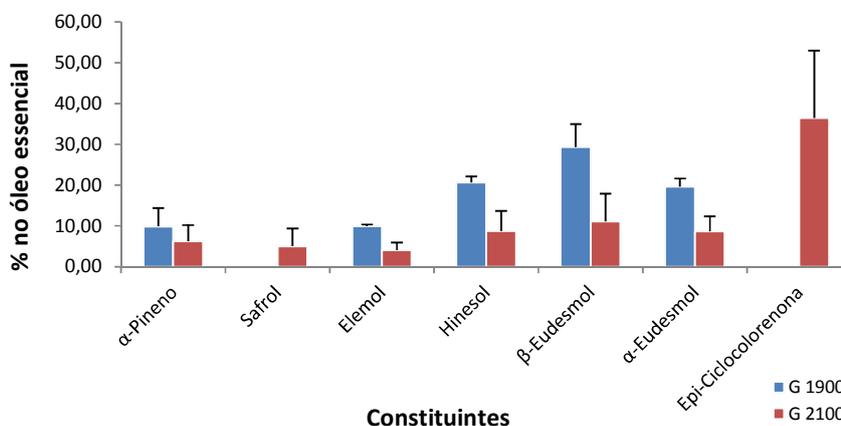


Figura 14 Constituintes majoritários dos óleos essenciais de caules frescos (G) de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

Analisando-se as Figuras 12, 13 e 14, percebe-se que os sesquiterpenos hinesol, β -eudesmol e α -eudesmol foram biossintetizados em grandes proporções nos óleos das folhas de *D. brasiliensis* nas duas cotas altitudinais. Destaca-se, ainda, que esses compostos foram produzidos em maiores proporções a 1900 m de altitude em todos os óleos essenciais. Esses resultados corroboram a predominância dos sesquiterpenos nos óleos da espécie.

O hinesol, o β -eudesmol e o α -eudesmol são classificados como álcoois sesquiterpênicos terciários, caracterizados pela presença de um grupo hidroxila (-OH) ligado a um carbono terciário (SOLOMONS; FRYHLE, 2002). A presença desses álcoois sesquiterpênicos entre os constituintes majoritários dos óleos de *D. brasiliensis* torna-se relevante pela diversidade de potencialidades biológicas já descritas para esses compostos. Miyazawa et al. (1996) demonstraram o potencial antimutagênico do β -eudesmol extraído dos rizomas de *Dioscorea japonica* Thunb. (Dioscoreaceae). Jalali et al. (2013) citaram que o

α - eudesmol demonstrou ser um composto capaz de induzir a apoptose em células tumorais. Além disso, Ouyang et al. (2012) mencionaram que o hinesol provou ser um composto inibidor da secreção de suco gástrico em ratos. Esse composto também demonstrou ser capaz de melhorar a circulação e o metabolismo do cérebro.

Portanto, os álcoois sesquiterpênicos de *D. brasiliensis* são compostos promissores para futuros trabalhos que investiguem as atividades biológicas dos óleos essenciais da espécie. Embasando-se nos resultados do presente estudo, recomenda-se para essas pesquisas a utilização das folhas de *D. brasiliensis* coletadas em altitudes mais baixas, onde esses compostos foram biossintetizados em maiores proporções nos óleos essenciais.

A análise das Figuras 12, 13 e 14, também permite ressaltar que a epi-ciclocolorenona, uma cetona sesquiterpênica, foi biossintetizada apenas a 2100 m de altitude em todos os óleos essenciais. Desse modo, percebe-se que a elevação da altitude favoreceu a biossíntese desse composto em *D. brasiliensis*, além de favorecer a formação dos fenilpropanoides. As maiores proporções de epi-ciclocolorenona foram encontradas nos óleos de caules frescos (36,47%), seguidos de folhas secas (7,32%) e folhas frescas (5,53%). Esses resultados sugerem que esse composto, possivelmente, apresenta biossíntese no caule e é translocado para as folhas.

Trabalhos de Limberger et al. (2007), Ribeiro et al. (2008) e Gomes et al. (2013) evidenciaram a presença da ciclocolorenona como constituinte majoritário dos óleos de *D. brasiliensis*. A epi-ciclocolorenona difere-se da ciclocolorenona apenas pela presença de um grupo 1,1-dimetilciclopropano voltado para trás, como pode ser observado na Figura 15.

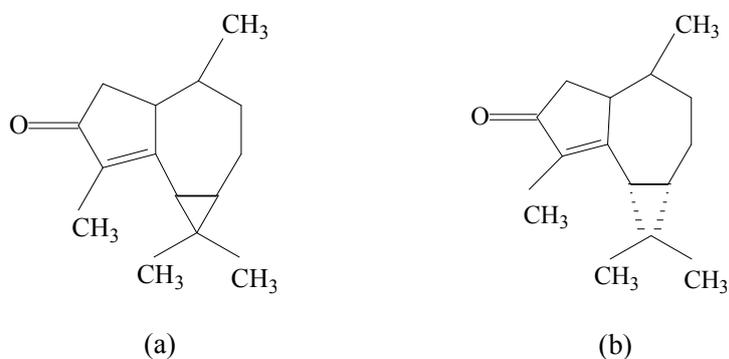


Figura 15 Estruturas químicas da ciclocolorenona (a) e da epi-ciclocolorenona (b).

A ciclocolorenona tem pequena ocorrência na natureza e já foi relatada em *Pseudowintera colorata* (Raoul) Dandy e *Tasmannia* sp., pertencentes à família Winteraceae, além de *Solidago canadensis* L. (Asteraceae), *Ledum palustre* L. (Ericaceae) e *Magnolia grandiflora* L. (Magnoliaceae) (RIBEIRO et al., 2008).

4.2.3 Análise de Componentes Principais (ACP)

A análise dos óleos essenciais pela técnica de ACP mostrou que, com a primeira componente e a segunda componente principal, foi possível descrever 96,85% dos dados, sendo 81,27% da variância total descrita pela primeira componente principal (Figura 16). A ACP permitiu separar os óleos voláteis de *D. brasiliensis* em três grupos, que expressam as semelhanças e diferenças desses óleos em relação aos seus constituintes químicos. Além disso, a ACP corroborou com todos os resultados já discutidos neste trabalho para os óleos de *D. brasiliensis*.

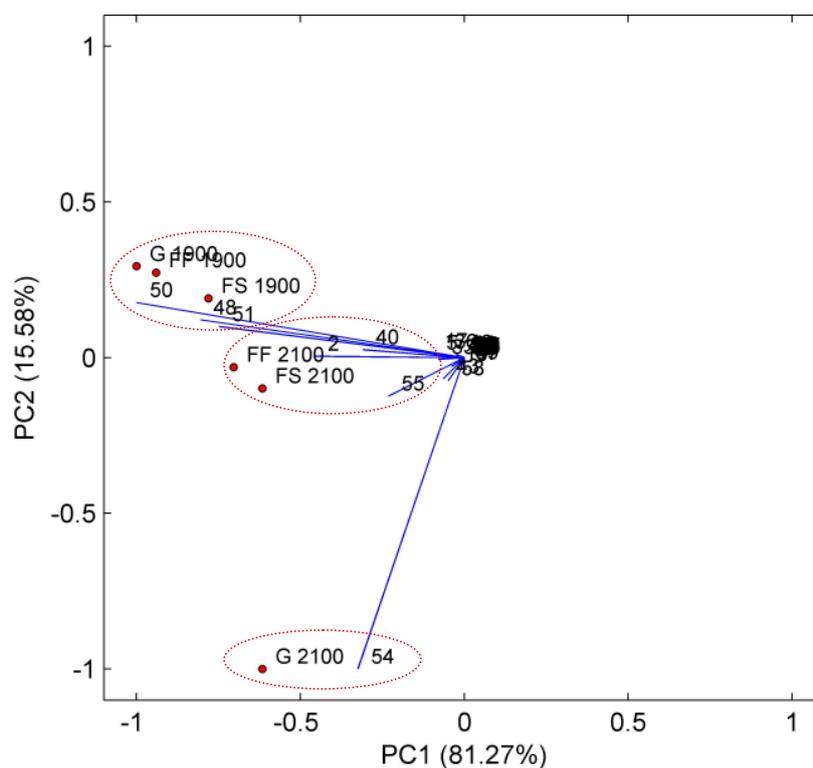


Figura 16 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores para os óleos essenciais de folhas frescas (FF), folhas secas (FS) e caules frescos (G) de *Drimys brasiliensis* Miers presente a 1900 e 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG, em relação às proporções de seus constituintes químicos. *Os constituintes correspondem aos números apresentados na Tabela 4.

Observando-se a Figura 16, pode-se constatar que os óleos dos caules frescos a 2100 m de altitude diferiram dos outros grupos pelo composto 54, a epi-ciclocolorenona. Esse resultado corrobora com as Figuras 12, 13 e 14, que mostraram que a epi-ciclocolorenona foi biossintetizada apenas a 2100 m de

altitude em todos os óleos, e em maiores proporções nos óleos de caules frescos (36,47%).

Os óleos das folhas frescas e secas a 2100 m de altitude foram separados pela presença dos compostos 2, 40 e 55 (α -pineno, elemol e safrol). Destaca-se que, nas folhas, o safrol foi biossintetizado em maiores proporções a 2100 m de altitude (Figuras 12 e 13) e, nos caules, só foi formado a 2100 m (Figura 14), evidenciando que a elevação da altitude favoreceu a produção de fenilpropanoides em *D. brasiliensis*.

O outro grupo foi formado por todos os óleos de *D. brasiliensis* a 1900 m de altitude, separados pelos compostos 48, 50 e 51, ou seja, o hinesol, o β -eudesmol e o α -eudesmol, respectivamente. Esse resultado também corrobora com as Figuras 12, 13 e 14, nas quais ressalta-se que esses constituintes foram biossintetizados em maiores proporções a 1900 m de altitude em todos os óleos essenciais.

Esses resultados evidenciaram que a produção de óleos essenciais de *D. brasiliensis*, assim como a produção de outros metabólitos secundários, é fortemente influenciada pelos fatores ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). É importante ressaltar que a altitude, por si só, não provoca alterações diretas no metabolismo das plantas, mas está correlacionada com variações em diversos fatores ambientais (temperatura, radiação, pressão atmosférica) que influenciam o desenvolvimento dos vegetais ao longo dos gradientes altitudinais (KÖRNER, 2007).

5 CONCLUSÃO

D. brasiliensis apresentou alta plasticidade fenotípica nas cotas altitudinais estudadas. Em relação à sua anatomia foliar, a espécie exibiu características adaptativas que podem maximizar a absorção de CO₂ a 2100 m de altitude, onde ocorre diminuição na pressão parcial desse gás atmosférico. Essas características foram a formação de papilas na superfície abaxial das folhas, o aumento na densidade e índice estomáticos, a diminuição na espessura dos tecidos foliares e o aumento de espaços intercelulares no mesofilo.

Os óleos essenciais de *D. brasiliensis* apresentaram rendimento entre 0,03 e 1,02%, sendo os maiores valores encontrados para as folhas. Foram identificados 59 constituintes químicos nos óleos da espécie, com a predominância dos sesquiterpenos. Puderam-se inferir duas tendências da espécie em relação ao seu metabolismo secundário e à altitude. Observou-se o favorecimento da biossíntese de álcoois sesquiterpênicos (hinesol, β-eudesmol e α-eudesmol) a 1900 m de altitude, e o favorecimento da formação de fenilpropanoides e da epi-ciclocolorenona, uma cetona sesquiterpênica, a 2100 m.

Este trabalho impulsiona novos estudos que investiguem as características adaptativas de *D. brasiliensis* nas florestas de altitude. Além disso, seus óleos essenciais apresentaram compostos promissores para futuras avaliações de potencialidades biológicas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, D. C. A. et al. Caracterização morfológica de frutos e sementes de cataia (*Drimys brasiliensis* Miers. - Winteraceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 2, p. 67-74, dez. 2005.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007.
- ALDRICH, M. et al. **Tropical montane cloud forests: an urgent priority for conservation**. Cambridge: World Conservation Monitoring Centre, 1997. (Biodiversity Bulletin, 2).
- BERTONCELLO, R. et al. A phytogeographic analysis of cloud forests and other forest subtypes amidst the Atlantic Forests in south and southeast Brazil. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 20, n. 14, p. 3413-3433, Dec. 2011.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 5, p. 839–851, Oct. 2001.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1, p. 198-199.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, 2002.
- BRASIL. Presidência da República. **Lei Federal nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006**. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111428.htm>. Acesso em: 13 jan. 2013.
- BREWER, C. A.; SMITH, W. K. Patterns of leaf surface wetness for montane and subalpine plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-11, 1997.
- BRIELMAN, H. L. et al. Phytochemicals: the chemical components of plants. In: _____. **Natural products from plants**. 2. ed. London: Taylor & Francis Group, 2006. 22 p.

- BROWN, G. D. Drimendiol, a sesquiterpene from *Drymis winterii*. **Phytochemistry**: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 35, n. 4, p. 975-977, Mar. 1994.
- BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* Leaves: β -Amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. **Plant Physiology**, Washington, v. 160, n. 2, p. 1120-1129, Oct. 2012.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. p. 37-63.
- CECHINEL FILHO, V. et al. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 62, n. 3, p. 223-227, Oct. 1998.
- CICCIÓ, J. F. Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis* (Winteraceae). **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v. 44, n. 3, p. 29-33, Mar. 1997.
- CORRÊA, D. S. et al. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 231-236, July 2011.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: _____. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Chichester: J. Wiley, 2000. p. 1250-1318.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**: células e tecidos. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. Parte 1.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2. ed. Chichester: J. Wiley, 2002.
- DIXON, R. A. et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 1-3, n. 5, p. 371-390, Sept. 2002.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, July 1995.

DODD, R. S.; POVEDA, M. M. Environmental gradients and population divergence contribute to variation in cuticular wax composition in *Juniperus communis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 1257-1270, Nov. 2003.

DOOL, H. van den.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, Aug. 1963.

EHRENDORFER, F.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Variation on the population, racial, and species level in the primitive relic angiosperm genus *Drimys* (Winteraceae) in South America. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 132, n. 1-2, p. 53-83, 1979.

ELLER, C. B.; LIMA, A. L.; OLIVEIRA, R. S. Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). **New Phytologist**, Cambridge, v. 199, n. 1, p. 151-162, July 2013.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blucher, 1974.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, n. 1, p. 123-142, Jan. 1968.

FEILD, T. S. et al. Stomatal plugs of *Drimys winteri* (Winteraceae) protect leaves from mist but not drought. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, Stanford, v. 95, n. 24, p. 14256-14259, Apr. 1998.

FEILD, T. S.; HOLBROOK, N. M. Xylem sap flow and stem hydraulics of the vesselless angiosperm *Drimys granadensis* (Winteraceae) in a Costa Rican elfin forest. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, p. 1067-1077, 2000.

FEILD, T. S.; ZWIENIECKI, M. A.; HOLBROOK, N. M. Winteraceae evolution: an ecophysiological perspective. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 87, n. 3, p. 323-334, Summer, 2000.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6 (Build 61). Lavras: UFLA/DEX, 2003. Software.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 13, n. 6, p. 742-753, Nov./Dec. 2002.

FIGUEIREDO, A. C. S. et al. **Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos**. 1. ed. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007.

FRANÇA, G. S.; STEHMANN, J. R. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de uma floresta altimontana no município de Camanducaia, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 19-30, jan./mar. 2004.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período 2008-2010**. São Paulo, 2011. p. 19-20.

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

GOMES, M. R. F. et al. Citotoxic activity evaluation of essential oils and nanoemulsions of *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis* on human glioblastoma (U-138 MG) and human bladder carcinoma (T24) cell lines *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 259-267, mar./abr. 2013.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma? **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2105-2114, 2012.

GOTTLIEB, O. R. Phytochemicals: differentiation and function. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 29, n. 6, p. 1715-1724, 1990.

GREENWOOD, D. R.; SCARR, M. J.; CHRISTOPHEL, D. C. Leaf stomatal frequency in the Australian tropical rainforest tree *Neolitsea dealbata* (Lauraceae) as a proxy measure of atmospheric $p\text{CO}_2$. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, Amsterdam, v. 196, n. 3-4, p. 375-393, Aug. 2003.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

HERRAIZ-PEÑALVER, D. et al. Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil from Spanish wild populations. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 46, p. 59-68, 2013.

JACOBS, J. F.; KOPER, G. J. M.; URSEM, W. N. J. UV protective coatings: a botanical approach. **Progress in Organic Coatings**, Lausanne, v. 58, n. 2-3, p. 166-171, Feb. 2007.

JALALI, H. T. et al. Assessment of the sesquiterpenic profile of *Ferula gummosa* oleo-gum-resin (galbanum) from Iran. Contributes to its valuation as a potential source of sesquiterpenic compounds. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 44, p. 185-191, Jan. 2013.

JOLY, C. A. Biodiversidade e mudanças climáticas: contexto evolutivo, histórico e político. **Ambiente e Sociedade**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 169-172, jan./jun. 2007.

KIZIL, S. Determination of essential oil variations of *Thymbra spicata* var. *spicata* L. naturally growing in the wild flora of east mediterranean and southeastern anatolia regions of Turkey. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 593-600, Nov. 2010.

KOFIDIS, G.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of altitude and season on glandular hairs and leaf structural traits of *Nepeta nuda* L. **Botanical Studies**, New York, v. 49, p. 363-372, 2008.

KOFIDIS, G.; BOSABALIDIS, A. M.; MOUSTAKAS, M. Combined effects of altitude and season on leaf characteristics of *Clinopodium vulgare* L. (Labiatae). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 60, p. 69-76, 2007.

KÖRNER, C.; COCHRANE, P. M. Stomatal responses and water relations of *Eucalyptus pauciflora* in summer along an elevational gradient. **Oecologia**, Berlin, v. 66, n. 3, p. 443-455, June 1985.

KÖRNER, C. The use of 'altitude' in ecological research. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 22, n. 11, p. 569-574, 2007.

KOUWENBERG, L. L. R.; KÜRSCHNER, W. M.; MCELWAIN, J. C. Stomatal frequency change over altitudinal gradients: prospects for paleoaltimetry. **Reviews in Mineralogy & Geochemistry**, v. 66, n. 1, p. 215-241, 2007.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.

LAGO, J. H. G. et al. Chemical composition and anti-inflammatory evaluation of essential oils from leaves and stem barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 9, p. 1760-1765, 2010.

LAKE, J. A. et al. Signals from mature to new leaves. **Nature**, v. 411, p. 154, May 2001.

LI, C. et al. Leaf morphological and physiological responses of *Quercus aquifolioides* along an altitudinal gradient. **Silva Fennica**, Helsinki, v. 40, n. 1, p. 5-13, 2006.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenoides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 10, n. 2, p.71-77, ago./dez. 2003.

LIMBERGER, R. P. et al. Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 130-137, Mar. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 538 p.

MALHEIROS, A. et al. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 57, p.103-107, May 2001.

MALHEIROS, A. et al. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided fractionation. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 335-339, 2005.

MARQUÍNEZ, X. et al. Generic relationships and dating of lineages in Winteraceae based on nuclear (ITS) and plastid (*rpS16* and *psbA-trnH*) sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 53, n. 2, p. 435-449, Nov. 2009.

MEIRELES, L. D.; SHEPHERD, G. J.; KINOSHITA, L. S. Variações na composição florística e na estrutura fitossociológica de uma floresta ombrófila densa alto-montana na Serra da Mantiqueira, Monte Verde, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 559-574, out./dez. 2008.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. London: Oxford University, 1957. v. 1, p. 25-30.

MIYAZAWA, M. et al. Antimutagenic Activity of (+)- β -Eudesmol and Paeonol from *Dioscorea japonica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 1647-1650, 1996.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

MONSÁLVEZ, M. et al. Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of *Drimys winteri* bark against take-all disease. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 239-244, Mar. 2010.

MUÑOZ-CONCHA, D. et al. Presence of polygodial and drimenol in *Drimys* populations from Chile. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 434-438, July 2007.

MUÑOZ-CONCHA, D.; VOGEL, H.; RAZMILIC, I. Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. **Revista Chilena de Historia Natural**, Santiago de Chile, v. 77, n. 1, p. 43-50, Mar. 2004.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAUTIYAL, S.; PUROHIT, A. N. High altitude acclimatization in plants: stomatal frequency and anatomical changes in leaves of *Artemisia* species. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 22, n. 4, p. 282-286, 1980.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012.

OUYANG, Z. et al. Identification and quantification of sesquiterpenes and polyacetylenes in *Atractylodes lancea* from various geographical origins using GC-MS analysis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 957-963, Apr. 2012.

PANE, E. **Estudo hidrológico, hidrogeológico e geofísico no município de Itamonte-MG**. 2001. p. 21-26. Dissertação (Mestrado em Geociências)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

PEREIRA, F. J. et al. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 259-267, abr./jun. 2011.

PIMENTEL, F. A. et al. Influência da temperatura de secagem sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 523-526, 2008.

POMPEU, P. V. **Composição e estrutura de uma floresta ombrófila densa ao longo de um gradiente altitudinal na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais**. 2011. p. 21-22. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

READ, C.; MENARY, R. Analysis of the contents of oil cells in *Tasmania lanceolata* (Poir.) A. C. Smith (Winteraceae). **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 6, p. 1193-1197, 2000.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 102, n. 3, p. 531-535, Feb. 2008.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**: an international journal on natural and synthetic regulators, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, May 2001.

SANTOS, R. I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: _____. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 403-434.

SHEPHERD, T.; GRIFFITHS, D. W. The effects of stress on plant cuticular waxes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, n. 3, p. 469-499, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: _____. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 467-495.

SMITH, A. C. The american species of *Drimys*. **Journal of the Arnold Arboretum**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 1-33, 1943.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. 2 v.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 76 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 234-239.

TROPICOS. *Drimys brasiliensis* Miers. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 18 set. 2013.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. 123 p.

VICHNEWSKI, W.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. Drimane derivatives from *Drimys brasiliensis*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 25, n. 6, p. 1476-1478, May 1986.

VIEIRA, R. C.; GOMES, D. M. S. Superfície da lâmina foliar de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra, *P. leiocarpa* Cham. & Schltdl., *P. stenocalyx* Müll. Arg. e *P. tenuinervis* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 263-270, dez. 1995.

VOKOU, D.; KOKKINI, S.; BESSIERE, J. M. Geographic variation of greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 287-295, Mar. 1993.

WEBSTER, G. L. The panorama of neotropical cloud forests. In: **Biodiversity and conservation of neotropical montane forests**. New York: The New York Botanical Garden, 1995. p. 53-77.

WEST, W. C. Ontogeny of oil cells in the woody Ranales. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 96, n. 3, p. 329-344, May/June 1969.

WHITTAKER, R. H. Direct gradient analysis: results. In: _____. **Ordination and classification of communities**. The Hague: Handbook of Vegetation Science, 1973. p. 9-31.

WOODWARD, F. I. Ecophysiological studies on the shrub *Vaccinium myrtillus* L. taken from a wide altitudinal range. **Oecologia**, Berlin, v. 70, n. 4, p. 580-586, Nov. 1986.

ZARINKAMAR, F.; TAJIK, S.; SOLEIMANPOUR, S. Effects of altitude on anatomy and concentration of crocin, picrocrocin and safranal in *Crocus sativus* L. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 7, p. 831-838, July 2011.

ZHAO, C. et al. Altitudinal differences in the leaf fitness of juvenile and mature alpine spruce trees (*Picea crassifolia*). **Tree Physiology**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 133-141, Jan. 2008.

ZHOU, Y. et al. Non-linear response of stomata in *Pinus koraiensis* to tree age and elevation. **Trees**, Santa Mônica, v. 26, n. 4, p.1389-1396, Aug. 2012.

ZIAEI, M. et al. Gene expression and activity of phenyl alanine amonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. **Iranian Journal of Biotechnology**, Tarbiat Moddares, v. 10, n. 1, p. 32-39, Jan. 2012.

ANEXOS**ANEXO A**

Tabela 1A	Médias dos parâmetros microclimáticos em duas cotas altitudinais (1900 e 2100 m) em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	79
-----------	--	----

Tabela 1A Médias dos parâmetros microclimáticos em duas cotas altitudinais (1900 e 2100 m) em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

	1900	2100
Radiação (watt/m ²)	11,2	24,6
Horas de sol (h)	8,0	8,6
Umidade relativa do ar (%)	81,6	83,5
Umidade máxima (%)	91,3	94,0
Umidade mínima (%)	68,0	67,0
Temperatura (°C)	13,1	11,8
Temperatura máxima (°C)	16,6	16,0
Temperatura mínima (°C)	10,1	8,4
Velocidade do vento (km/h)	0,4	0,5
Velocidade do vento máxima (km/h)	11,0	11,0
Ponto de orvalho (°C)	9,7	8,7
Ponto de orvalho máximo (°C)	17,6	17,3
Ponto de orvalho mínimo (°C)	-18,1	-21,3

*Acompanhamento realizado durante o período de um ano por estações meteorológicas (WatchDog modelo 2900ET) instaladas em cada cota altitudinal.

ANEXO B

Figura 1B	Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) de quatro indivíduos de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presentes a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	81
Figura 2B	Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) de quatro indivíduos de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presentes a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	82
Figura 3B	Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas secas (FS) de quatro indivíduos de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presentes a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	83
Figura 4B	Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas secas (FS) de quatro indivíduos de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presentes a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	84
Figura 5B	Cromatogramas dos óleos essenciais de caules frescos (G) de quatro indivíduos de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presentes a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	85
Figura 6B	Cromatogramas dos óleos essenciais de caules frescos (G) de quatro indivíduos de <i>Drimys brasiliensis</i> Miers presentes a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.....	86

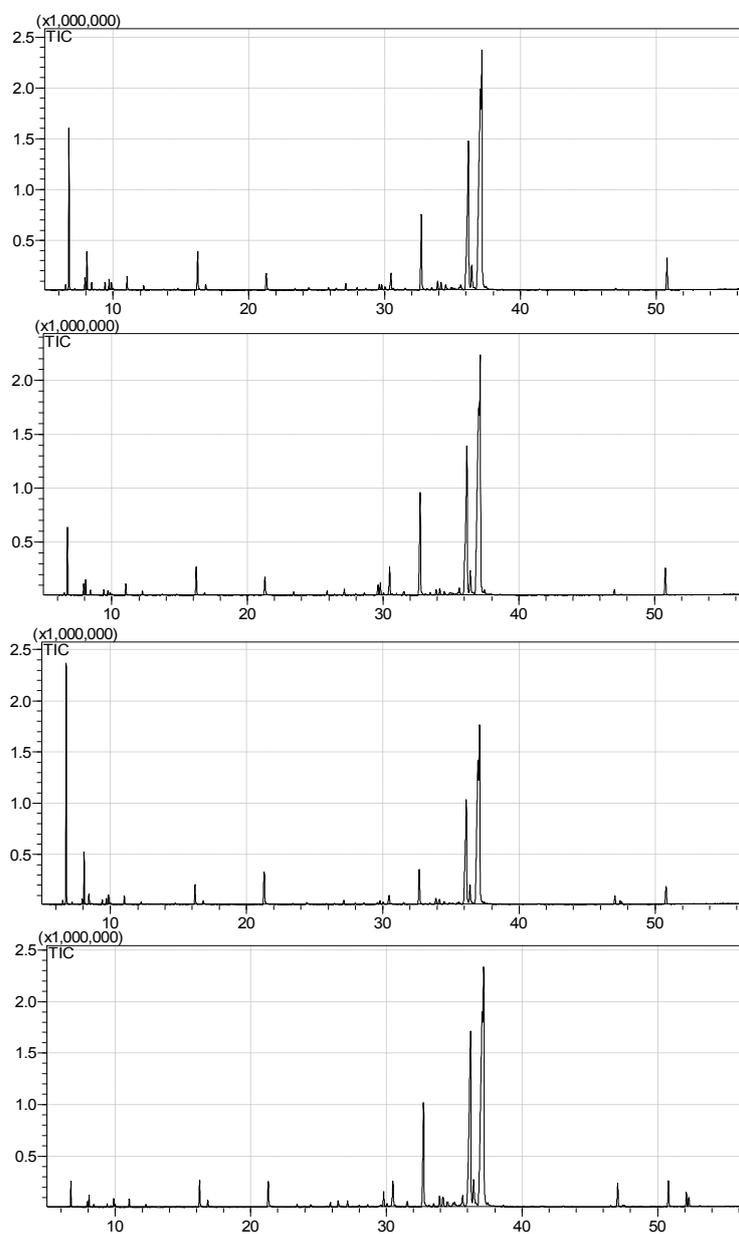


Figura 1B Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) de quatro indivíduos de *Drimys brasiliensis* Miers presentes a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

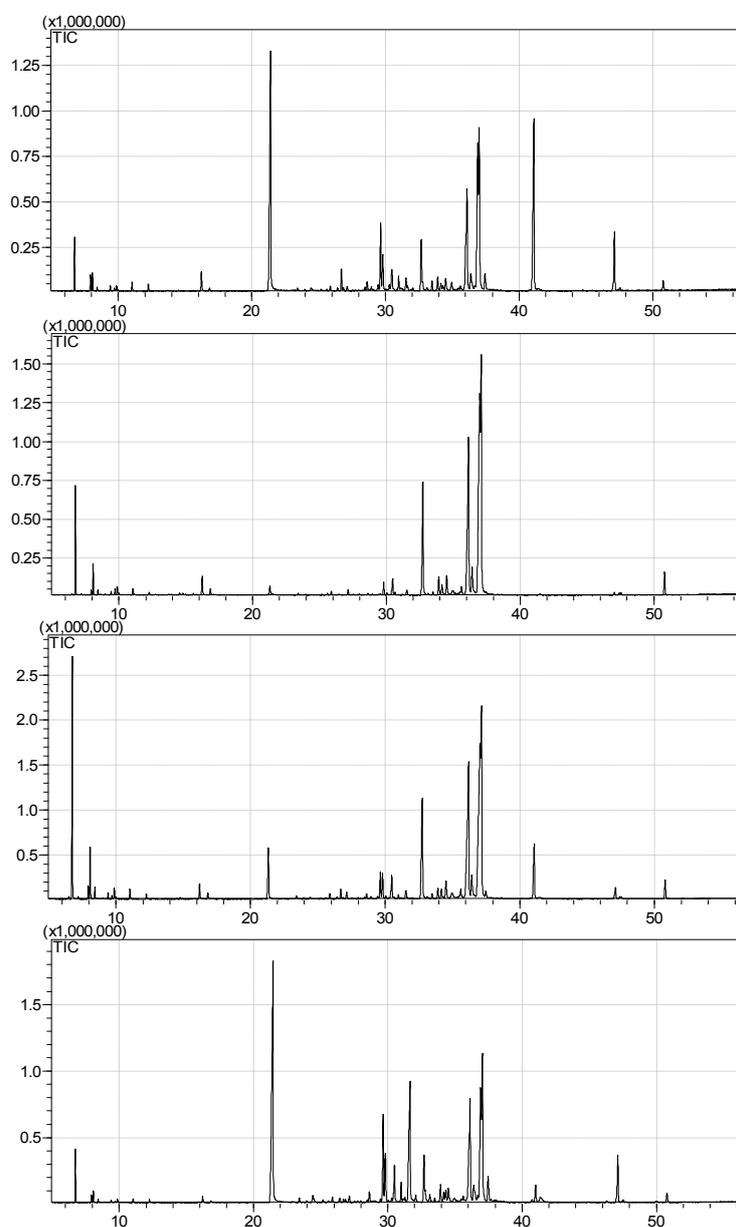


Figura 2B Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) de quatro indivíduos de *Drimys brasiliensis* Miers presentes a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

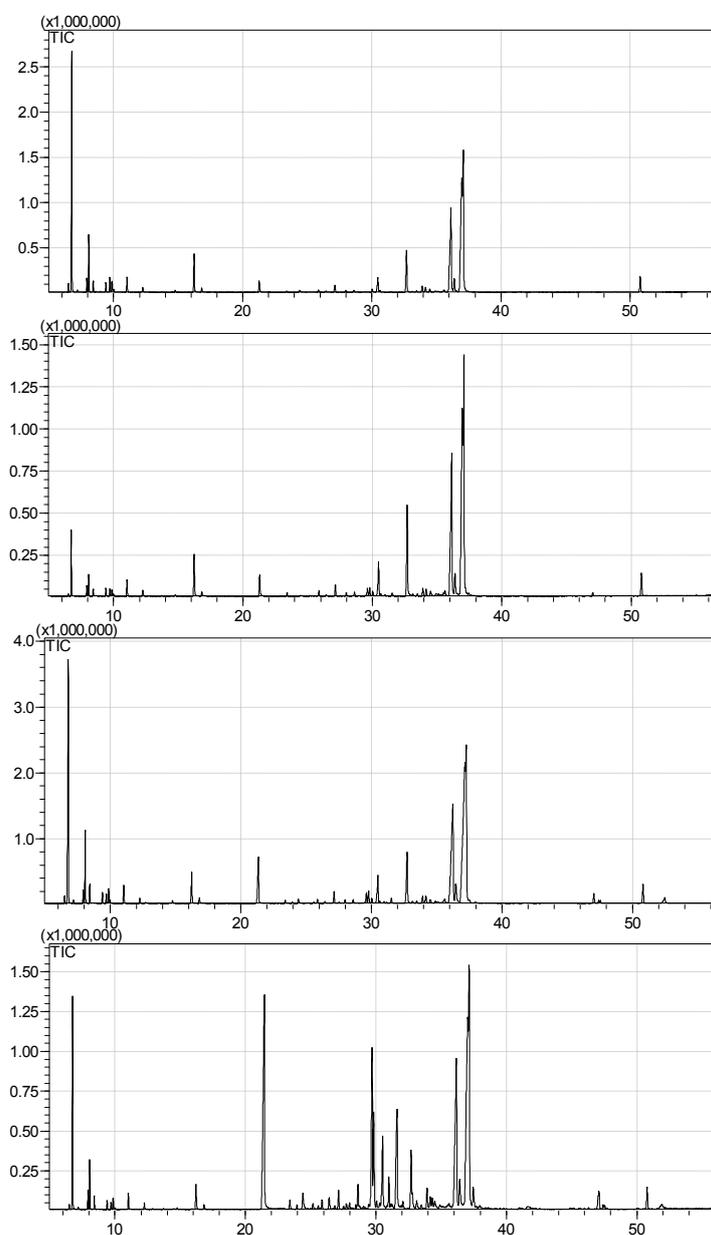


Figura 3B Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas secas (FS) de quatro indivíduos de *Drimys brasiliensis* Miers presentes a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

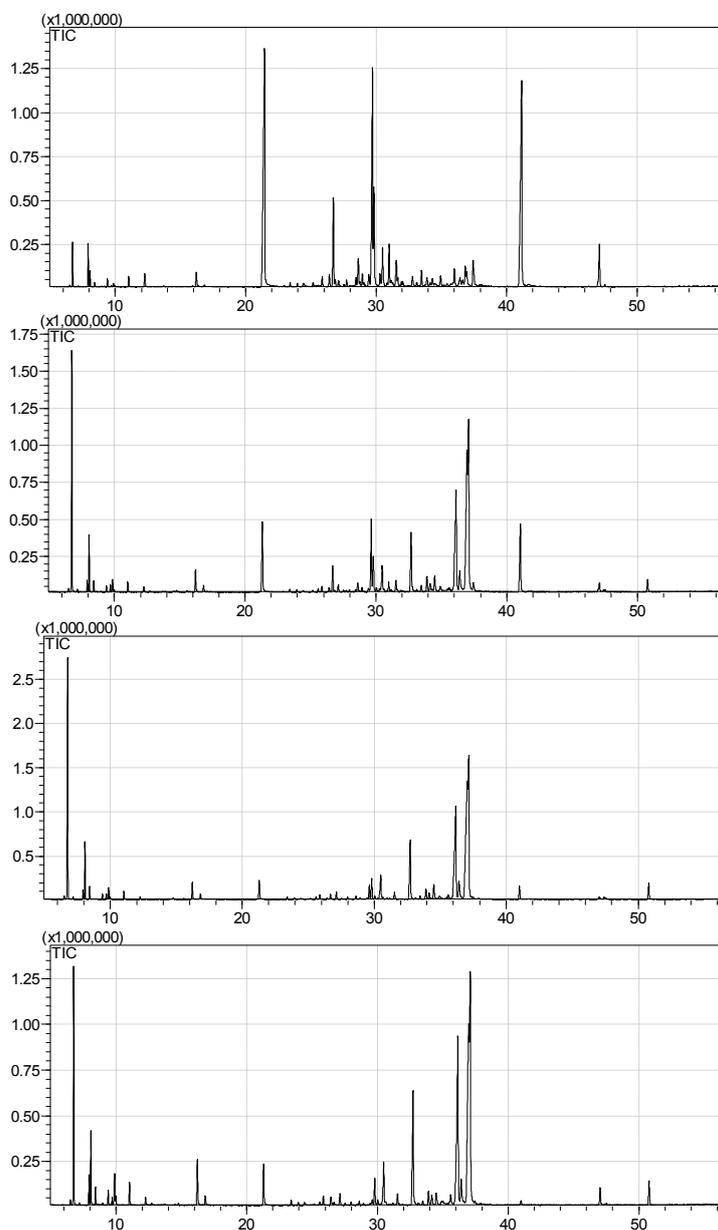


Figura 4B Cromatogramas dos óleos essenciais de folhas secas (FS) de quatro indivíduos de *Drimys brasiliensis* Miers presentes a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

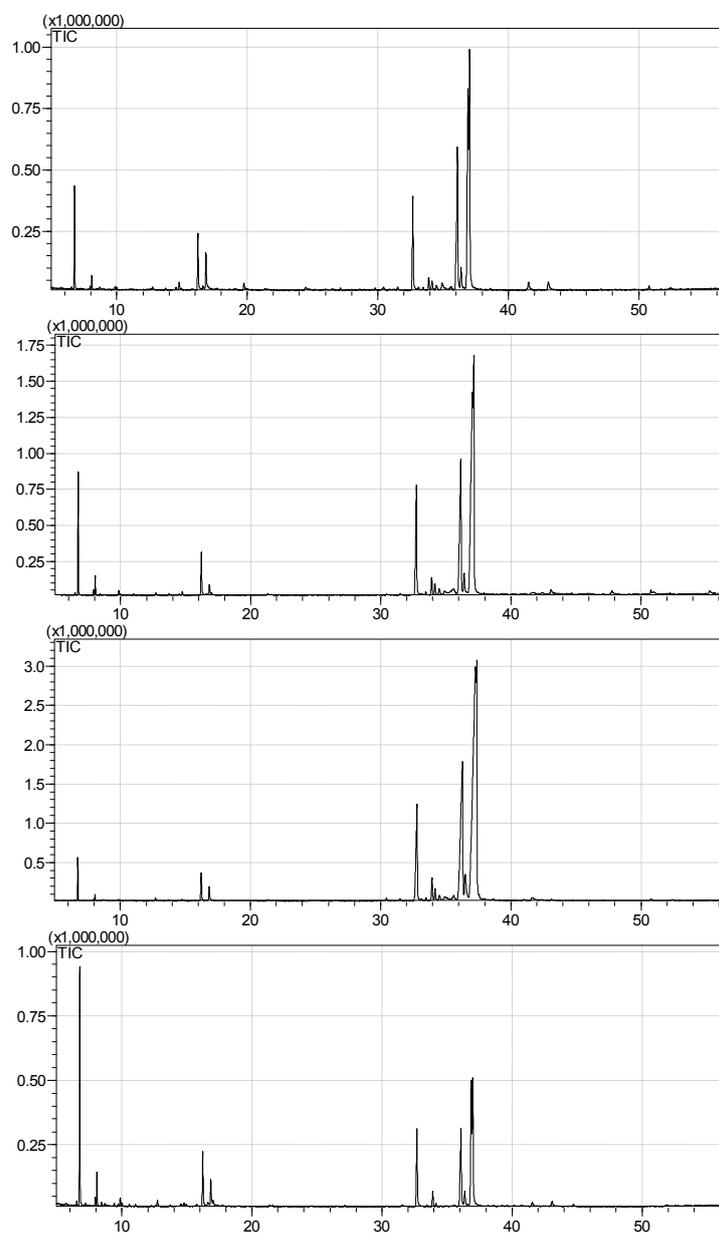


Figura 5B Cromatogramas dos óleos essenciais de caules frescos (G) de quatro indivíduos de *Drimys brasiliensis* Miers presentes a 1900 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.

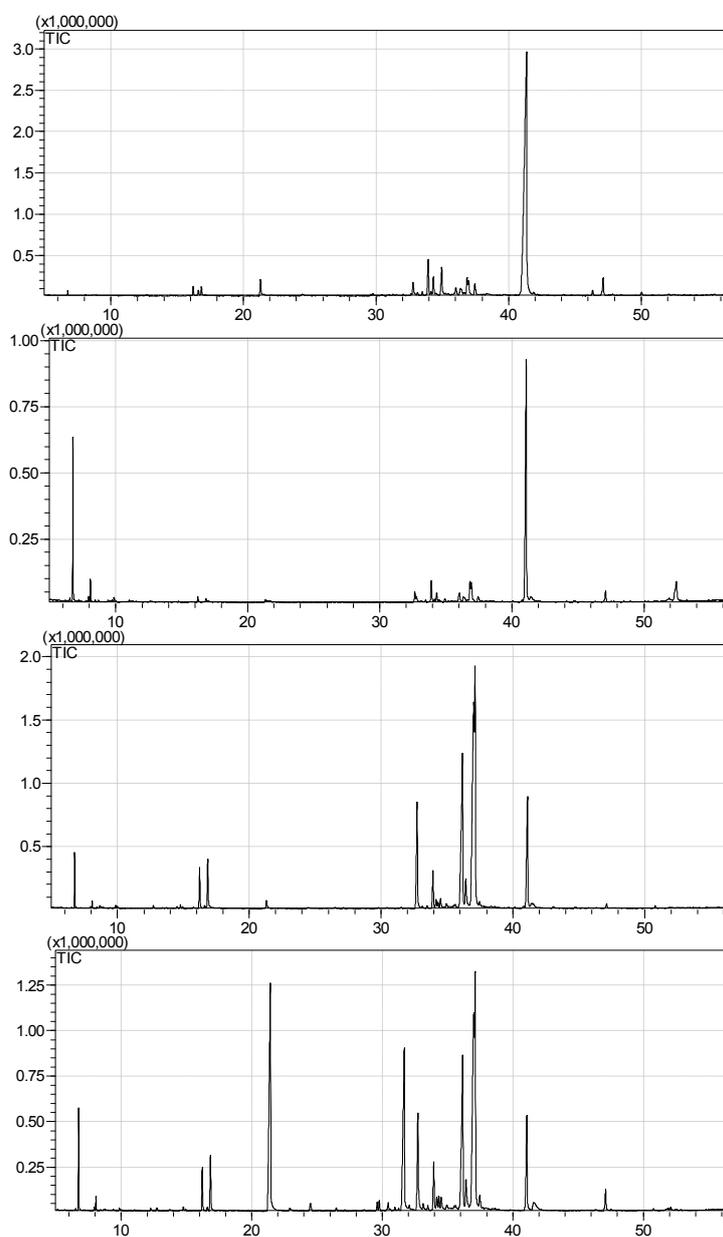


Figura 6B Cromatogramas dos óleos essenciais de caules frescos (G) de quatro indivíduos de *Drimys brasiliensis* Miers presentes a 2100 m de altitude em uma Floresta Ombrófila Densa Altomontana, em Itamonte, MG.