



**TEOR DE FENÓIS, FLAVONÓIDES E ÓLEOS
ESSENCIAIS EM CALOS, PLÂNTULAS E
PLANTAS EM CARQUEJA [*Baccharis trimera*
(Less) D.C. ASTERACEAE]**

FABIANO GUIMARÃES SILVA

2005

FABIANO GUIMARÃES SILVA

**TEOR DE FENÓIS, FLAVONÓIDES E ÓLEOS ESSENCIAIS EM
CALOS, PLÂNTULAS E PLANTAS EM CARQUEJA [*Baccharis trimera*
(LESS) D.C. ASTERACEAE]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

José Eduardo Brasil Pere

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Fabiano Guimarães

Teor de fenóis, flavonóides e óleos essenciais em calos, plântulas e plantas em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C. Asteraceae] / Fabiano Guimarães Silva. -- Lavras : UFLA, 2005.

133 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Baccharis trimera*. 2. Carqueja. 3. Calo. 4. Planta medicinal. 5. Fenóis. 6. Flavonóides. 7. Sesquiterpenos. 8. Óleos essenciais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 633.88355

FABIANO GUILMARÃES SILVA

**TEOR DE FENÓIS, FLAVONÓIDES E ÓLEOS ESSENCIAIS EM
CALOS, PLÂNTULAS E PLANTAS EM CARQUEJA [*Baccharis trimera*
(Less) D.C. ASTERACEAE]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 28 de fevereiro de 2005

Prof. Dr. Evaristo Mauro Castro - UFLA

Prof. Dr. João Almir de Oliveira - UFLA

Prof. Dra. Ana Helena Januário - UNAERP

Prof. PhD. Ricardo Motta Miranda - UFRRJ



Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Juliana, pela ajuda e companheirismo, os meus agradecimentos.

Ao prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, que cumpriu muito bem seu papel de orientador e, no decorrer do curso, sempre sugeriu vários tipos de trabalhos e aceitou sugestões, mas também soube ouvir e até mesmo criticar quando necessário. Acreditando que não existe sistema perfeito, chego ao final deste trabalho com uma imagem muito positiva de sua pessoa. Obrigado.

Ao prof. Pedro Henrique Ferri, do Instituto de Química da UFG, pela sua simplicidade, profissionalismo, amizade e pela enorme ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À profa. Ana Helena Januário, da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, pelo exemplo de dedicação, simplicidade e amizade, pela enorme ajuda neste trabalho e pela participação na banca.

Ao prof. Ricardo Motta Miranda, do Depto. de Fitotecnia/Inst. de Agronomia/UFRRJ, pela confiança, apoio e participação na banca.

A Vivian Elias Nascimento pela enorme ajuda, exemplo de pessoa, profissionalismo e amizade.

Aos professores Evaristo Mauro Castro (Depto. Biologia/UFLA), João Almir de Oliveira (Depto. Agricultura/UFLA) e Renato Mendes Guimarães (Depto. Agricultura/UFLA) pela participação na banca.

Aos professores do Depto. de Agricultura da UFLA, Samuel Pereira de Carvalho e Édila Vilela de Resende Von Pinho, pelos ensinamentos e pelo bom relacionamento durante o curso e no colegiado.

Aos servidores técnicos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais, Evaldo Arantes de Souza, e do Horto de Plantas Medicinais, Sr. Geraldo Luiz da Silva e Sr. Luiz Gonzaga do Carmo, pela grande colaboração e boa vontade na condução dos experimentos.

Aos meus pais, Sr. Aldeson e a Sra. Irma, pela minha vida, pela confiança e pelo incentivo a continuar os estudos.

A Flávia Dionísio Pereira pela amizade e ajuda.

À colega de turma Rita de Cássia Alves Pereira pela excelente capacidade de reverter os embaraços do dia-a-dia em uma grande piada.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da UFLA pela boa convivência.

A Priscila Pereira Botrel, pela ajuda na fase final deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos.

À UFLA e ao Departamento de Agricultura pela oportunidade concedida.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Emprego e importância do gênero <i>Baccharis</i>	5
2.2 Metabólitos especiais.....	7
2.2.1 Compostos fenólicos.....	8
2.2.2 Terpenos (Óleos essenciais).....	11
2.3 Justificativas e aspectos da utilização da cultura de tecidos como ferramenta para a produção de metabólitos essenciais	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO II - TEOR DE FLAVONÓIDES EM CALOS E PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> DE CARQUEJA [<i>Baccharis trimera</i> (LESS) D.C.].....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO III - TEOR DE FLAVONÓIDES EM POPULAÇÕES SILVESTRE E CULTIVADA DE CARQUEJA [<i>Baccharis trimera</i> (LESS) D.C.] COLETADAS NA ÉPOCA SECA E ÚMIDA	57

RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
1 INTRODUÇÃO	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1 Extração e quantificação dos flavonóides	65
2.2 Caracterização ambiental	67
2.3 Características meteorológicas	69
2.4 Análise estatística	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
CAPÍTULO IV - VARIAÇÃO SAZONAL NO TEOR DE FENÓIS TOTAIS EM CARQUEJA [<i>Baccharis trimera</i> (LESS) D.C.]	80
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
1 INTRODUÇÃO	83
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1 Condições gerais.....	87
2.2 Análise Fitoquímica.....	87
2.3 Análise estatística	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
CAPÍTULO V - VARIAÇÃO DIURNA E SAZONAL NO TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL EM POPULAÇÕES SILVESTRE E CULTIVADA DE CARQUEJA [<i>Baccharis trimera</i> (LESS) D.C.]	96

RESUMO.....	97
ABSTRACT.....	98
1 INTRODUÇÃO	99
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1 Condições gerais.....	106
2.2 Teor e composição do óleo essencial.....	106
2.3 Análise estatística.....	108
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.1 Teor de óleo essencial.....	109
4 CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

RESUMO GERAL

SILVA, Fabiano Guimarães. Teor de flavonóides em calos e plântulas *in vitro* e variação sazonal no teor de flavonóides, óleo essencial e fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.]. 2005. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.¹

Foram conduzidos 4 ensaios. O primeiro, a fim de avaliar o acúmulo de flavonóides em calos e comparar com o acúmulo em plântulas *in vitro* e plantas *in vivo* e avaliar o efeito da citocinina cinetina (CIN) no acúmulo de fitomassa dos calos e síntese de flavonóides. O segundo, com o objetivo de avaliar a influência da sazonalidade e a hipótese de que manejos culturais utilizados em plantios desta espécie poderão influenciar o teor de flavonóides. O terceiro, a fim de avaliar a influência das variações circadiana e sazonal no teor e composição química do óleo essencial de carqueja, em populações silvestre e cultivada. Por último, avaliar a influência da variação circadiana e sazonal em populações silvestre e nativa em carqueja quanto ao teor de fenóis totais. Nas condições de análises empregados no CLAE não se detectou a presença das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona. Em plântulas cultivadas *in vitro*, constatou-se acúmulo da flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona, porém em concentrações inferiores às encontradas em plantas *in vivo*. Já a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona não foi constatada em plântulas *in vitro*. O ácido clorogênico apresentou teores bastante reduzidos em plântulas *in vitro* e plantas *in vivo*, diferindo dos calos, que apresentaram teores mais elevados. Ausência de cinetina induziu calos com tendência de menor acúmulo de fitomassa (26,855 mg/frasco), comparado a 44,725 mg/frasco (1,0 μ M) e 46,500 mg/frasco (5,0 μ M) de CIN. O teor de ácido clorogênico não diferiu entre as concentrações de CIN avaliadas, porém apresentou tendência de maior elevação quando esta foi adicionada na concentração de 1,0 μ M (129,573 mg/g de calo seco), em comparação com sua ausência (92,361 mg/g de calo seco) e 5,0 μ M de CIN (93,070 mg/g de calo seco). Maior rendimento de ácido clorogênico foi alcançado na presença de 1,0 μ M de CIN (5,800 mg/frasco), comparado à sua ausência (2,480 mg/frasco). Em condições de campo, a flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona apresentou maior teor em plantas coletadas na estação úmida. Não houve diferenças entre plantas cultivadas e silvestres nas duas

¹ Comitê Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFPA (Orientador), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Januário - UNAERP.

estações. Já a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona apresentou maior teor em plantas silvestres comparada a plantas cultivadas na estação úmida. Quanto ao óleo essencial, maior teor coincidiu com a época de maior crescimento vegetativo, que ocorreu entre os meses de novembro e fevereiro. Durante o período reprodutivo e três meses após, as plantas apresentaram o menor teor de óleo. Quanto ao horário de colheita e populações, estes não influenciaram o teor de óleo essencial. Quanto à composição do óleo essencial da carqueja, foi constatado que o mesmo é constituído por sesquiterpenos. As porcentagens de sesquiterpenos hidrocarbonetos entre os diferentes horários de colheita não diferiram entre si. Verificaram-se também, independentemente do horário de colheita, em plantas cultivadas em diferentes épocas do ano, valores inferiores de sesquiterpenos hidrocarbonetos aos observados em plantas silvestres. Ao longo do ano, maiores teores de sesquiterpenos oxigenados foram constatados entre os meses de março e agosto, dependendo da população e horário de coleta. As diferenças entre populações foram mínimas e em pontos isolados na população silvestre. Algumas modificações nos componente individuais foram demonstradas entre os fatores avaliados. O horário de colheita e as populações não influenciaram o teor de fenóis totais. Maiores teores de fenóis totais foram encontrados entre os meses de maio e outubro para a população cultivada e de junho a setembro para a silvestre. Menores teores de fenóis totais ocorreram na época mais úmida, com maiores temperaturas e no período de intenso crescimento vegetativo.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Flavonoid content in callus and plantlets *in vitro* and seasonal variation in the flavonoids content, essential oil and total phenols in carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.]. 2005. 133 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

Four trials have been conducted. The first, in order to evaluate the accumulation of flavonoids in callus and to compare them with plantlets *in vitro* and *in vivo* plants and to evaluate the effect of kinetin (KIN) accumulation in the biomass callus and flavonoid synthesis. The second, with the objective to evaluate the influence of seasonality and the hypothesis that cultural managements used in plantings of this species will be able to influence flavonoids content. The third, in order to evaluate the influence of the circadian and seasonal variations in its content and chemical composition of the carqueja essential oil, in wild and cultivated populations. At last, to evaluate the influence of the circadian and seasonal variation in wild and cultivated populations in total phenols content of carqueja. In callus, synthesis of flavones 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavone and 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavone did not take place. Plantlets grown *in vitro* accumulated flavone 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavone, but in concentrations inferior to those found in *in vivo* plants. But the flavone 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavone was not found in *in vitro* plantlets. The chlorogenic acid presented quite reduced contents in *in vitro* plantlets and in *in vivo* plants, differing from the callus, which presented higher contents. Absence of kinetin induced callus with a trend to less biomass accumulation (26.86 mg/flask), compared to 44.73 mg/flask (1.0 μ M) and 46.50 mg/flask (5.0 μ M) of KIN. The content of chlorogenic acid did not differ among KIN concentrations, but it presented a trend to a higher elevation when this added to the concentration of 1.0 μ M (129.57 mg/g of dry callus), as compared with its absence (92.36 mg/g of dry callus) and 5.0 μ M of KIN (93.07 mg/g of dry callus). Increased yield of chlorogenic acid was attained in the presence of 1.0 μ M of KIN (5.80 mg/flask), compared with its absence (2.48 mg/flask). Under field conditions, flavone 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavone presented a higher content in plants collected in the rainy season. There were no difference between cultivated and wild plants in the two seasons. But flavone 5-hidroxi-

¹ Guidance Committee: Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Dr. Pedro Henrique Ferri – UFG, Dr^a. Ana Helena Jamário - UNAERP.

3',4',6,7-tetrametoxiflavone showed an increased content in wild plants compared with cultivated plants in the rainy season. As regards the essential oil, increased content coincided with the time of the greatest vegetative growth, which occurred between the month of November and February. During the reproductive period and three months later, the plants showed the lowest oil content. Concerning the harvest season schedule and populations, these did not influence the content of essential oil. As for the composition of the carqueja essential oil, it was found that the same is made up of sesquiterpenes. The percentages of hydrocarbons sesquiterpene among the different harvest schedule did not differ from one another. Inferior values of oxygenated sesquiterpenes to those found in wild plants were also verified, regardless of harvest schedule, in cultivated plants in different schedule of the year. Along the year, increased values of oxygenated sesquiterpenes contents were found among the months of March and August, depending upon the population and harvest schedule. The differences among populations were minimal and on isolated spots in the wild population. Some modifications in the individual components were shown among the evaluated factors. Harvest schedule and populations did not influence the content of total phenols. Higher contents of total phenols were found among the months between of May and October for the cultivated population and from June to September for the wild ones. Decreased contents of total phenols took place in the season, with higher temperatures and in the intense vegetative period of growth.

[Illegible text]

CAPÍTULO I

[Illegible text]

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos tem crescido muito o interesse por substâncias químicas extraídas de plantas ou microorganismos para a utilização na fabricação de medicamentos para o homem, além fabricação de inseticidas e fungicidas, entre outros. Com isto, o emprego de vegetais com a finalidade de curar algum tipo de doença tem passado do importante conhecimento empírico acumulado ao longo das gerações, como os retidos em populações indígenas, para os centros de pesquisa, principalmente de países do primeiro mundo. Este tem sido o caminho mais curto para o desenvolvimento industrial de um fitoterápico. A observação, por parte de pesquisadores, dos costumes dos indígenas seria uma prática muito interessante se houvesse uma legislação justa neste sentido, através da qual parte dos lucros obtidos pela comercialização deste fitoterápico retornaria ao local de origem, o que não acontece. Na prática e na legislação, o que tem ocorrido é que quando se desenvolve um fitoterápico nas condições citadas acima em outro país, toda a população do país de origem, inclusive a população que forneceu o conhecimento, tem que pagar "royalty", o que constitui, no mínimo, uma prática imoral.

Visualizando este enorme potencial curativo encontrado nos vegetais, países como Alemanha, Estados Unidos e Japão, entre outros, têm investido pesado neste tipo de pesquisa, fazendo com que países que não têm esta política corram o risco de ficar apenas como fornecedores da matéria-prima e na total dependência de importação destas drogas industrializadas.

Após a comprovação da eficácia e o conhecimento do princípio ativo, este poderá ser extraído do vegetal e utilizado, ou poderão ser utilizadas outras substâncias análogas, que algumas vezes podem até proporcionar melhores resultados, as quais poderão ser sintetizados parcialmente ou totalmente em

laboratório. Neste caso, o composto natural servirá apenas de um molde para a cópia em laboratório. Segundo os próprios químicos, devido principalmente à complexidade destas estruturas, a síntese química durante um bom tempo não será uma forma viável. Além do mais, tem-se uma preferência por princípios ativos naturais.

A carqueja é uma das inúmeras espécies com potencial para utilização na fabricação de fitoterápicos. Seu centro de dispersão é o centro sul do Brasil e de todos países que estão mais a sul do Brasil. Por toda esta região, a carqueja é utilizada para o tratamento de algum tipo de doença na medicina caseira. Sintetiza importantes classes de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides.

A produção de metabólitos secundários é sensível a vários fatores ambientais, como temperatura, umidade, fotoperíodo, fertilidade do solo, competição com outras espécies vegetais, com animais e com microorganismos. Isto pode causar dificuldades, como uma determinada espécie em uma determinada época do ano ou estágio de desenvolvimento ser tóxica ou ineficaz. Neste sentido, é de fundamental importância estudar o comportamento da espécie em interesse com a finalidade de conhecer e determinar estas modificações, determinando, assim, quando deve ser cultivada, quais manejos deverão ser empregados e qual a melhor época de colheita, entre outros. Este tipo de estudo deverá ser feito para cada metabólito de interesse, em que deverão ser avaliados, além de seu teor, toda a sua composição química.

De acordo com o exposto acima, este trabalho procurou estudar duas classes de metabólitos produzidos pela carqueja: os fenóis e terpenos, relacionando teor e composição química com o ambiente e o estágio fisiológico da planta. Avaliou-se também a possibilidade de síntese de flavonóides em plântulas e calos *in vitro*.

Os objetivos deste trabalho foram examinar o acúmulo de flavonóides em calos e comparar com o acúmulo em plântulas *in vitro* e plantas *in vivo*, e avaliar o efeito da citocinina cinetina (CIN) no acúmulo de fitomassa dos calos e síntese de flavonóides; avaliar a influência da época seca e úmida no teor de flavonóides e verificar a hipótese de que manejos culturais utilizados em plantios desta espécie poderão influenciar no teor destes flavonóides; avaliar a influência da variação circadiana e sazonal no teor e composição química do óleo essencial e quantificar o teor de fenóis totais em populações silvestre e cultivada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Emprego e importância do gênero *Baccharis*

Baccharis (Compositae – Asteraceae) compreende um largo gênero de plantas amplamente distribuído do México até a Argentina, usadas tradicionalmente como uma fonte terapêutica para o tratamento de diversos distúrbios relacionados à saúde do homem (Jakupovic et al., 1990; Loayza et al., 1995; Suttisri et al., 1993).

Vários estudos apontam que o gênero *Baccharis* é potencialmente indicado como fornecedor de óleo essencial na indústria. Apresenta diversas utilidades, dependendo da espécie, sendo usado em perfumaria, como terapêutico sem efeitos tóxicos e droga anti-reumática, entre outros (Jakupovic, 1990; Loayza et al., 1995; Queiroga et al., 1996; Silva & Grotta, 1971; Suttisri et al., 1994).

Pesquisas realizadas por Armien et al. (1993) demonstram que partes aéreas frescas de *Baccharis megapotamica* var. *megapotamica* e var. *weirii*, Spreng quando administradas a ovinos, causaram intoxicação, sendo esta última variedade 5 vezes mais tóxica. No entanto, Costa (1995), estudando o efeito de *B. coridifolia* D.C., conhecida como “mio-mio”, observou que quando administrada a equinos na época da floração e frutificação, dependendo da dose, pode causar intoxicação. Esta é considerada uma das plantas tóxicas mais importante na região sul do Brasil, onde causa mortes de bovinos e ovinos e, em menor escala, de equinos e suínos.

Foram verificadas possíveis variações na toxidez de *B. coridifolia* D.C., de acordo com a procedência e o sexo, às diversas partes da planta e de um ano para outro. Rodrigues et al. (1995) administraram diferentes doses deste vegetal

para coelhos, verificando que *B. coridifolia* D.C., mostrou-se mais tóxica quando coletada mais para o sul do Brasil.

Posteriormente, trabalhos de Varaschin et al. (1998) utilizando *B. coridifolia* D.C. verificaram que os níveis de tricotecnos macrocíclicos e seus glicosídeos foram muito maiores nas plantas femininas em floração do que os níveis observados nas plantas que não estavam em floração e nas plantas masculinas em floração. Concluiu-se que os tricotecnos macrocíclicos presentes na planta são responsáveis pelas lesões observadas na toxicose.

A *B. trimera* é largamente utilizada na medicina popular na forma de infusão devido às suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e digestivas. Desta maneira, Pedrazzi et al. (1996) avaliaram possíveis efeitos colaterais tóxicos de carqueja após administração oral em ratos, o que não foi comprovado.

Estudos de Avancini & Mundstock (2000) confirmaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do decocto de *B. trimera*, sugerindo a possibilidade de sua utilização como desinfetante e anti-séptico biológico por produto natural em determinadas situações problema, em ambientes de produção animal.

Assim como outras plantas, os princípios ativos resultantes do metabolismo de *B. trimera* podem atuar em diversas funções metabólicas, tanto na própria planta como para o homem, podendo ser usados direta ou indiretamente como anti-inflamatórios, no tratamento de distúrbios estomacais e desordens renais, entre outros (Suttisri et al., 1994).

Segundo Gene et al. (1996), *B. trimera* (Less) D.C. é utilizada no tratamento de reumatismo, desordens hepatobiliares, diabetes, pele, ulceração e ferimentos. O efeito anti-inflamatório, analgésico e o tratamento de úlceras foram avaliados com extratos das partes aéreas de *B. trimera* D.C. Para tal, os autores utilizaram ratos e tais propriedades foram confirmadas.

2.2 Metabólitos especiais

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais. Estes metabólitos também diferem dos primários (aminoácidos, nucleotídios, açúcares, entre outros) por apresentarem ação restrita no reino vegetal, enquanto os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal (Taiz & Zeiger, 2004).

Os metabólitos secundários defendem os vegetais contra herbívoros e patógenos. Durante muitos anos, a importância adaptativa da maioria dos metabólitos secundários vegetais era desconhecida. Consideravam-se tais compostos como produtos finais do metabolismo sem função aparente ou mesmo resíduo. Mais recentemente, sugeriu-se que muitos produtos do metabolismo secundário têm funções ecológicas importantes nos vegetais, como proteção contra herbivoria e contra infecção causada por microorganismos patogênicos; atrativo para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agente na competição planta-planta (Agerbirk et al., 2003; Bloszyk et al., 1995; Guillet et al., 1997; Santos, 1999; Taiz & Zeiger, 2004).

A importância destes metabólitos secundários para a sobrevivência dos vegetais se inicia na sua superfície. Sobre a cutícula estão depositadas grandes quantidades de metabólitos secundários, representantes de diferentes classes, que recebem o nome de cera epicuticular, a qual representa uma enorme importância para a minimização dos diferentes tipos de estresse aos vegetais (Alcerito et al., 2002; Amaral et al., 1985; Faini et al., 1999; Shepherd et al., 1995).

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Taiz & Zeiger, 2004). No presente trabalho trataremos dos dois

primeiros grupos, ficando de fora os compostos nitrogenados, os quais incluem os alcalóides.

2.2.1 Compostos fenólicos

Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. Devido a sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções vegetais. Muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos. Outros têm função de suporte mecânico, como atrativos de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (Cahill & McComb, 1992; Salminen et al., 2001; Scogings et al., 2004; Southerton & Deverall, 1990; Taiz & Zeiger, 2004).

Os compostos fenólicos são sintetizados por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido acético, sendo a primeira mais importante nos vegetais. A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina. Esta reação é catalisada pela fenilalanina amonialiase (PAL), etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por fungos (Almeida et al., 1986; Taiz & Zeiger, 2004).

Estes compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas

tão variadas quanto a dos ácidos fenólicos e dos derivados da cumarina, entre outros. Além disso, essa classe de compostos abrange as ligninas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais (Carvalho et al., 2004). Dentre as classes de metabólitos secundários, as substâncias fenólicas são as mais difundidas e significativas no sistema solo-planta (Siqueira et al., 1991).

Os fenóis podem ser classificados, de acordo com o esqueleto básico, em fenóis simples, benzoquinonas; ácidos fenólicos; acetofenonas e ácidos fenilacéticos; fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas; naftoquinonas, xantonas; estilbenos, antraquinonas; flavonóides e isoflavonóides; lignanas; diflavonóides; melaninas vegetais; ligninas; taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Carvalho et al., 2004).

Muitos compostos fenólicos simples apresentam funções importantes nos vegetais, agindo como composto de defesa contra insetos herbívoros e fungos (Almeida et al., 1986; Taiz & Zeiger, 2004).

Outro exemplo de substâncias fenólica é a lignina. Esta apresenta funções primárias e secundárias. É encontrada nas paredes celulares de vários tipos de tecidos de sustentação e vascular. A rigidez mecânica da lignina fortalece os caules e o tecido vascular, permitindo o crescimento ascendente e possibilitando que a água e os sais minerais sejam conduzidos através do xilema sob pressão negativa, sem haver o colapso do tecido. Uma vez que a lignina é um componente chave do tecido de transporte de água, a capacidade de produzir lignina deve ter sido uma das adaptações mais importantes, que permitiu que as plantas colonizassem o ambiente terrestre (Carvalho et al., 2004; Croteau et al., 2000; Robbers et al., 1997; Scogings et al., 2004; Taiz & Zeiger, 2004).

Além de proporcionar suporte mecânico, a lignina desempenha funções protetoras importante nos vegetais. Sua resistência física coíbe seu consumo

pelos herbívoros e a sua estabilidade química a torna relativamente indigerível por estes animais (Scogings et al., 2004; Taiz & Zeiger, 2004). Os taninos vegetais são um grupo distinto de compostos fenólicos que tem analogia sobretudo pela capacidade de formar complexos com proteínas (Robbers et al., 1997).

Dentro deste grupo de substâncias secundários estão os flavonóides, que formam a maior classe de fenólicos vegetais. Os diferentes tipos de flavonóides desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação e defesa. Como exemplo, as antocianinas são flavonóides coloridos que atraem os animais com o objetivo, por exemplo, de polinização. Além destas funções, os flavonóides podem proteger contra os danos causados pela luz ultravioleta. Neste caso destacam-se as flavonas e os flavonóis. Esses tipos de flavonóides absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que as antocianinas, não sendo visíveis ao olho humano. Entretanto, insetos como as abelhas, que enxergam na faixa extrema do ultravioleta, respondem as flavonas e aos flavonóis como sinais atrativos. Nas folhas, estas duas classes de flavonóides agem como proteção das células contra o excesso de radiação UV-B (280-320 nm), pois se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e absorvem intensamente a luz na região do UV-B, enquanto permitem a passagem contínua de luz visível (fotossinteticamente ativo). Além disso, foi demonstrado que o aumento da exposição de plantas à luz UV-B resulta na maior síntese de flavonas e flavonóis (Awad et al., 2001; Sharma et al., 1998; Taiz & Zeiger, 2004; Zuanazzi, 1999).

Outras funções das flavonas e flavonóis incluem, por exemplo, a mediação entre leguminosas e microorganismos simbiotes fixadores de nitrogênio e fungos do solo (Siqueira et al., 1991; Taiz & Zeiger, 2004).

2.2.2 Terpenos (Óleos essenciais)

Os terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo de produtos secundários. Entre tais substâncias destacam-se as voláteis, que difundidas com facilidade a partir da evaporação, constituem um verdadeiro elo de ligação entre a fonte produtora e o meio ambiente. Consideradas por muito tempo mero desvio das funções vitais da planta, elas são fundamentais para a inter-relação dos organismos, contribuindo, assim, de maneira decisiva para a interação co-evolucionária e para o equilíbrio entre os reinos vegetal e animal (Craveiro & Machado, 1986; Taiz & Zeiger, 2004).

De uma forma geral, são misturas complexas de misturas voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas e pastosas. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem normalmente líquidas, de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo. Entretanto, a sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo, por isso, também chamados de essências. Eles são também solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos (Simões & Spitzer, 1999).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (Simões & Spitzer, 1999).

Os óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema; exercem papel fundamental na defesa contra microorganismos e predadores e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores (Gottlieb & Salatino, 1987; Lis-Balchin et al., 1995; Siani et al., 2000).

As substâncias aleloquímicas podem atuar como alomônios ou como cairomônios, de acordo com os organismos em interação. O sesquiterpeno gossipol, um metabólito do algodão, é um alomônio que limita a atividade herbívora de várias espécies de lepdópteros; ao mesmo tempo, age como estimulante de apetite no caso do gorgulho (inseto que afeta esta mesma planta), sendo, neste caso, um cairomônio. Há muitos exemplos em que o inseto seleciona a planta hospedeira atraído pelos produtos do metabolismo secundário, que também servem como alomônios. Em outros, a presença de compostos que agem como repelentes faz com que o inseto evite entrar em contato com substâncias tóxicas presentes na planta (Craveiro e Machado, 1986).

As substâncias voláteis não se formam por um único caminho, mas contêm substâncias dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como ácidos graxos (gordura) e seus ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos e cumarinas. Os fenilpropanóides e, especialmente, os terpenóides são os principais constituintes dos óleos essenciais. Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que estes últimos preponderam. Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo este termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (Simões & Spitzer, 1999). Os compostos terpenóides, assim como os demais metabólitos secundários, são

originados de rotas alternativas do metabolismo primário, em resposta à adaptação do organismo ao meio em que vive.

Biossinteticamente, são derivados do acetato via ácido mevalônico, que ao sofrer fosforilação e descarboxilação, gera o isopentenilpirofosfato (isopentenil-PP), que se isomeriza a dimetilalilpirofosfato. A condensação destes dois isômeros, seguida de posteriores incorporações de unidades de isopentenil-PP, leva à formação de todos os compostos terpenóides (Simões & Spitzer, 1999).

A classe mais numerosa e expressiva de compostos voláteis com atividade biológica pertence ao grupo dos isoprenóides (terpenóides), formando a maior subclasse de produtos naturais. São atribuídas aos isoprenóides voláteis as mais diversas atividades. O canfeno, por exemplo, um importante monoterpene, é utilizado como matéria-prima para síntese de inseticidas clorados. Quanto aos monoterpenos oxigenados (álcool e ésteres), já se conhecem bem suas propriedades aromáticas e medicinais; e do 1,8-cineole, que apresenta ação como repelente de insetos, notadamente da barata doméstica. O álcool monoterpênico linalol é muito conhecido e apreciado por causa do aroma da rosa e também é utilizado como fonte alomônio que repele um tipo de pulgão (Craveiro & Machado, 1986).

A classe dos sesquiterpenos compreende substâncias que atuam cada vez mais na comunicação de insetos e plantas. Entre elas podemos citar o par de isômeros zingibeno e sesquifelandreno, constituintes do óleo do gengibre, devido às suas propriedades organolépticas, de grande significado para a perfumaria. Com relação às lactonas sesquiterpênicas, são substâncias de extrema sensibilidade ao olfato em pequenas variações estruturais (Craveiro & Machado, 1986).

Alguns terpenos têm função bem caracterizada no crescimento e no desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados como metabólitos primários em vez de secundários. Por exemplo, as giberelinas, um importante grupo de hormônios vegetais, são diterpenos. Os carotenóides de cores vermelha, amarela e laranja são tetraterpenos que agem como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos contra fotooxidação. O ácido abscísico é um terpeno produzido pela degradação de um precursor de carotenóide. Entretanto, a grande maioria das diferentes estruturas terpênicas produzidas pelos vegetais é produto do metabolismo secundário, provavelmente relacionada com a defesa vegetal (Taiz & Zeiger, 2004).

Os óleos voláteis são raramente encontrados em gimnospermas (exceção de coníferas). Em angiospermas monocotiledôneas, a ocorrência é relativamente rara, com exceção da família Poaceae. No entanto, plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras (Simões & Spitzer, 1999).

Dependendo da família, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como os pêlos glandulares (Lamiaceae), as células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae e Poaceae) e os canais oleíferos (Apiaceae), ou em bolsas lisígenas ou esquisolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos voláteis podem estar estocados em certos órgãos, tais como nas flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto e louro), cascas dos caules (canela), madeira (sândalo e pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (curcuma e gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho e erva-doce) ou sementes (nós-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização (Simões & Spitzer, 1999).

A *B. trimera* (Less) D.C apresenta como constituintes químicos principais, no seu óleo essencial: nonipeno, carquejol, acetato de carquejilo e sesquiterpenos (Martins et al., 1995; Santos et al., 1988).

Pesquisas de Loayza et al. (1995), utilizando três espécies de gênero *Baccharis*, *B. salicifolia* Pers., *B. latifolia* (R. & P.) Pers. e *B. dracunculifolia* D.C, identificaram quatro diferentes grupos de produtos: monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e vários sesquiterpenos oxigenados, tais como germacrone e ledol.

Silva e Grotta (1971), estudando *B. retusa* D.C., revelaram que esta espécie apresenta estômatos do tipo anomocítico e seu óleo essencial foi encontrado nos canais secretores próximos das nervuras principal e secundária, a um teor de 0,3%.

Zunino (1998), estudando a composição dos óleos essenciais das espécies *B. articulata* (Lam.) Pers., *B. myrtilloides* Griseb. e *B. rufenses* Spreng., verificaram que a fração de monoterpenos presentes no óleo essencial destas foi relativamente pobre. Entre monoterpenos hidrocarbonados, *B. rufenses* Spreng. foi caracterizada pelo conteúdo mais alto de limoneno (14,4%), enquanto em *B. articulata* e *B. myrtilloides* os valores foram menores que 0,8% de limoneno. O teor de monoterpenos oxigenados também apresentou diferenças entre as espécies, sendo 0,7% para *B. articulata* (Lam.) Pers. e 1,8% para *B. rufenses* Spreng., enquanto, para *B. myrtilloides* Griseb., apresentou o mais alto valor (12,4%), identificando-se terpinen-4-ol (8,2%) como constituinte majoritário. Sesquiterpenos oxigenados variaram de 27,1% em *B. myrtilloides* Griseb. para 47,0% em *B. articulata* (Lam.) Pers. Entre os constituintes oxigenados o teor de *trans*-nerolidol encontrado nas amostras *B. articulata* (Lam.) Pers. foi de 15,6%, porém baixo em *B. myrtilloides* Griseb., 8,8%. O teor de sesquiterpenos hidrocarbonados variou entre 38,7% (*B. rufenses*) e 50,4% (*B. myrtilloides*). No

entanto, *B. articulata* apresentou o mais alto valor de β -cariofileno (16,8%), enquanto em *B. myrtilloides* Griseb. e *B. rufenses* estes valores foram 4,7% e 4,5%, respectivamente.

Partes aéreas de *B. articulata* e *B. trimera* apresentaram teores variados entre 0,3 e 1%. Neste mesmo estudo, foi verificada, por cromatografia delgada, a presença, tanto no óleo essencial de *B. articulata* como de *B. trimera*, o carquejol e o acetato de carquejila como substâncias majoritárias. A análise cromatográfica em fase gasosa de amostras de óleo essencial de *B. articulata* e *B. trimera* evidenciou a sua composição, tendo sido possível determinar a presença de α -pineno, β -pineno, canfeno, carquejol e acetato de carquejila, entre outras estruturas não identificadas. Os dados levantados pela análise cromatográfica em fase gasosa apresentaram alto teor de acetato de carquejila nos óleos essenciais, *B. articulata* (67%) e *B. trimera* (45%), podendo estas espécies serem aproveitadas na indústria de óleos essenciais, tendo em vista a alta porcentagem de acetato de carquejila encontrada. Foi verificada maior porcentagem de carquejol no óleo essencial de *B. articulata* (18,5%) do que em *B. trimera* (9%) (Siqueira et al., 1985).

O óleo essencial de algumas espécies de *Baccharis* é obtido em escala industrial no sul do Brasil. O valor comercial desses óleos varia em função dos teores de nerolidol e acetato de carquejila. Seus constituintes principais são o carquejol (9%) e o acetato de carquejila (45%). O carquejol é a substância mais estudada do ponto de vista farmacológico (Souza et al., 1991).

Além destas duas classes de metabólitos secundários, a terceira classe recebe o nome de compostos nitrogenados, os quais incluem os alcalóides. Esta classe não foi estudada no presente trabalho.

2.3 Justificativas e aspectos da utilização da cultura de tecidos como ferramenta para a produção de metabólitos essenciais

Como já mencionado, muitos fármacos são produzidos de metabólitos secundários de plantas, como digitalis, L-DOPA, morfina, codeína, reserpina e as drogas anti-câncer vincristina, vinblastina e taxol. Este último é utilizado em tratamentos de câncer de ovário e de mama. Portanto, plantas apresentam uma ilimitada fonte de produtos naturais (Stockigt et al., 1995).

Muito recentemente, fitoquímicos têm apresentado notáveis bioatividades como anti-câncer e inibição contra células infectadas por HIV, funções antimicrobianas, antibiótico, inseticida, moluscida e propriedades hormonais altamente importantes do ponto de vista farmacológico e farmacêutico. Atualmente estes e muitos outros produtos naturais são produzidos somente de massivas quantidades de partes de planta inteira (Stockigt et al., 1995).

Além das dificuldades já citadas anteriormente para a produção de fármacos utilizando plantas inteiras, a extração de metabólitos de plantas medicinais cultivadas ou selvagens continua devido à falta de alternativas confiáveis. Estas dificuldades têm estimulado a intensificação dos esforços para encontrar fontes alternativas para produção de várias drogas em laboratórios de todo o mundo. A síntese química economicamente viável de metabólitos com estrutura complexa provavelmente não será viável em um futuro próximo. A necessidade por um suprimento seguro tem também estimulado outras estratégias de pesquisa (Dicosmo & Misawa, 1995).

O cultivo de calos e células vegetais produz, em estágio não organizado, diferenciados metabólitos secundários, porém em quantidades muito diferentes à medida que novos compostos são sintetizados. Mais de 140 novos compostos naturais são atualmente conhecidos exclusivamente em cultura de células

vegetais e não nas plantas que forneceram as células, os quais também incluem novos metabólitos formados pela biotransformação (Stockigt et al., 1995).

Há mais de 90 anos atrás, células vegetais foram separadas pela primeira vez de tecidos de plantas diferenciadas e mantidas vivas sob condições artificiais. Todavia, foram necessárias décadas para encontrar apropriados meios nutritivos para o cultivo destes sistemas de células. A detecção e aplicação de fitorreguladores, auxinas e citocininas foi um pré-requisito para um eficiente crescimento e divisão celular. Enquanto isso, metodologias de cultivo de células vegetais foram sendo aperfeiçoadas, enquanto o estabelecimento de tais culturas tornou-se possível para qualquer espécie de planta (Stockigt et al., 1995; Torres et al., 1998).

Sistemas de cultura de calos e células vegetais representam uma fonte potencial renovável de valiosos medicinais, flavorizantes, essências e corantes que não podem ser produzidos por células microbianas ou síntese química. Porém, atualmente poucas culturas produzem estes compostos em quantidades úteis comercialmente (Dornenburg & Knorr, 1995).

O crescimento contínuo de culturas de tecidos organizados resulta em um sistema biológico bastante eficiente para a produção de metabólitos secundários, que são sintetizados nos diversos órgãos da planta intacta. Entretanto, as chances de as culturas de órgãos serem usadas industrialmente são reduzidas, devido ao crescimento lento e à relativa dificuldade de manipulação. Por outro lado, o metabolismo secundário ocorre em células e tecidos específicos e em determinados estádios de desenvolvimento das plantas superiores, mostrando que a expressão destes metabólitos está intimamente correlacionada com o crescimento e a diferenciação celular (Dornenburg & Knorr, 1995).

Níveis de produção comercial foram atingidos em biorreatores vegetais com pouquíssimos compostos secundários. Uma possível razão é de que a maior parte destes sistemas de culturas de tecidos não possuem organização celular significativa ou diferenciação de tecido para a produção nem do composto desejado nem de seus precursores (Dornenburg & Knorr, 1995).

Freqüentemente aceita-se que culturas não diferenciadas não contêm estruturas como tricomas ou canal oleífero para armazenar estes constituintes, levando à ausência de acúmulos destes metabólitos. Essas características podem ser necessárias para a compartimentalização de etapas na rota biossintética utilizada para a síntese completa do composto desejado. Também o composto desejado pode ser tóxico à célula; neste caso o crescimento celular e a síntese de produtos estariam negativamente correlacionados. Por estas e outras razões, culturas de células vegetais freqüentemente produzem metabólitos secundários em apenas uma fração da quantidade produzida *in vivo* (Ellis et al., 1996), como ocorre, por exemplo, na produção de artemisina (lactona sesquiterpenica). Este metabólito foi produzido apenas em cultura de brotos diferenciados, mas não em cultura de calos ou suspensão celular. Uma explicação para isto é que este metabólito é compartimentalizado e seqüestrado em tricomas glandulares presentes nas folhas e flores, que foram também verificados em folhas de plantas cultivadas *in vitro*.

A fitotoxidez da artemisina para a própria *Artemisia annua* pode ser explicada porque apenas quantidades traço ou nenhuma artemisina foi encontrada em tecidos não glandulares (Ferreira & Janick, 1996). Apesar destas limitações, algumas culturas de células podem ser manipuladas para maior produção de metabólitos pelo uso de elicitores, modificações do meio e biotransformação com o uso de precursores metabólitos (Ellis et al., 1996).

Um grande número de trabalhos tem buscado melhorar a produção e acúmulo pela adição de precursores, porém são ainda bem menos que aqueles realizados com plantas intactas (Zu et al., 2000). A baixa produtividade é também associada ao pobre entendimento da bioquímica destes sistemas. Recentes avanços na biologia molecular, enzimologia, fisiologia e tecnologia de fermentação de cultura de células vegetais sugerem que estes sistemas podem se tornar uma fonte viável de importantes produtos naturais (Chen et al., 1997; Dicosmo & Misawa, 1995).

Outra vantagem da utilização de técnicas da cultura de tecidos na produção de metabólitos secundários é a facilidade de extração e isolamento comparado a plantas inteiras, pois cultura de calos ou células permite a obtenção de material uniforme, com menor teor de clorofila e lignificação (Barrueto Cid, 1998).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, as mais promissoras são as culturas de raízes transformadas, calos e suspensão celular. A cultura de calos apresenta como vantagem, comparada à cultura de células, o fato de apresentar menor grau de dediferenciação, ou seja, apresenta certo grau de diferenciação. A suspensão celular apresenta como vantagens a maior taxa metabólica e a maior facilidade de manipulação em sistemas de biorreatores, juntamente com outros fatores, o que faz desta técnica a mais promissora para a produção de metabólitos secundários utilizando métodos biotecnológicos. Antes do início do estudo de produção de metabólitos secundários *in vitro*, é interessante conhecer e dominar a produção de calos e avaliar a sua síntese dos metabólitos.

Calo é um agregado de massa celular, com crescimento desordenado e certo grau de diferenciação (Torres et al., 2000) em resposta a uma injúria química, como concentração de sais e fitorreguladores, ou injúria física, como ferimentos nos tecidos. Calos podem ser iniciados *in vitro* através de pequenos

pedaços de plantas sob um meio de crescimento e condições estéreis. Sob o estímulo de substâncias endógenas de crescimento ou fitorreguladores de crescimento adicionados ao meio, o metabolismo das células, que estavam em um estado inativo, é revertido, e eles iniciam divisão ativa. Durante este processo, diferenciação e especialização celular que ocorrem em planta intacta são revertidos, e o explante dará origem a um novo tecido, que é composto de células do tipo meristemáticas e não especializadas ou com certo grau de diferenciação. Embora calos permaneçam desorganizados, podem ser formados alguns tipos de células especializadas novamente (George, 1996).

Um considerável esforço tem sido feito com o intuito de produzir produtos fitoterápicos a partir de plantas com substâncias ativas que tenham sido acumuladas em cultura de células ou tecidos da planta. No entanto, são raros os processos economicamente viáveis devido à necessidade de otimização dos compostos ativos que dependem, em última instância, do entendimento dos mecanismos genéticos, fisiológicos e morfológicos de controle da biogênese e acúmulos dos compostos bioativos (França, 1999). Além de melhoramento de linhagem, métodos de seleção de linhagens de alta produção e otimização do meio podem levar a um incremento na produção de princípios ativos. Porém, o principal problema encontrado na produção de princípios ativos usando técnicas biotecnológicas é a falta de conhecimento básico das rotas biossintéticas e dos mecanismos responsáveis pela produção dos princípios ativos, ficando a produtividade dos princípios ativos limitada pela falta de precursores específicos (Dornenburg & Knorr, 1995).

Considerando a variabilidade de biossíntese e o acúmulo de determinados princípios ativos quando a planta interage com o meio, somados à utilização da flora medicinal pela indústria farmacêutica, tornam-se fundamentais o estudo e o estabelecimento de protocolos de cultivos que

permitam uma maximização de produção de metabólitos secundários, bem como o aumento da utilização das plantas medicinais.

A transformação genética de células de plantas usando como vetor *Agrobacterium rhizogenes* resulta na indução de raízes que possuem inúmeras ramificações laterais (meristemas apicais radiculares múltiplos) e crescem muito rapidamente, as chamadas “hairy roots”. Devido à transferência de Ti-DNA da bactéria para a planta, as “raízes cabeludas” são autotróficas em relação à produção de auxinas, ou seja, elas se desenvolvem sem a necessidade de suplementação exógena de auxinas (França, 1999). Portanto, esta técnica é muito interessante por causa de sua produção contínua de metabólitos secundários iniciada pela indução do órgão (Dornenburg & Knorr, 1995). Outra vantagem seria a menor possibilidade de variação somaclonal devido à ausência de suprimento exógeno de fitorreguladores e à atividade organogenética relativamente simples, quando comparada ao grande número de órgãos formados nos caules (gemas, folhas, frutos e inclusive raízes) (Peres & Kerbauy, 2000). A variação somaclonal pode ser reduzida também quando comparada à cultura de calos e suspensão celular por ser um órgão diferenciado.

Diante do exposto acima, quando o objetivo for a produção de princípios ativos *in vitro*, a cultura de calos é uma das ferramentas mais promissoras, assim como a cultura de suspensão celular. Mesmo esta última é fundamental para o seu estabelecimento, definição de um protocolo eficiente na produção de calos, pois é através dela que se inicia a suspensão celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERBIRK, N.; ORGAARD, M.; NIELSEN, J. K. Glucosinolates, flea beetle resistance, and leaf pubescence as taxonomic characters in the genus *Barbarea* (Brassicaceae). *Phytochemistry*, St. Paul, v. 63, n. 1, p. 69-80, Jan. 2003.
- ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHAVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar epicuticularwax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 30, n. 7, p. 677-683, July 2002.
- ALMEIDA, V. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Análise enzimática e quimiotaxonomia de duas variedades de *Ocimum nudicaule* Benth. (Labiatae). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 75-80, jul. 1986.
- AMARAL, M. C. E.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Teor de cera foliar epicuticular de dicotiledôneas do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 8, p. 127-130, dez. 1985.
- ARMIÉM, A. G.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental por *Baccharis megapotamica* var. *megapotamica* e var. *weirii* (Compositae) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1/2. p. 5-20, jan./jun. 1993.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D. C.; Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 52, n. 3, p. 230-234, jun. 2000.
- AWAD, M. A.; WAGENMAKERS, P. S.; JAGER, A. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 88, n. 3/4, p. 289-298, Dec. 2001.
- BARRUETO CID, L. P. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 1998. Brasília: EMBRAPA, v. 1, 864 p.

BLOSZYK, E.; SZAFRANSKI, F.; DROZDZ, B.; AL-SHAMERI, K. African plants as antifeedants against stored-product insect pests. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, Binghamton, v. 3, n. 1, 1995.

CAHILL, D. M.; McCOMB, J. A. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 40, n. 5, 315-332, May 1992.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 519-535.

CHEN, H.; YUAN, J. P.; CHEN, F.; ZHANG, Y. L.; SONG, J. Y. Tanshinone production in Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 147-156, Dec. 1997.

COSTA, E. R.; COSTA, J. N.; ARMIÉM, A. G.; BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em equinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 19-26, jan./jun. 1995.

CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 26, p. 54-63, mar./abr. 1986.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. B. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318, 2000.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 13, n. 3, p. 425-453, 1995.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, Woburn, v. 17, n. 8, p. 674-684, Aug. 1995.

DUDAI, N.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; PALEVITCH, D.; HALEVY, A. H. Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected by environmental conditions and flowering. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 84, n. 3, p. 453-459, Mar. 1992.

ELLIS, D. D.; ZELDIN, E. L.; BRODHAGEN, M.; RUSSIN, W. A.; MCCOWN, B. H. Taxol production in nodule cultures *Taxus*. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 59, n. 3, 246-250, mar. 1996.

FAINI, F.; LABBE, C.; COLL, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 27, n. 7, p. 673-679, Oct. 1999.

FERREIRA, J. F. S.; JANICK, J. Roots as an enancing factor for the production of artemisin in shoot cultures of *Artemisina annua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 211-217, mar. 1996.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. (Org.). *Farmacognosia da dlanta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p. 101-121.

GENE, R. M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARÍN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of active constituents. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 62, n. 3, p. 232-235, June 1996.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture*. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. part 1, 574 p.

GOTTLIEB, O. R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. *Ciência e Cultura*, Campinas, v. 38, n. 8, p. 707-716, ago. 1987.

GUILLET, G.; LORENZETTI, F.; BÉLANGER, A.; ARNASON, J. T.; BERNAYS, E. A. Production of glands in leaves of *Porophyllum* spp. (Asteraceae): ecological and genetic determinants, and implications for insect herbivores. *Journal of Ecology*, Oxford, v. 85, n. 5, p. 647-655, Oct. 1997.

JAKUPOVIC, J.; SCHUSTER, A.; GANZER, U.; BOHLMANN, F.; BOLDT, P. E. Sequi- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 29, n. 7, p. 2217-2222, July 1990.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. L.; DEANS, S. G.; EAGLESHAM, E. Potential agrochemical and medicinal usage of essential oils of *Pelargonium* species. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, Binghamton, v. 3, n. 2, 1995.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F. I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 38, n. 2, p. 381-389, Feb. 1995.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV, 1995. 220 p.

QUEIROGA, M. L.; FERRACINE, V.; MARSAIOLI, A. J. Three new oxigenated cadinanes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 42, n. 4, p. 1097-1103, Abr. 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Farmacognosia e farmacobiotechnologia*. São Paulo: Editora Premier, 1997. 372 p.

RODRIGUES, R. L.; TOKARNIA, C. H. Fatores que influenciam a toxidez de *Baccharis coridifolia* (Compositae): um estudo experimental em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Rio de Janeiro, v. 15, n. 2/3, p. 51-69, abr./set. 1995.

SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONART, R. *Plantas medicinais (Herbarium, flora er scientia)*. São Paulo: Icone, 1988. 179 p.

SANTOS, R. I. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et. al. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p. 323-354.

SCOGINGS, P. F.; DZIBA, L. E.; GORDON, I. J. Leaf chemistry of woody plants in relation to season, canopy retention and goat browsing in a semiarid subtropical savanna. *Austral Ecology*, Carlton, v. 29, n. 3, p. 278-286, June 2004.

SHARMA, P. K.; ANAND, P.; SANKHALKAR, S.; SHETYE, R. Photochemical and biochemical changes in wheat seedlings exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Science*, Clare, v. 132, n. 1, p. 21-30, Feb. 1998.

SHEPHERD, T.; ROBERTSON, G. W.; GRIFFITHS, D. W.; BIRCH, A. N. E.; DUNCAN, G. Effects of environment on the composition of epicuticular wax from kale and swede. *Phytochemistry*, St. Paul, v. 40, n. 2, p. 407-417, Feb. 1995.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Uberlândia, v. 3, n. 16, p. 38-43, set./out. 2000.

SILVA, J. B.; GROTTA, A. S. Anatomia e óleo essencial de *Baccharis retusa* D. C. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 321-326, 1971.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 101-121, 1999.

SIQUEIRA N. C. S.; SILVA, G. A. A. B.; ALICE C. B.; NITSCHKE M. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. e *Baccharis trimeria* (Less.) DC (Compositae), espécies espontâneas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 36-39, 1985.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Science*, Boca Raton, v. 10, n. 1, p. 63-121, Jan. 1991.

SOUTHERTON, S. G.; DEVERALL, B. J.; Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *Tritia*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, n. 6, p. 437-450, Dec. 1990.

SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. C.; CRAVEIRO, A. A. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza: Edições UFC, 1991. 416 p.

STOCKIGT, J.; OBITZ, P.; FALKENHAGEN, H.; LUTTERBACH, R.; ENDREB, S. Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 97-109, Nov. 1995.

SUTTISRI, R.; KINGHORN, A. D.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O. Neoclerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 35, n. 2, p. 443-446, Feb. 1994.

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

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Micropropagação. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, 864 p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 128 p.

VARASCHIN, M. S.; BARROS, C. S. L.; JARVIS, B. B. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 69-75, abr./jun. 1998.

ZU, W.; ASGHARI, G.; LOCKWOOD, G. B. Factors affecting volatile terpene and non-terpene biotransformation products in plant cell cultures. *Fitoterapia*, Milan, v. 71, p. 501-506, 2000.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

ZUNINO, M. P.; NEWTON, M. N.; MAESTRI, D. M.; ZYGADLO, J. A. Essential oils of three *Baccharis* species. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, n. 1, p. 86-87, Feb. 1998.

CAPÍTULO II

TEOR DE FLAVONÓIDES EM CALOS E PLÂNTULAS *IN VITRO* DE CARQUEJA [*Baccharis trimera* (LESS) D.C.]

RESUMO

SILVA, Fabiano Guimarães. Teor de flavonóides em calos e plântulas *in vitro* de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.]. 2005. Cap. 2, p.30-56. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de comparar acúmulo de flavonóides em calos, plântulas *in vitro* e plantas *in vivo*, bem como avaliar o efeito da citocinina cinetina (CIN) no acúmulo de fitomassa dos calos e síntese de flavonóides. Seedlings germinados *in vitro* foram transferidos para meio MS suplementado com 10,0 μM de ANA combinados com 0; 1,0 e 5,0 μM de cinetina e mantidos em ausência de luz. Em calos não ocorreu síntese das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona. Em plântulas cultivadas *in vitro*, constatou-se acúmulo da flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona, porém em concentrações inferiores às encontradas em plantas *in vivo*. Já a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona não foi constatada em plântulas *in vitro* nas condições de análise adotadas. O ácido clorogênico apresentou teores bastante reduzidos em plântulas *in vitro* e plantas *in vivo*, diferindo dos calos, que apresentaram teores mais elevados. Ausência de cinetina induziu calos com tendência de menor acúmulo de fitomassa (26,86 mg/frasco), comparado a 44,73 mg/frasco (1,0 μM) e 46,50 mg/frasco (5,0 μM) de Cinetina. O teor de ácido clorogênico não diferiu entre as concentrações de CIN avaliadas, porém apresentou tendência de maior elevação quando esta foi adicionada na concentração de 1,0 μM (129,57 mg/g de calo seco), comparado à sua ausência (92,36 mg/g de calo seco) e 5,0 μM de CIN (93,07 mg/g de calo seco). Maior rendimento de ácido clorogênico foi alcançado na presença de 1,0 μM de CIN (5,80 mg/frasco), comparado à sua ausência (2,48 mg/frasco).

¹ Comitê Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Januário - UNAERP.

ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Flavonoids content in *in vitro* callus and plantlets of carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.]. 2005. Cap. 2, p.30-56. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

With the objective of examining the accumulation of flavonoid in callus and comparing with the accumulation in *in vitro* plantlets and *in vivo* plants, and evaluating the effect of the cytokinin kinetin (KIN) on the accumulation of biomass of the calluses and flavonoids synthesis, the present work was accomplished. *In vitro*-germinated seedlings were transferred to MS medium supplemented with 10.0 μM of NAA combined with 0; 1.0 and 5.0 μM de KIN and maintained in the absence of light. In callus did not occur the synthesis of flavones 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetoxyflavone and 5-hydroxy-3',4',6,7-tetrametoxyflavone. In *in vitro* cultivated plantlets, the accumulation of flavone 5,3'-dihidroxy-4',6,7-trimetoxyflavone was found, but at inferior concentrations than those found in *in vivo* plants. But the flavone 5-hydroxy-3',4',6,7-tetrametoxyflavone was not found in *in vitro* plantlets. Undetermined flavonoid presented quite reduced contents in *in vitro* plantlets and *in vivo* plants, differing from the callus, which presented higher contents. Absence of KIN induced callus with a trend to less accumulation of biomass (26.86 mg/flask), compared with 44.73 mg/flask (1.0 μM) and 46.50 mg/flask (5.0 μM) of KIN. Chlorogenic acid content did not differ among the concentrations of KIN evaluated, but presented a trend to increased elevation when this was added at the concentration of 1.0 μM (129.57 mg/g of dry callus), compared with its absence (92.36 mg/g of dry callus) and 5.0 μM of KIN (93.07 mg/g of dry callus). Increased chlorogenic acid yield was reached in the presence 1.0 μM of KIN (5.80 mg/flask), compared with its absence (2.48 mg/flask).

¹ Guidance Committee: Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Januário - UNAERP.

1 INTRODUÇÃO

Quando o objetivo for a produção de metabólitos secundários *in vitro*, de maneira geral a primeira estratégia utilizada para a otimização de sua produção é a manipulação epigenética. Esta estratégia considera a identificação e seleção de linhagens celulares de maior potencial produtivo, a otimização do meio de cultura, a manipulação de fatores do ambiente (intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura, CO₂, O₂), a influência do nível de diferenciação celular, a adição de inibidores ou precursores ao meio de cultura e a elicitação (Maraschin & Verpoorte, 1999).

O meio de cultura tem sido bastante estudado e melhorado em muito a produção. Neste contexto, o emprego de fitorreguladores como giberelinas e ácido abscísico, e principalmente auxinas e citocininas, tem exercido considerável influência. Níveis de fitorreguladores, auxina e cinetina têm mostrado efeito notável sobre o crescimento e produtividade de metabólitos secundários. Aumentos dos níveis de auxinas em culturas, como ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), promovem dediferenciação das células e reduzem o acúmulo de metabólitos secundários. Auxinas adicionadas ao meio sólido estimulam a indução de calos, porém para a síntese de produtos é mais aconselhável o uso de baixos níveis ou a sua remoção (Dicosmo & Misawa, 1995; Figueiredo et al., 1995). As citocininas têm diferentes efeitos dependendo do tipo de metabólito e da espécie com a qual se esteja trabalhando (Obata-Sasamoto & Komamine, 1983).

A relação citocinina/auxina em calos de *Rhodiola sachalinensis* Boriss. (Crassulaceae), bem como os seus níveis, tiveram importância no crescimento de calos e acúmulo de salidroside e a elevada relação citocinina/auxina foi benéfica para ambos os acúmulos de fitomassa e salidroside (Xu, et al., 1999).

Explantes de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) submetidos a diferentes concentrações de diferentes citocininas e auxinas apresentaram a produção de calos diferenciada (Figueiredo & Pais, 1991).

A formulação dos sais do meio de cultura também tem exercido considerável influência na produção de metabólitos secundários. Cultura de suspensão celular de *A. millefolium* em meio JS (Schripsema, 1991) revelou produção de óleo essencial com uma composição bastante diferente, comparado com células crescidas em meio B5 (Gamborg et al., 1968) (Figueiredo et al., 1995). Para o crescimento celular, a fonte de nitrogênio influenciou significativamente (Figueiredo & Pais, 1991).

Em *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae) a produção de tanshinona foi condicionada ao meio de cultura; o meio B5 suportou o melhor crescimento, enquanto o meio 6,7 V (Veliky & Martin, 1970) promoveu a produção de tanshinona em culturas de suspensão celular. Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização de um sistema de duas fases para produção de tanshinona em culturas de suspensão celular (Chen et al., 1997).

Diferentes meios de cultura e fontes de auxinas influenciaram o crescimento de calos e produção de emetina em calos de *Psychotria ipecacuanha* Rich (Rubiaceae) (Cerdeira et al., 1995). Em *Genista tinctoria* L. (Fabaceae), a formulação de sais SH (Schenk & Hildebrant, 1972) apresentou o melhor índice de crescimento de calos e o MC (Mc Cown, 1981), o pior. Quanto ao acúmulo de isoflavonas, o SH também se mostrou mais propício e o MS (Murashige & Skoog, 1962), o pior. Esta superioridade do meio SH foi atribuída ao maior teor de inositol deste meio (Luczkiewicz & Glód, 2003).

Entre os sais das diferentes formulações de meios, o nitrogênio tem merecido destaque. A relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ afetou fortemente a produção de jaceosidina (6-dimetoxi-flavona). Crescimento celular e acúmulo deste

flavonóide aumentaram com o acréscimo de NO_3^- . A relação ótima de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ para o crescimento e acúmulo jaceosidina foi de 1:5, ao invés de 1:2, como no meio MS. Em contraste, o crescimento e o acúmulo deste flavonóide foram inibidos em elevada concentração de flavonóide (Zhao et al., 2001).

A fonte e a concentração de carbono também têm sido bastante estudadas. Dentre maltose, glicose, frutose e sacarose, nas concentrações de 20, 30 e 60 g.L^{-1} , o mais elevado aumento na concentração de antocianina foi observado com a utilização de sacarose na concentração de 60 g.L^{-1} . Este aumento foi atribuído também ao estresse osmótico, que pode ter ativado o metabolismo secundário (Luczkiewicz & Cisowski, 2001).

Em *S. mitiorrhiza*, concentrações entre 2 e 10% exerceram influência diferenciada sobre o crescimento de células. Foram realizados estudos para separar os efeitos entre disponibilidade de carbono e potencial hídrico nas diferentes concentrações de sacarose, demonstrando sensibilidade de crescimento celular em menor disponibilidade de água no meio de cultura. Já o teor de tanshinona foi mais elevado em meio contendo 10% de sacarose, embora o crescimento tenha sido inibido sob estas condições (Chen et al., 1997).

A concentração de sacarose exerceu um efeito positivo na produção de taxol em calos de *Taxus brevifolia* Hort. ex Gord. (Coniferae), até mesmo em ausência de suplemento de nutrientes (Ellis et al., 1996). Em *A. millefolium*, a concentração de sacarose no meio foi determinante para o crescimento celular (Figueiredo e Pais, 1991). De maneira geral, meios que maximizam o acúmulo de fitomassa minimizam o teor de metabólitos secundários. Diante disto, vários trabalhos têm utilizado com sucesso um sistema de duas fases, a inicial para acúmulo de fitomassa e a segunda, de produção de metabólitos secundários (Chen et al., 1997; Luczkiewicz & Glód, 2003).

Outro exemplo de sistemas de duas fases maximizando o acúmulo de flavonóides foi demonstrado para *Rudbeckia hirta* L. (Asteraceae). Neste trabalho, na primeira fase foi selecionado o meio SH, que foi o melhor para o crescimento de calos. Na segunda fase, o meio SH foi utilizado com o intuito de selecionar o melhor balanço hormonal para maximizar a síntese de antocianina (Luczkiewicz & Cisowski, 2001).

Os fatores ambientais luz e temperatura estão entre os mais estudados. Explantes de *A. millefolium* induzidos em ausência de luz praticamente não dediferenciaram, sendo mais eficientes sob fotoperíodo de 16 horas. Por outro lado, calos mantidos em ausência de luz mostraram o mais rápido crescimento, alta friabilidade e menor oxidação do que aqueles mantidos em presença de luz. Já para suspensão celular desta espécie, culturas mantidas em luz contínua revelaram crescimento mais lento e elevado grau de agregação quando comparadas com aquelas mantidas em ausência de luz (Figueiredo & Pais, 1991). Foi sugerido que o elevado acúmulo de metabólitos secundários em ausência de luz ocorreu devido à fotossensibilidade dos produtos e/ou às enzimas destas rotas biossintéticas (Figueiredo et al., 1995).

Quando os agregados celulares em *S. mitiorrhiza* foram cultivados em luz, tornaram-se verdes e uma distinta mudança morfológica foi observada. Os agregados celulares transferidos para ausência de luz produziram mais tanshinona se comparados aos cultivados sob iluminação contínua, o que sugere o efeito inibitório sobre a produção de tanshinona em culturas celulares (Chen et al., 1997).

Em *Saussurea medusa* Maxim. (Asteraceae) submetidas a luzes branca, azul, vermelho e vermelho distante, foi demonstrado que as luzes azul e vermelha foram mais eficientes na indução do flavonóide 6-dimetoxiflavona (Zhao et al., 2001). Em *G. tinctoria*, a luz teve um efeito positivo no crescimento

de calo e biossíntese de isoflavonas (Luczkiewicz & Glód, 2003). Mesma observação foi feita para o acúmulo de flavonóides (catequinas e proantocianina) em calos de *Camellia sinensis* Kuntze (Theaceae) (Shibasaki-Kitakawa et al., 2003).

Estudando a temperatura ótima para a produção da flavona jaceosidina em calos de *S. medusa*, Zhao et al., (2001) constataram que o acúmulo de fitomassa seca foi maior a 25°C, comparado a 20 e 35°C. Mesma observação foi realizada para o teor da referida flavona e, conseqüentemente, considerável aumento no rendimento foi constatado na temperatura de 25°C. Segundo estes autores, esta melhora no rendimento de jaceosidina pode ser devida a uma ótima potencialidade catalítica de uma ou várias enzimas envolvidas na síntese de flavonóides.

O grau de diferenciação tem demonstrado exercer grande influência no metabolismo secundário. Como regra geral, em plantas há uma grande correlação entre citodiferenciação e metabolismo secundário. Um aumento de 4 a 6 vezes no teor de alcalóides, concomitante a um incremento no nível de diferenciação celular, foi observado em culturas celulares de *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. (Apocynaceae) (Maraschin & Verpoorte, 1999).

Outra espécie que demonstrou requerer um grau mínimo de diferenciação (tecidos com plastídios abundantes) para a produção de monoterpenos foi *Piqueria trinervia* Cav. (Asteraceae). Calos com maiores teores de clorofila produziram o monoterpeno piquerol A, enquanto os que apresentaram menores teores não o produzem, demonstrando que a síntese de monoterpenos é normalmente associada com o plastídio (Saad et al., 2000). Mesma observação foi realizada para a síntese dos flavonóides catequinas e proantocianinas, em que calos que apresentaram maior teor de clorofila

apresentaram maior desempenho na síntese de flavonóides (Shibasaki-Kitakawa et al., 2003).

Em *G. tinctoria*, o acúmulo de diferentes isoflavonas em suspensão celular foi grandemente influenciada pela diferenciação do tecido (Luczkiewicz & Glód, 2003). Em *Hypericum perforatum* L. (Clusiaceae), calos não apresentaram síntese dos flavonóides rutina, hiperosideo e quercetina, e sim em plântulas regeneradas a partir destes calos. Mesmo nestas plântulas, seu acúmulo foi intensificado conforme ocorria o desenvolvimento das plântulas, ficando clara a necessidade de diferenciação de órgãos para o acúmulo destes flavonóides (Pasqua et al., 2003).

Agregados de calos compactos, cultivados em meio líquido de *Rhodiola sachalinensis* Borris (Crassulaceae), demonstraram que estes exibiram algum nível de diferenciação celular, o que foi, possivelmente, responsável por um aumento na produção de salidrosideo (Xu, et al., 1999).

É possível aumentar a biossíntese de metabólitos secundários específicos pela adição de precursores às culturas de células. Por exemplo, aminoácidos têm sido adicionados ao meio de cultura para a produção de alcalóides e outros produtos (Dicosmo & Misawa, 1995).

Uma técnica de que se pode lançar mão é a utilização de elicitores, que podem ser abióticos ou bióticos. Entre os abióticos se destacam os íons metais pesados como AgNO_3 , CdCl_2 (Pitta-Alvarez et al., 2000) e radiação UV. Quanto aos bióticos, são utilizados poli/oligossacarídeos de parede celular de plantas e microorganismos, enzimas (celulases, hemicelulases, pectinases e quitosana); peptídios, glicopeptídeos e lipídeos têm sido utilizados como elicitores (Chen et al., 1997; Contin et al., 1999; Figueiredo et al., 1995; Maraschin & Verpoorte, 1999; Saad et al., 2000). Neste último grupo merecem destaque os fungos endofíticos associados com espécies de plantas sob estudo, os quais são

geralmente utilizadas como elicitores, tendo proporcionado bons resultados (Huang et al., 2001; Pulici et al., 1997; König et al., 1999; Strobel et al., 1997; Wang, et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi examinar o acúmulo de flavonóides em calos e comparar com o acúmulo em plântulas *in vitro* e plantas *in vivo*, e avaliar o efeito da citocinina cinetina (CIN) no acúmulo de fitomassa e síntese de flavonóides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e implantação *in vitro*: foram utilizadas sementes de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C. Asteraceae] coletadas de planta matriz localizada no Horto de Plantas Medicinais/UFLA, cuja exsiccata do material vegetal encontra-se registrada no Herbário do Departamento de Biologia/UFLA, sob o número 169933. As sementes foram desinfestadas conforme descrito por Silva et al. (2003). A incubação ocorreu em presença de intensidade luminosa de $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas. Quando as plântulas atingiram 30 dias, foram transferidas para o meio de indução de calos. Nestas mesmas plântulas foi também quantificado o teor das flavonas e ácido clorogênico.

Indução de calos: O meio de cultura foi o MS, suplementado com 10,0 μM de ANA e três concentrações de CIN (0, 1,0 e 5,0 μM), conforme descrito por Nascimento et al. (2003b). O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, que aconteceu a 121°C por 20 minutos. Utilizaram-se tubos de ensaio (25 x 150 mm), em que foram adicionados 10,0 mL do meio. As condições de incubação aconteceram em sala de crescimento a 25 °C \pm 1, em ausência de luz, conforme o trabalho de Nascimento et al. (2003a). Ao final de 30 dias, os calos formados foram transferidos para o mesmo meio de cultura, em que permaneceram por mais 30 dias. Em seguida, foram avaliados por meio das características de acúmulo de fitomassa e teor de flavonóides.

Extração e quantificação dos flavonóides e ácido clorogênico. As partes aéreas e calos foram secos em desumidificador em temperatura ambiente até atingirem massa constante. Já desidratadas, estas foram acondicionadas em tubos de ensaio vedados com tampa plástica e lacrados com parafilme, mantidos em ausência de luz em congelador. Amostras de 100 mg do pó foram

submetidos à extração com metanol grau CLAE em banho de ultra-som por 30 min. As extrações foram realizadas em triplicata. Os extratos obtidos foram, a seguir, avaliados por CLAE.

As análises quantitativas realizadas por CLAE foram desenvolvidas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD VP com detector DAD (arranjo de diodo) Shimadzu SPD-M10 VP, injetor automático SIL-10AD VP, coluna RP-18 Shim-pack 25 cm x 4,6 cm (5 μ), empregando-se um gradiente linear de MeOH/ H₂O + 0,1% CH₃COOH 30% →100% (35 min) com fluxo 0,9 ml/min e detecção a 254 nm. A flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxiavona (1), conhecida também como eupatorina, foi utilizada como padrão externo.

A análise quantitativa das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxiavona (1) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxiavona (2) (Figura 2.1) foi realizada construindo-se uma curva de calibração de 4 pontos, que apresentou linearidade de resposta do detector no intervalo 0,039 μ g/ μ L →2,5 μ g/ μ L e coeficiente de correlação R = 0,9997 (Figura 2.2).

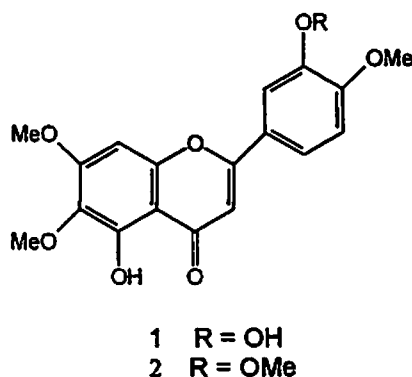


FIGURA 2.1. Estruturas das flavonas eupatorina ou 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxiavona (1) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxiavona (2). UFLA, Lavras, MG, 2005.

As flavonas 1 e 2 foram isoladas do extrato em CHCl_3 -MeOH (2:1) das partes aéreas de *Baccharis trimera*. O extrato obtido foi solubilizado em metanol/água (2:8) e, a seguir, submetido a uma partição líquido-líquido com extrações sucessivas em hexano, acetato de etila e n-butanol.

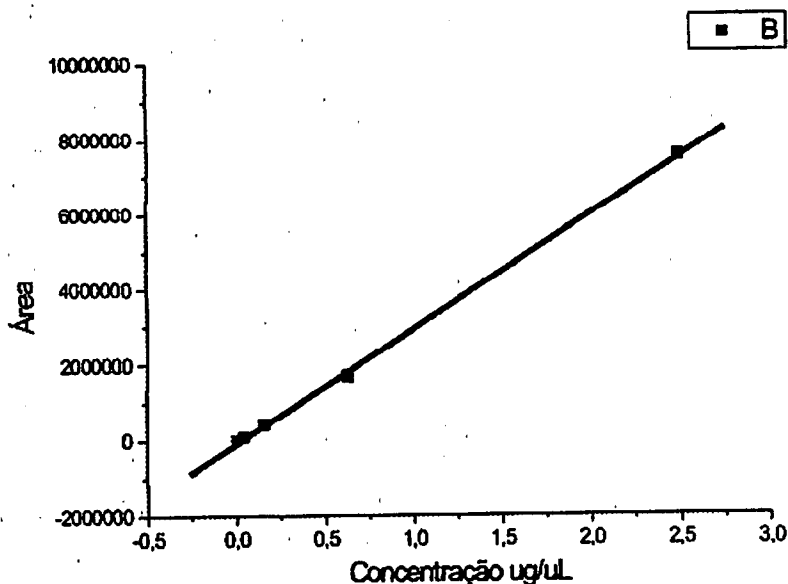


FIGURA 2.2. Curva de Calibração para a 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona (1). UFLA, Lavras, MG, 2005.

A fração em acetato de etila, após ser cromatografada em coluna de sílica sob vácuo (eluente: hexano/AcOEt 1:1) e recromatografada em coluna de sephadex LH-20 eluída em metanol, permitiu o isolamento das flavonas 1 e 2.

A elucidação estrutural das flavonas 1 e 2 foi realizada através de métodos espectroscópicos (RMN^1H , RMN^{13}C e Dept 135) e comparação com dados de literatura (Martínez et al., 1987; Schinella et al., 1998).

O ácido clorogênico foi isolado dos calos produzidos na presença de 5 μ M de cinetina. Calos de *B. trimera* secos e triturados (0,75g), foram submetidos à extração em metanol por maceração em banho de ultrassom (30min) por 3 vezes. Após a remoção do solvente em evaporador rotativo, obteve-se 0,210g do extrato bruto. O extrato metanólico obtido foi a seguir cromatografado via exclusão em coluna de sephadex LH-20 em metanol, levando ao isolamento do composto fenólico.

Delineamento experimental: o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso (DIC); cada unidade experimental foi composta por 3 repetições, perfazendo 15 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando para tal o programa de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises quantitativas realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência das amostras de carqueja avaliadas, permitiram a constatação da presença das flavonas 1 ($t_R = 27,87$ min) e 2 ($t_R = 29,70$ min), através da comparação dos tempos de retenção e máximos de absorção no espectro no ultravioleta a $\lambda_{\text{máx}}$ 197, 344 e 274 e $\lambda_{\text{máx}}$ 198, 343 e 275 para as flavonas 1 e 2, respectivamente (Figura 2.3).

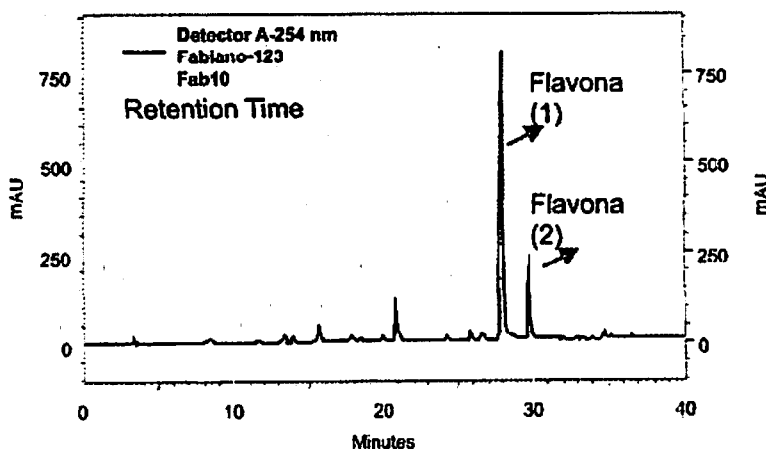


FIGURA 2.3. Cromatograma obtido por CLAE do extrato metanólico das partes aéreas de Carqueja silvestre na estação chuvosa. Flavona 1 (eupatorina ou 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona) e flavona 2 (5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Em calos induzidos no meio MS suplementados com $10,0 \mu\text{M}$ de ANA e diferentes concentrações de CIN mantidos em ausência de luz não ocorreu síntese das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona (Eupatorina) e 5-

hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona (Tabela 2.1). A ausência destas flavonas nos calos pode ser atribuída tanto a vários fatores como simplesmente à ausência de luz no cultivo, uma vez que este é um dos fatores ambientais que tem mostrado forte relação com a indução da síntese de flavonóides (Luczkiewicz & Glód, 2003; Shibasaki-Kitakawa et al., 2003; Zhao et al., 2001). Calos de *Taraxacum officinale* F.H.Wigg. (Asteraceae) crescidos em presença de luz apresentaram síntese da antocianina cianidina3-(6"-malonilglucoside). Nesta condição de luz, os calos apresentaram uma coloração púrpura intensa. Já nos calos mantidos em ausência de luz, somente células com coloração cinza desprovidas de pigmentação proliferaram e não houve síntese desta antociana por não haver expressão da chalcona sintase, enzima chave da rota biossintética, diferindo das células crescidas em presença de luz (Akashi et al., 1997).

TABELA 2.1. Teor (mg/g de fitomassa seca) das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona (Eupatorina), 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona e ácido clorogênico, em calos, plantas *in vivo* e *in vitro* de carqueja [*Baccharis trimeria* (Less) D.C.]. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Tipo de tecido	5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona	5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona	Ácido clorogênico
Planta <i>in vivo</i> ^x	172,272 ± 36,18	5,281 ± 0,67	10,49 ± 0,81
Plântulas <i>in vitro</i> ^y	53,212 ± 6,40	-	8,72 ± 1,19
Calos (0 µM CIN ^z)	-	-	92,36 ± 13,33
Calos (1,0 µM CIN ^z)	-	-	129,57 ± 9,63
Calos (5,0 µM CIN ^z)	-	-	93,07 ± 3,43

^x Planta matriz doadora das sementes para a implantação dos experimentos *in vitro*.

^y Plântulas de carqueja germinadas *in vitro*, em meio MS-50%, e utilizadas para a indução dos calos. ^z Calos cultivados em meio MS suplementado com 10,0 µM de ANA e 0; 1,0 e 5,0 µM de CIN, em ausência de luz.

Segundo Dias et al. (1998), o ambiente *in vivo* não oferece estresse como fungos, bactérias e radiação UV, entre outros. Em plantas *in vivo*, isoflavonas podem servir como armazenamentos de fitoalexinas, que são liberadas somente em condições de estresse (Luczkiewicz & Glód, 2003). Além disso, síntese de compostos fenólicos ocorre principalmente durante a diferenciação celular e após a maturação foliar, condições que não ocorrem em calos. Da mesma maneira, calos de *C. sinensis* induzidos em ausência de luz e repicados para a presença apresentaram um considerável aumento no acúmulo de flavonóides (catequinas e proantocianina), sem reduzir o acúmulo de fitomassa. Este melhor desempenho em presença de luz foi atribuído a um maior teor de cloroplastos em células mantidas em presença de luz, um importante sítio de síntese de flavonóides. Além deste, a luz tem demonstrado promover a atividade da fenilalanina amônia liase (PAL), enzima importante na via dos flavonóides (Shibasaki-Kitakawa et al., 2003).

Observa-se pelos resultados da tabela 2.1 que em plântulas cultivadas *in vitro*, houve acúmulo da flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona, porém em concentrações mais de três vezes inferiores às encontradas na planta matriz *in vivo*. Já a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona não foi constatada em plântulas *in vitro*. Já com relação ao ácido clorogênico nota-se que os teores foram bastante reduzidos em plantas *in vivo* e *in vitro*, respectivamente 10 e 12 vezes inferiores ao teor encontrado nos calos (105,00 mg/g FS). Resultados semelhantes foram encontrados para as espécies da família Asteraceae *S. medusa*, cujos calos apresentaram teor do flavonóide 6-dimetoxi flavona 18 vezes maiores que as plantas cultivadas *in vivo* (Zhao et al., 2001) e *R. hirta*, para a qual a concentração de antocianina em calos foi mais de sete vezes maior que em flores da planta mãe *in vivo* (Luczkiewicz & Cisowski, 2001). Outras famílias botânicas, como as espécies do gênero *Genista*, também

demonstraram maior capacidade de acumular isoflavonas em calos, comparadas às plantas *in vivo* (Luczkiewicz & Glód, 2003).

Na presença de 5,0 μM de CIN, os calos apresentaram coloração mais clara (Figura 2.4). Foi verificada uma tendência de inferioridade na fitomassa seca de calos quando CIN não foi adicionada ao meio (Figura 2.5a). O ácido clorogênico apresentou uma tendência de superioridade quando CIN estava na concentração de 1,0 μM (129,57 mg/g calo seco), comparado com sua ausência (92,36 mg/g calo seco) e na presença de 5,0 μM de CIN (93,07 mg/g calo seco), porém não houve diferenças significativas entre as concentrações avaliadas (Figura 2.5b). Já o rendimento do ácido clorogênico foi diferente entre as concentrações de CIN; em 1,0 μM (5,80 mg/frasco), foi superior à sua ausência (2,48 mg/frasco); e na concentração de 5,0 μM (4,33 mg/frasco), apresentou rendimento intermediário (Figura 2.5c).

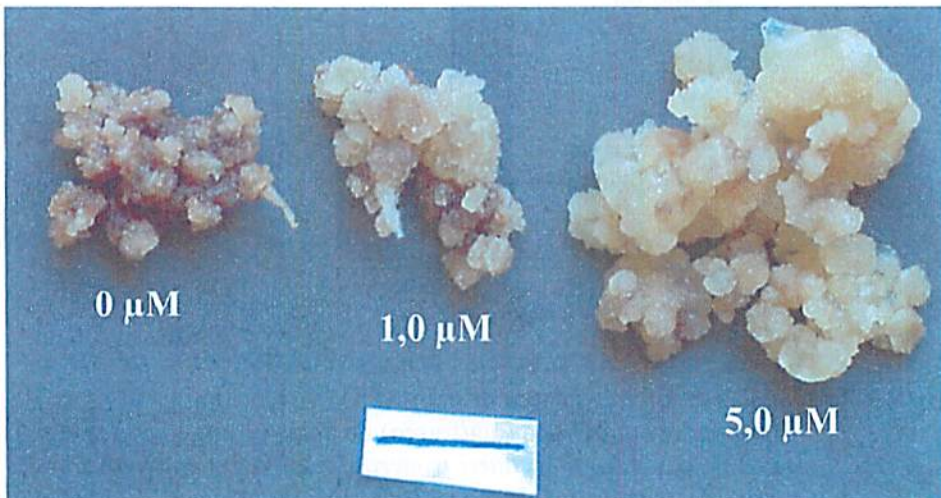


FIGURA 2.4. Calos de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.], em meio MS, suplementado com 10,0 μM de ANA e diferentes concentrações de CIN, aos 60 dias de cultivo. (Barra) = 1 cm. UFLA, Lavras, MG, 2005.

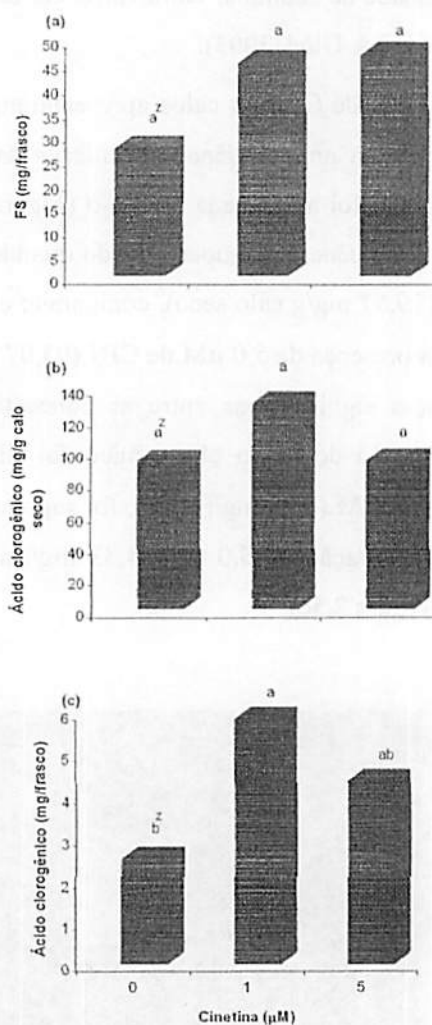


FIGURA 2.5. Médias da fitomassa seca de calos (FS) (a), teor (mg/g calo seco) (b) e rendimento/frasco (mg/frasco) de ácido clorogênico (c), em calos de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.] cultivados em meio MS suplementado com 10,0 μM de ANA e diferentes concentrações de cinetina (CIN), em ausência de luz. ^zMédias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Estes resultados foram interessantes porque, de maneira geral, condições que maximizam acúmulo de fitomassa de calos não são apropriadas para acúmulo de metabólitos secundários, o que requer sistemas de duas fases, ou seja, uma primeira fase para crescimento celular e uma segunda para acúmulo de metabólitos secundários (Chen et al., 1997; Luczkiewicz & Cisowski, 2001). Portanto, assim como ocorrido para várias espécies do gênero *Genista* (Luczkiewicz & Glód, 2003), o meio que se mostrou mais propício para a proliferação de calos coincidiu com o maior acúmulo de ácido clorogênico. Porém, quanto às condições de incubação, calos de carqueja induzidos em presença de luz se apresentam totalmente escurecidos e após o primeiro subcultivo ficam necrosados, motivo pelo qual ainda não foi avaliado o acúmulo dos flavonóides em calos mantidos em presença de luz. No entanto, Luczkiewicz & Glód, (2003), verificaram que calos induzidos e mantidos em presença de luz mostraram maior acúmulo de isoflavona que os mantidos em ausência de luz, independentemente do meio de cultura.

Em *R. hirta*, auxina ANA na concentração de 2,68 μM causou acréscimo de 44% no teor de antocianina. Quanto às citocininas, zeatina estimulou a produção na concentração de 2,28 e 22,8 μM ; 2iP, nas concentrações de 2,46 e 24,6 μM , e BAP, nas concentrações de 2,22 e 22,2 μM , impediram a produção de antocianina (Luczkiewicz e Cisowski, 2001).

Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C obtidos para o composto 3 permitem inferir que este composto é um ácido clorogênico derivado do ácido quínico, porém sua estrutura não está totalmente elucidada.

De acordo com os objetivos iniciais, os resultados obtidos no presente trabalho são encorajadores, demonstram que calos de *B. trimera* são capazes de sintetizar ácidos fenólicos, mesmo em ausência de luz, e se apresentam propícios para futuros estudos envolvendo a elicitação abiótica (com luz) e biótica (fungos endofíticos já isolados da própria espécie).

4 CONCLUSÕES

A citocinina cinetina na concentração de 1,0 μ M maximizou o rendimento do ácido clorogênico;

Plântulas *in vitro* sintetizam a flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona, porém em quantidades menores, comparadas à planta mãe *in vivo*, e não sintetizam a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona;

Não houve síntese das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona em calos de carqueja, mas sintetizam um flavonóide não determinado em quantidades superiores às plântulas *in vitro* e à planta mãe *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, T.; SAITO, N.; HIROTA, H.; AYABE, S. Anthocyanin-producing dandelion callus as a chalcone synthase source in recombinant polyketide reductase assay. *Phytochemistry*, Oxford, v. 46, n. 2, p. 283-287, Feb. 1997.

CERDEIRA, R. M. M.; KRANS, J. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Evaluation of emetine production in ipecac callus. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 47, n. 1/2, p. 76-78, jan./fev. 1995.

CHEN, H.; YUAN, J. P.; CHEN, F.; ZHANG, Y. L.; SONG, J. Y. Tanshinone production in Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 147-156, Dec. 1997.

CONTIN, A. C.; HEIJDEN, R. V. D.; VERPOORTE, R. Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin a *Catharanthus roseus* cell suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 111-119, 1999.

DIAS, A. C. P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERNANDES-FERREIRA, M.; FERRERES, F. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1165-1168, July 1998.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 13, n. 3, p. 425-453, 1995.

ELLIS, D. D.; ZELDIN, E. L.; BRODHAGEN, M.; RUSSIN, W. A.; MCCOWN, B. H. Taxol production in nodule cultures *Taxus*. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 59, n. 3, p. 246-250, mar. 1996.

FIGUEIREDO, A. C.; PAIS, M. S. S.; SCHEFFER, J. J. C. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, Amsterdam, v. 40, p. 113-118, 1995.

FIGUEIREDO, A. C. S.; PAIS, M. S. *Achillea millefolium* (yarrow) cell suspension cultures: establishment and growth conds. **Biotechnology Letters**, London, v. 13, n. 1, p. 63-68, Jan. 1991.

FURUYA, T.; KOJIMA, H.; SYONO, K. Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissue. **Phytochemistry**, Oxford, v. 10, p. 1529-1532, 1971.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p. 163-167, 2001.

KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Geniculol, a new biologically diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, n. 1, p. 155-157, Jan. 1999.

LUCZKIEWICZ, M.; CISOWSKI, W. Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 57-68, 2001.

LUCZKIEWICZ, M.; GLÓD, D. Callus cultures of *Genista* plants-in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. **Plant Science**, Clare, v. 165, n. 5, p. 1101-1108, Nov. 2003.

MARASCHIN, V.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biociência**, Uberlândia, v. 2, n. 10, p. 24-28, set./out. 1999.

MARTINÉZ, V.; BARBERA, O.; SANCHES-PARAREDA, J.; MARCO, J. A. Phenolic and acetylenic metabolites from *Artemisa assoana*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 2619-2624, Sept. 1987.

Mc COWN, B.; LLOYD, G. woody plant medium (WMP) – a mineral nutrients formulation for microculture of woody plant species. *Hort Science*, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 453, June 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-493, 1962.

NASCIMENTO, V. E.; SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; SALES, J. F.; BERTOLUCCI, S. K. V. Efeito do explante, luz e fitorreguladores na indução de calos de carqueja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS: estratégias para novos rumos, 1., 2003, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2003a. p. 227

NASCIMENTO, V. E.; SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; SALES, J. F.; BERTOLUCCI, S. K. V. Indução de calos de carqueja em meios suplementados com diferentes auxinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS: estratégias para novos rumos, 1., 2003, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2003b. p. 228

NAM, K. S.; JO, Y. S.; KIM, Y. H.; HYUN, J. W.; KIM, H. W. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*, Oxford, v. 69, n. 2, p. 229-237, June 2001.

OBATA-SASAMOTO, H.; KOMAMINE, A. Effect of culture conditions on dopa accumulation in callus culture of *Stizolobium hassjoo*. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 49, n. 2, p. 120-123, 1983.

PASQUA, G., AVATO, P., MONACELLI, B., SANTAMARIA, A.R., ARGENTIERI, M.P. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, Clare, v. 165, p. 977-982, 2003.

PITTA-ALVAREZ, S. I.; SPOLLANSKY, T. C.; GIULIETTI, A. M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 26, n. 2-4, p. 252-258, Feb. 2000.

PULICI, M.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H.; OKADA, G.; ESUMI, Y.; UZAWA, J.; YOSHIDA, S. Metabolites of *Pestalotiopsis* spp.; endophytic fungi of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 46, n. 2, p. 313-319, Jan. 1997.

SAAD, I.; DIAZ, E.; CHAVEZ, I.; REYES-CHILPA, R.; RUBLUO, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M. Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 55, n. 1, p. 51-57, Jan. 2000.

SCHENK, R. U.; HILDEBRANT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonos and dicotyledonos plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 199-204, 1972.

SCHINELLA, G. R.; GINER, R-M. RECIO, M. D. C.; BUSCHIAZZO DE, P. M.; RÍOS, J-L.; MÁÑEZ, S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London, v. 50, n. 9, p. 1069-1074, Sept. 1998.

SCHRIPSEMA, J. Factors involved in the alkaloid production of *Tabernaemontana divaricata* plant cell suspension cultures. 1991. Thesis (Ph. D.) - Leiden University, Leiden.

SHIBASAKI-KITAKAWA, N.; TAKEISHI, J.; YONEMOTO, T. Improvement of catechin productivity in suspension cultures of tea callus cells. *Biotechnology Progress*, Washington, v. 19, n. 2, p. 655-658, Mar./Apr. 2003.

SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; SALES, J. F.; DIVINO, S. P.; BERTOLUCCI, S. K. Efeito da concentração de sais e fitoreguladores na indução de calos em carqueja. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 03, p. 535-540, maio/jun. 2003.

STROBEL, G. A.; TOREZYNSKI, R.; BOLLON, A. *Acremonium* sp. - a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*, Clare, v. 128, n. 1, p. 97-108, Sept. 1997.

VELIKY, I. A.; MARTIN, S. M. A fermenter for plant cell suspension cultures. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 16, n. 4, p. 223-226, Apr. 1970.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 51-57, 2002.

XU, J. F.; YING, P. Q.; HAN, A. M.; SU, Z. G. Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodiola sachalinensis*: manipulation of plant growth regulators and sucrose. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 53-58, 1998.

ZHAO, D.; XING, J.; LI, M.; LU, M.; ZHAO, Q. Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 227-234, Dec. 2001.

CAPÍTULO III

TEOR DE FLAVONÓIDES EM POPULAÇÕES SILVESTRE E CULTIVADA DE CARQUEJA [*Baccharis trimera* (LESS) D.C.] COLETADAS NA ÉPOCA SECA E ÚMIDA

RESUMO

SILVA, Fabiano Guimarães. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.] coletadas nas estações seca e úmida. 2005. Cap. 3, p.57-79. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Com o objetivo de avaliar a influência da sazonalidade e a hipótese de que manejos culturais utilizados em plantios desta espécie poderão influenciar o teor de flavonóides, foi implantado o presente trabalho. A partir da parte aérea, quantificou-se o teor das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona em plantas nativas e silvestres. Para isto, seis coletas mensais foram realizadas nas estações seca e úmida, respectivamente. As análises quantitativas realizadas por CLAE foram desenvolvidas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD VP com detector DAD (arranjo de diodo) Shimadzu SPD-M10 VP, injetor automático SIL-10AD VP, coluna RP-18 Shim-pack 25 cm x 4,6 cm (5 μ), empregando-se um gradiente linear de MeOH/H₂O + 0,1% CH₃COOH 30% → 100% (35 min), com fluxo 0,9 ml/min e detecção a 254 nm. A flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona (1), conhecida também como eupatorina, foi utilizada como padrão externo. A flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona apresentou maior teor em plantas coletadas na estação úmida. Não houve diferenças entre plantas cultivadas e silvestres nas duas estações. Já a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona apresentou maior teor em plantas silvestres, comparadas a plantas cultivadas na estação úmida.

¹ Comitê Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Januário - UNAERP.

ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Flavonoids content in wild and cultivated populations of carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.] collected in the rainy and dry seasons. 2005. Cap. 3, p.57-79. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

With the aim of evaluating the influence of the seasonality and the hypothesis that the cultural managements utilized in plantings of that specie will be able to influence the flavonoids content, the present work was established. From shoot, the content of flavones 5,3'-dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone and 5-hydroxy-3',4',6,7-tetramethoxyflavone in native and wild plants was quantified. For this, six monthly collections were performed in the dry and rainy seasons, respectively. Flavone 5,3'-dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone presented increased content in plants collected in the rainy season. There were no differences between cultivated and wild plants in both seasons. But flavone 5-hydroxy-3',4',6,7-tetramethoxyflavone presented increased content in wild plants as compared with the cultivated plant in the rainy season.

¹ Guidance Committee: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Januário - UNAERP.

1 INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de metabólitos secundários de baixo peso molecular encontrada em muitos vegetais. São conhecidos mais de 4.200 flavonóides. De acordo com a classe dos flavonóides, a eles são atribuídas diversas funções, entre elas proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta e visível, contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; anti-oxidantes; controle de ação de hormônios vegetais; atuação como agentes alelopáticos e inibição de enzimas (Zuanazzi, 1999). Muitos dos efeitos protetores dos flavonóides em sistemas biológicos são descritos como propriedades anti-oxidantes, capacidade para transferir elétrons e radicais livres, e propriedades quelantes, redução de radicais alfa-tocoferol e inibição de oxidases (Akowuah, et al., 2004).

Recentemente tem sido considerável o interesse em encontrar anti-oxidantes de ocorrência natural para substituir os sintéticos na alimentação e medicina. Neste sentido, os fenólicos têm demonstrado atividades anti-oxidantes *in vivo* e têm sido utilizados como anti-oxidantes na alimentação. Este interesse econômico é decorrente de suas diferentes propriedades, como, por exemplo, as cores que estes pigmentos possuem, sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau e suas contribuições em nutrição e sabor dos alimentos. Além disto, estes compostos possuem também importância farmacológica, resultado de algumas propriedades importantes, atribuídas a alguns representantes da classe, como anticarcinogênica, antiinflamatória, antialérgica, antiulcerogênica e antivirais, entre outras (Akowuah, et al., 2004; Zuanazzi, 1999).

Foram observadas, em plantas de trigo (Poaceae), mudanças nos teores dos flavonols (kaempferol), cumarina, flavona e antocianina em resposta à

radiação suplementar com UV-B. Este comportamento indica que estes flavonóides são sintetizados em resposta ao tratamento com UV-B e acumulam nas camadas epidérmicas, formando uma proteção pela radiação UV-B e prevenindo, assim, que esta alcance sítios mais sensíveis, como DNA e proteínas nos tecidos do mesófilo (Sharma et al., 1998).

Com relação à família Asteraceae, os flavonóides têm mostrado bons biomarcadores taxonômicos; algumas espécies têm sido classificadas sistematicamente pelos flavonóides que produzem (Emerenciano et al., 2001; Sharp et al., 2001).

No gênero *Baccharis* (Asteraceae), vários estudos têm demonstrado a presença de muitos tipos de flavonóides. Em *B. tucumanensis* Hook. & Arn. foi isolado o flavonóide xantomicrool (Tonn et al., 1982). Em *B. thesioides* Kunth foram isolados rutina, hyperoside, isoquercetrina, quercetina e o flavonol quercetina 3-O-[β -D-apiofuranosil (Liu et al., 1993). Em *B. eleagnoides* foi isolado o 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina) (Mesquita et al., 1986). Em *B. pseudotenusifolia* I.L.Teodoro foram isoladas os flavonóides flavanonas (naringenina e eriodictiol), flavonol (aromadendrina), flavonas (5,7,4'-trihidroxi-6-metoxi flavona, 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxi flavona e apigenina), flavonóis (kaenferol, quercetina e 3,5,7,4'-tetraidroxi-3'-metoxiflavona) e os glicosídeos quercetina-3-O-ramnosídeo e quercetina-3-O-glucosídeo (Moreira et al., 2003). Em *B. trinervis* (Lam.) Pers. foram isoladas as flavonas 5,7-diidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (pectolinarigenina) 5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona (salvigenina) e 5,4'-diidroxi-3,6,7'-trimetoxiflavona (penduletina) (Sharp et al., 2001).

Em partes aéreas de *B. trimera*, foram isoladas as flavonas genkwanina, cirsimaritina, hispidulina e apigenina (Nakasugi & Komai, 1998) e a flavona eupatorina (Torres et al., 2000).

Estudos com a espécie *B. trimera* revelaram que o teor de flavonóides expresso em rutina apresentou um incremento no teor em plantas colhidas no verão em relação a plantas colhidas no inverno e na primavera (Borella et al., 2001).

Akowuah, et al. (2004) demonstraram, em folhas de *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae), coletadas em diferentes regiões da Malasia, diferentes concentrações das flavonas eupatorina e 3'-hidroxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona. Segundo estes autores, as variações podem ser devidas a condições ambientais como fertilidade do solo, por exemplo, e à idade das plantas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da época de colheita no teor de flavonóides e verificar a hipótese de que manejos culturais utilizados em plantios desta espécie poderão influenciar no teor destes flavonóides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido entre março de 2003 e fevereiro de 2004, no município de Lavras, MG (21°13'40" S e 44°57'50" W GRW).

O estudo foi conduzido em duas áreas, sendo as plantas cultivadas localizadas no campus da Universidade Federal de Lavras/Setor de Plantas Mediciniais (Figura 3.1a), crescidas isentas de plantas invasoras e com cobertura morta com grama batatais (*Paspalum* sp.). As plantas silvestres estavam localizadas a 20 km das plantas cultivadas, na Fazenda Três Barras (Figura 3.1b). Este segundo local foi escolhido devido à ocorrência natural e abundância de *Baccharis trimera*. Estas plantas estavam junto com outras espécies também espontâneas.

Para a formação das amostras compostas foram realizadas coletas mensais, de novembro a abril (estação úmida) e maio a outubro (estação seca).



(a)



(b)

FIGURA 3.1. Plantas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.] (a) plantas silvestres e (b) plantas cultivadas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

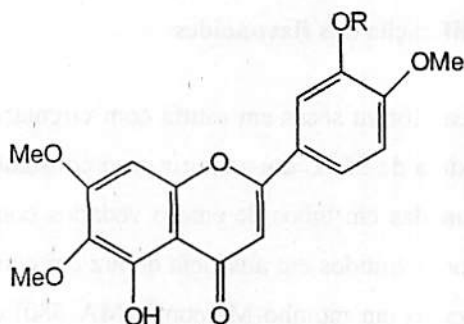
2.1 Extração e quantificação dos flavonóides

As partes aéreas foram secas em estufa com circulação de ar forçada a uma temperatura máxima de 35 °C até adquirir peso constante. Já desidratadas, estas foram acondicionadas em tubos de ensaio vedados com tampa plástica e lacrados com parafilme, mantidos em ausência de luz em congelador. As partes aéreas foram pulverizadas em moinho Marconi[®] (MA 680) com peneira de 10 mesh. Amostras de 100 mg do pó foram submetidos à extração com metanol grau HPLC em banho de ultra-som por 30 min. As extrações foram realizadas em triplicata. Os extratos obtidos foram a seguir avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises quantitativas realizadas por CLAE foram desenvolvidas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD VP com detector DAD (arranjo de diodo) Shimadzu SPD-M10 VP, injetor automático SIL-10AD VP, coluna RP-18 Shim-pack 25 cm x 4,6 cm (5 μ), empregando-se um gradiente linear de MeOH/ H₂O + 0,1% CH₃COOH 30% →100% (35 min), com fluxo 0,9 ml/min e detecção a 254 nm. A flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona (1), conhecida também como eupatorina, foi utilizada como padrão externo.

A análise quantitativa das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona (1) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona (2) (Figura 3.2) foi realizada construindo-se uma curva de calibração de 4 pontos, que apresentou linearidade de resposta do detector no intervalo 0,039 μ g/ μ L →2,5 μ g/ μ L e coeficiente de correlação R = 0,9997 (Figura 3.3).

As flavonas 1 e 2 foram isoladas do extrato em CHCl₃-MeOH (2:1) das partes aéreas de *Baccharis trimera*. O extrato obtido foi solubilizado em metanol/água (2:8) e, a seguir, submetido a uma partição líquido-líquido, com extrações sucessivas em hexano, acetato de etila e n-butanol.



- 1 R = OH
2 R = OMe

FIGURA 3.2. Estruturas das flavonas eupatorina ou 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona (1) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona (2). UFLA, Lavras, MG, 2005.

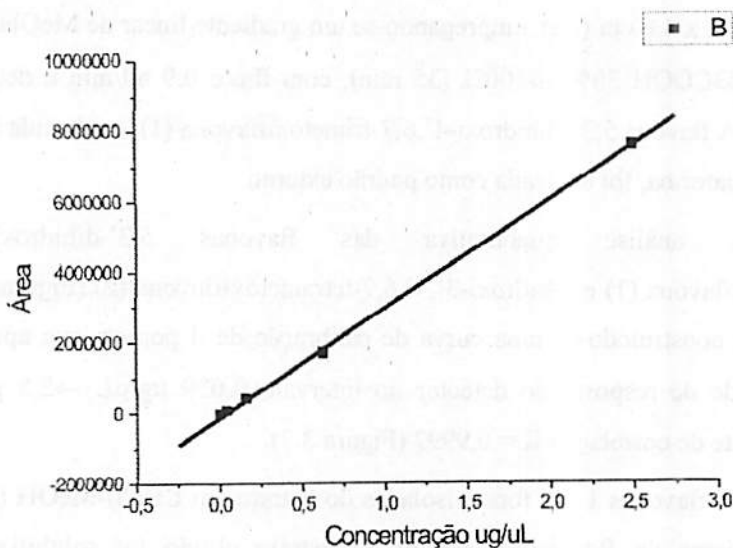


FIGURA 3.3. Curva de Calibração para a 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona (1). UFLA, Lavras, MG, 2005.

A fração em acetato de etila, após ser cromatografada em coluna de sílica sob vácuo (eluente: hexano/AcOEt 1:1) e recromatografada em coluna de sephadex LH-20 eluída em metanol, permitiu o isolamento das flavonas 1 e 2.

A elucidação estrutural foi realizada através de métodos espectroscópicos (RMN¹H, e RMN¹³C e Dept 135) e comparação com dados de literatura (Martínez et al., 1987; Schinella et al, 1998).

2.2 Caracterização ambiental

Amostras compostas de solo foram coletadas no local de crescimento das plantas silvestres e cultivadas, no mês de abril/2003, e foram analisadas pelo Departamento de Solos/UFLA quanto às propriedades químicas (Tabela 3.1) e físicas (Tabela 3.2). Apesar de um pH próximo do solo das duas populações, notam-se diferenças consideráveis entre os macronutrientes primários Fósforo e Potássio, com valores bem mais elevados no solo das plantas cultivadas e uma concentração de Alumínio bem mais elevada no solo das plantas silvestres.

A umidade do solo foi acompanhada pelo método gravimétrico, em três repetições por tratamento, em cada uma das 12 coletas. A coleta de cada amostra de solo foi realizada na camada de 0 a 20 cm de profundidade, no dia das coletas das plantas, no horário entre as 16:00 e 17:00 horas. A umidade ao longo da realização do experimento pode ser visualizada na figura 3.4, nota-se que houve variação ao longo do período, sendo que o maior teor de água ocorreu no mês de fevereiro, seguido pelos meses de outubro, dezembro e janeiro, e os menores teores nos meses de junho, julho, agosto e setembro, sendo este último a época mais seca.

TABELA 3.1. Caracterização química das amostras do solo de populações cultivada e nativa. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Características	Amostras	
	Cultivada	Nativa
pH em água (1:2,5)	5,6	5,4
P Mehlich 1 (mg.dm ⁻³)	5,5	2,6
P-remanescente (mg/L)	10,2	21,6
K Mehlich 1 (mg.dm ⁻³)	50	29,5
Ca (mmolc.dm ⁻³)	2,0	1,7
Mg (mmolc.dm ⁻³)	0,9	0,45
Al (mmolc.dm ⁻³)	0,1	0,45
H ⁺ Al (mmolc.dm ⁻³)	4,0	4,1
SB	3,0	2,3
CTC efetiva - t (mmolc.dm ⁻³)	3,1	2,7
CTC efetiva a pH 7,0- T (mmolc.dm ⁻³)	7,0	6,3
Saturação por Al - m (%)	3	17
Saturação por bases - V (%)	43,1	35,6
Matéria orgânica (g.dm ⁻³)	2,5	2,3
S - SO ₄ (mg.dm ⁻³)	9,3	6,85
B (mg.dm ⁻³)	0,3	0,2
Cu (mg.dm ⁻³)	4,8	3,1
Fe (mg.dm ⁻³)	40,1	225,7
Mn (mg.dm ⁻³)	28,8	72,2
Zn (mg.dm ⁻³)	13,6	2,9

TABELA 3.2. Caracterização física das amostras do solo de populações cultivada e nativa. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Amostra	Areia	Silte	Argila	Classe Textural
	dag/kg			
Cultivada	17	26	57	Argilosa
Silvestre	48	25	28	Textura Média

2.3 Características meteorológicas

O clima regional é do tipo Cwa, segundo a classificação climática de Köppen, com precipitação média anual de 1530 mm e 80% das chuvas concentradas de outubro a março. A estação seca se estende de abril a setembro. A temperatura média do ar do mês mais frio (julho) é de 15,8 °C, enquanto a média do mês mais quente (fevereiro) é 22,1 °C (Brasil, 1992). Os dados das temperaturas máximas, médias e mínimas, precipitação e umidade do solo se encontram na figura 3.4.

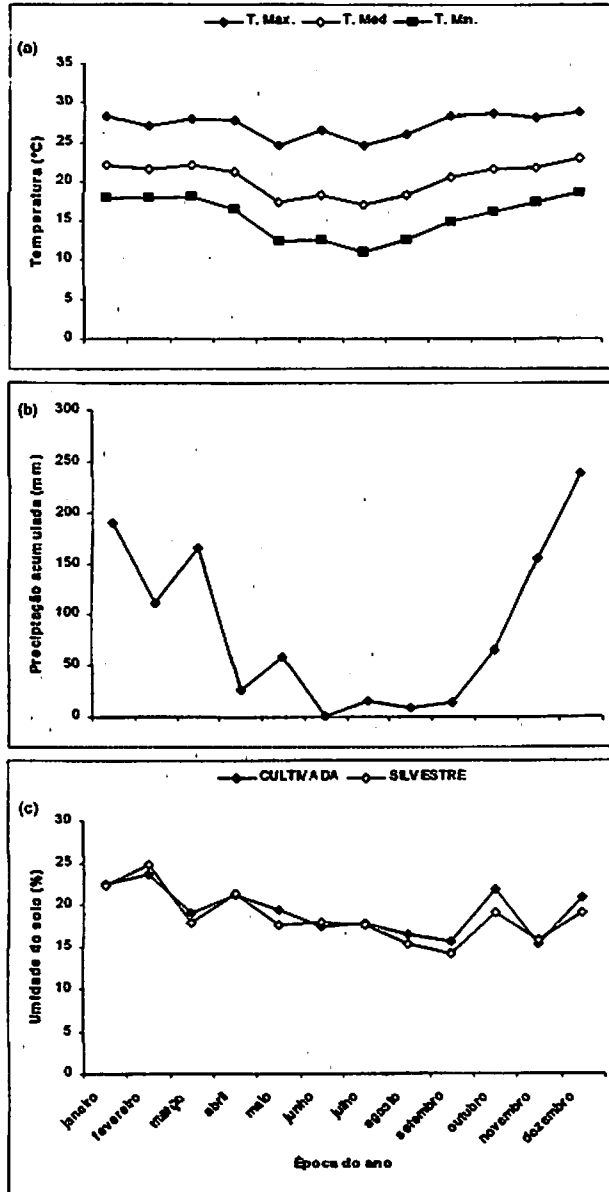


FIGURA 3.4. Temperatura máxima, média e mínima (a), precipitação (b) e umidade do solo de 0 a 20 cm de profundidade do local de coleta de plantas silvestres e cultivadas (c), referentes ao período de março de 2003 a fevereiro de 2004. UFLA, Lavras, MG, 2005.

2.4 Análise estatística

O experimento foi constituído de um fatorial 2x2, respectivamente populações cultivada e silvestre x estação seca e úmida. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC), com 3 repetições, perfazendo 12 unidades experimentais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser constatado na tabela 3.3, a flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona (eupatorina) é o flavonóide majoritário. Seu acúmulo se mostrou mais de 20 vezes maior que o acúmulo da flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona em plantas cultivadas na estação seca e úmida e 13 e seis vezes maior em plantas selvagens na estação seca e úmida, respectivamente.

TABELA 3.3. Teor das flavonas (mg/g fitomassa seca) 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona (Eupatorina) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona, em partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less) D.C, colhidas nas estações seca e úmida, em populações silvestres e cultivadas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

População	5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona		5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona	
	Estação			
	Seca	Úmida	Seca	Úmida
Cultivada	125,98 ± 13,24 Ba ^z	231,70 ± 14,88 Aa	6,21 ± 0,11 Aa	10,04 ± 2,50 Ab
Silvestre	129,47 ± 22,44 Ba	233,69 ± 24,69 Aa	9,95 ± 3,83 Ba	34,64 ± 19,07 Aa

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre estações e minúsculas entre populações não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Comparando-se o teor da flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona entre as plantas cultivadas e silvestres, observou-se que independentemente da estação, não ocorreram diferenças (Figura 3.5a). Considerando as duas estações do ano avaliadas, a estação úmida se mostrou mais propícia para o acúmulo deste metabólito, sendo o teor mais elevado de 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxilavona constatado para ambas as populações na estação úmida (233,69

$\pm 24,62$ e $231,70 \pm 14,88$ mg/g fitomassa seca), para as populações silvestres e cultivadas, respectivamente.

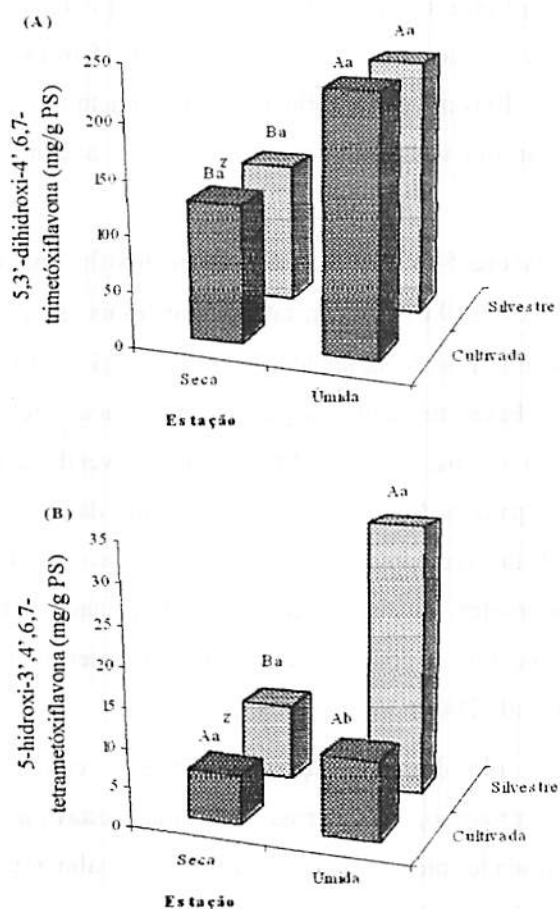


FIGURA 5. Teor (mg/g de fitomassa seca) das flavonas 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona (eupatorina) (A) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona (B), em *Baccharis trimera* (Less) D.C, colhidas na época seca e úmida, em populações silvestres e cultivadas. ^zMédias seguidas pela mesma letra maiúscula entre épocas e minúscula entre populações não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2005.

O maior teor desta flavona coincidiu com o período de maior temperatura e precipitação e, conseqüentemente, maior umidade do solo (novembro a março). Foi constatado, nesta estação, intenso crescimento vegetativo das plantas de ambas as populações, com muitas brotações, o que não foi observado nas plantas coletadas na estação seca (maio a outubro). Estas observações sugerem que um efeito indireto dos fatores ambientais no metabolismo desta flavona pode influenciar diretamente o crescimento do vegetal, o qual, por sua vez, pode ter influenciado o acúmulo desta flavona (tabela 3.3).

Já para a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilflavona, (Figura 3.5b) o maior acúmulo ($34,64 \pm 19,07$) foi constatado também na estação úmida, porém apenas na população silvestre. Na população cultivada não ocorreram diferenças entre as estações. Estes resultados sugerem que o acúmulo de metabólitos pertencentes a uma mesma classe é diferenciado, havendo a necessidade de estudos específicos para os diferentes compostos dentro da mesma classe. Como exemplo, o nível de flavonóide acumulado na casca de frutos de maçã submetidos a diferentes níveis de luz foi diferenciado, ou seja, alguns flavonóides responderam e outros se mostraram insensíveis a este fator ambiental (Awad et al., 2001).

Quanto ao solo das populações silvestres e cultivadas, apesar de apresentarem pH próximo, as plantas cultivadas estavam em condições superiores de fertilidade, além de serem adubadas anualmente com composto orgânico. O solo destas plantas apresentou teores mais elevados de P, K, capacidade de troca catiônica, matéria orgânica e saturação de bases (Tabela 3.1). Já o solo das plantas silvestres apresentou maior teor de alumínio e saturação por alumínio (m%). Esta última característica é a que melhor expressa o potencial fitotóxico do alumínio, sendo um dos pontos mais importantes a ser avaliado nos resultados da análise química do solo (Furtini Neto et al., 2001).

Estes fatores, associados à elevada competição com gramíneas e outras espécies, não influenciaram o teor da flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxiavona. Já a flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxiavona apresentou maior teor em plantas silvestres, comparadas a plantas cultivadas na estação úmida. A ausência de diferença na estação seca pode ter ocorrido devido à redução de umidade do solo, a qual causa, conseqüentemente, o decréscimo do teor destes elementos em contato com o sistema radicular, deixando as características químicas dos dois tipos de solos mais próximas. Já na estação úmida, a fase líquida do solo aumenta, elevando o contato destes elementos com o sistema radicular, os quais funcionariam como elicitores abióticos.

4 CONCLUSÕES

a) Plantas cultivadas e silvestres coletadas na estação úmida apresentaram maiores teores da flavona 5,3'-dihidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona;

b) Maior teor da flavona 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametóxi-flavona foi constatado em plantas silvestres, na estação úmida;

c) As diferentes flavonas avaliadas responderam distintamente aos fatores ambientais, implicando na época de colheita para a maximização dos rendimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOWUAH, G.A., ZHARI, I., NORHAYATI, I., SADIKUN, A., KHAMSAH, S.M. Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon* from malaysia. *Food Chemistry*, v. 87, p. 559-566, 2004.
- AWAD, M. A.; WAGENMAKERS, P. S.; JAGER, A. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 88, n. 3/4, p. 289-298, Dec. 2001.
- BORELLA, J. C.; FONTOURA, A.; MENEZES, Jr. A.; FRANÇA, S. C. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* Less. (Asteraceae) – Carqueja. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 101-104, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. Normas climatológicas – 1960-1991. Brasília, 1992. 84 p.
- EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T.; CAMPOS, C. C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 29, n. 9, p. 947-957, Oct. 2001.
- FURTINI NETO, A. E.; VALE, F. R.; RESENDE, A. V.; GUILHERME, L. R. G.; GUEDES, G. A. A. Fertilidade do solo. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 252p.
- LIU, Y.; TIMMERMANN, B. N.; HOFFMANN, J. J.; MCLAUGHLIN, S. P. A flavonol triglycoside from *Baccharis thesioides*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 33, n. 6, p. 1549-1551, June 1993.
- MARTINÉZ, V.; BARBERA, O.; SANCHES-PARAREDA, J.; MARCO, J. A. Phenolic and acetylenic metabolites from *Artemisa assoana*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 26, n. 9, p. 2619-2624, Sept. 1987.

MESQUITA, A. A. L.; CORRÊA, D. B.; PÁDUA, A. P.; GUEDES, M. L. O.; GOTTLIEB, O. R. Flavonoids from four compositae species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1255-1256, May 1986.

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemisia salina*. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 309-311, maio/jun. 2003.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 46, n. 7, p. 2560-2564, July 1998.

SCHINELLA, G. R.; GINER, R-M. RECIO, M. D. C.; BUSCHIAZZO DE, P. M.; RÍOS, J-L.; MÁÑEZ, S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London, v. 50, n. 9, p. 1069-1074, Sept. 1998.

SHARMA, P. K.; ANAND, P.; SANKHALKAR, S.; SHETYE, R. Photochemical and biochemical changes in wheat seedlings exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Science*, Clare, v. 132, n. 1, p. 21-30, Feb. 1998.

SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, D. S.; NASH, R. J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, London, v. 29, n. 1, p. 105-107, Jan. 2001.

SOICKE, H.; PESCHLOW, E. L. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and antihepatotoxic properties. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 53, n. 1, p. 37-39, Feb. 1987.

TONN, C. E.; ROSSOMANDO, P. C.; GIORDANO, O. S. Batudic acid and flavonoids from *Baccharis tucumanensis*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 21, n. 10, p. 2599-2600, Oct. 1982.

TORRES, L. M. B.; GAMBERINI, M. T.; ROQUE, N. F.; LIMA-LANDMAN, M. L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, Oxford, v. 55, n. 6, p. 617-619, Nov. 2000.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, D. S.; NASH, R. J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, London, v. 29, n. 1, p. 105-107, Jan. 2001.

TONN, C. E.; ROSSOMANDO, P. C.; GIORDANO, O. S. Batudioic acid and flavonoids from *Baccharis tucumanensis*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 21, n. 10, p. 2599-2600, Oct. 1982.

CAPÍTULO IV

VARIAÇÃO SAZONAL NO TEOR DE FENÓIS TOTAIS EM CARQUEJA [*Baccharis trimera* (LESS) D.C.]

RESUMO

SILVA, Fabiano Guimarães. **Variação sazonal no teor de fenóis totais em populações silvestres e cultivadas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.J. 2005. Cap. 4, p.80-95. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹**

Com o objetivo de avaliar a influência da variação sazonal no teor de fenóis totais em populações silvestre e nativa em carqueja, foi implantado o presente trabalho. Realizaram-se coletas mensais durante 12 meses e três horários (06:00, 12:00 e 18:00). O experimento foi constituído de um fatorial 2x3x12, sendo 2 populações, 3 horários de colheita e 12 épocas. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC), com 3 repetições, perfazendo 216 unidades experimentais. O material vegetal coletado foi a parte aérea da planta. Estas foram colhidas, desidratadas e, no momento da extração, trituradas. O método de análise utilizado foi o espectrofotométrico (Association of Agricultural Chemist - AOAC, 1970). O horário de colheita e as populações não influenciaram no teor de fenóis totais. Maiores teores de fenóis totais foram encontrados entre os meses de maio e outubro para a população cultivada e de junho a setembro para a silvestre. Menores teores de fenóis totais ocorreram na época mais úmida, com maiores temperaturas e no período de intenso crescimento vegetativo.

¹ Comitê Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dra. Ana Helena Januário - UNAERP.

ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Seasonal variation in the content of total phenols in wild and cultivated populations of carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.]. 2005. Cap. 3, p.80-95. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

With the objective to evaluate the influence of the seasonal variation on the content of total phenols in wild and cultivated populations in carqueja, the present work was established. monthly collections during 12 months and three schedule (6:00, 12:00 and 18:00). The experiment consisted of 2x3x12 factorial, being 2 populations, 3 collection schedule and 12 times during the year. The experiment design was in randomized blocks, with three replications, amounting to 216 experimental units. The plant collected material was the plants. Shoot were harvested, dehydrated and at the moment of extraction, ground. The method of analysis utilized was the spectrometric one (Association of Agricultural Chemist - AOAC, 1970). The collection schedule and the populations did not influence the content of total phenols. Increased contents of total phenols were found between the months of May and October for the cultivated populations and from June to September for the wild one. Lower contents of total phenols took place in the rainy season, with higher temperatures and in the period of intense vegetative growth.

¹ Guidance Committee: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Adviser), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Januário - UNAERP.

1 INTRODUÇÃO

Plantas originaram de um ambiente aquático. Essa sucessiva adaptação evolucionária para a terra foi alcançada basicamente pela formação massiva de compostos fenólicos vegetais. Estas substâncias, além de assumirem um papel estrutural na parede celular, apresentam uma vasta formação de constituintes não estruturais, com várias funções, como defesa de plantas (agentes alelopáticos, antifúngicos, etc), determinando, por exemplo, a durabilidade da madeira e o estabelecimento da cor da flor, os quais contribuem substancialmente para certos flavorizantes (paladar e odor). Estas funções e outras influenciadas pelos fenólicos vegetais são essenciais para a contínua sobrevivência de todos os tipos de plantas vasculares (Carvalho et al., 2004; Croteau et al., 2000; Robbers et al., 1997; Scogings et al., 2004).

No que diz respeito ao papel dos fenóis na interação planta-patógeno, pesquisas têm demonstrado que esta classe de metabólitos secundários exerce grande importância neste sentido. A indução da síntese de compostos fenólicos é uma característica comum da interação hospedeiro-patógeno, e a especificidade do fenol tem sido relacionada com a resistência do hospedeiro. Em tecidos foliares de trigo, resistentes ao fungo *Puccinia recondita*, encontraram-se os ácidos ferúlico e *p*-cumárico (Southerton e Deverall, 1990). *Eucalyptus calophylla* R.Br. (Myrtaceae) tratado com aminoácido, inibidor da PAL, alterou a resposta de resistência a *Phytophthora cinnamomi*, modificando a concentração de lignina e fenol, os quais apresentaram características fenotípicas de suscetibilidade. Esses resultados evidenciam a relação de síntese de fenol e lignina com a resistência das plantas a determinados patógenos. Estudos têm demonstrado o envolvimento das peroxidases na via biossintética de polifenóis e de lignina (Almeida et al., 1986).

A concentração de fenóis nos tecidos dos vegetais varia de acordo com sua taxa de biossíntese, o armazenamento e a degradação, que podem ser influenciados pelo balanço hormonal ou, ainda, regulados diretamente por enzimas, como também pelo balanço de substrato enzimático (Siqueira et al 1991). Outros fatores, como luz, temperatura, conteúdo de carboidratos, nutrição e status hídrico, podem influenciar na síntese de fenóis, embora sua concentração varie em relação ao tipo de composto fenólico, às espécies, ao estágio de crescimento e à parte da planta analisada. Condições de estresse podem, também, influenciar a liberação de polifenóis a partir dos vacúolos, bem como a síntese de novos fenóis (McConchie et al., 1994). Por exemplo, grupos de fenóis ácidos, como ácidos ferúlicos e p-cumárico, são mais encontrados em raízes, enquanto compostos isoflavonóides são observados predominantemente em folhas e menos em pecíolos, caule e raiz (Siqueira et al., 1991).

Geralmente, a concentração de compostos químicos de defesa, ricos em carbono, como os fenóis, é correlacionada negativamente com a taxa de crescimento e a redução do vigor das plantas. Também os fenóis solúveis como os taninos podem influenciar a opção de dieta e o consumo de alimentos por causar no alimento um sabor adstringente ou reduzir a disponibilidade de nutrientes após ingestão (Scogings et al., 2004).

Souza (1998), trabalhando com *Plantago major* L. (Plantaginaceae), verificou que o teor de fenóis na parte aérea foi maior que no sistema radicular, sendo mais expressiva a diferença durante a fase reprodutiva. No sistema radicular, o teor de fenóis não se alterou entre os diferentes níveis de luz e entre as fases de desenvolvimento da planta. Durante o amadurecimento das inflorescências o teor aumentou, porém em condições de 100% de irradiância este aumento no teor foi mais precoce que em plantas cultivadas a 50%. Quanto ao aumento no teor de fenóis tanto em folhas quanto em inflorescência, deduz-se que ocorra em razão da síntese de compostos fenólicos, os quais reduzem a

oxidação de auxinas ou estão diretamente envolvidos nos processos de florescimento.

Também, Bucher et al. (2003) estudaram o teor de fenóis durante as quatro estações do ano em algumas espécies da região de Córdoba (Argentina). Entre estas, *Lycium cestroides* Schltl. (Solanaceae) apresentou máximo teor no verão; *Prosopis* spp. (Fabaceae) e *Celtis tala* Gillies ex Planch. (Ulmaceae) não apresentaram diferenças entre as estações e *Schinus longifolius* Speg. (Anacardiaceae) apresentou maior teor na primavera e verão. Foi demonstrado, também, que a composição química destes vegetais influenciaram a dieta em *Phytotoma rutila*, o que foi associado, entre outros fatores, ao teor fenol.

Estudos realizados no sul da África com várias espécies vegetais demonstraram, de maneira geral, contra as expectativas iniciais, que os taninos condensados e fenóis totais foram mais elevados em todas as espécies durante a estação de crescimento. Esta observação foi interpretada como indicativo de que uma ótima estratégia de defesa que potencialmente reduz o risco de perda de atividade da gema apical do broto. No período de crescimento, *Scutia myrtina* Kurz (Rhamnaceae) e *Acacia karroo* Hayne (Mimosoideae) apresentaram os teores mais elevados de fenóis totais. Mesma observação foi realizada para *Diospyros lycioides* Desf. (Ebenaceae), *Ehretia rigida* Druce (Boraginaceae), *Grewia accidentalis* (Tiliaceae) e *Rhus longispina* Eckl. & Zeyh. (Anacardiaceae) (Scogings et al., 2004).

Em *Baccharis myriocephala* Baker (Asteraceae), o teor de tanino avaliado através da quantificação de fenóis totais aumentou por ocasião do início do florescimento, já no final da floração, este teor apresentou redução (Castro et al., 1999).

Em *B. dracunculifolia* DC. (Asteraceae) foi constatado maior teor de tanino durante a fase reprodutiva, comparada à não reprodutiva. Não foi

verificada relação entre a concentração de tanino e a abundância de galhas. Os autores sugeriram que a abundância de galhas nesta espécie é provavelmente determinada por outro fator particular que varia entre as fases fenológicas, como outros compostos secundários ou mecanismos de defesa não avaliados no estudo (Espírito-Santo & Fernandes, 1998).

Plantas de *Capsicum annum* L. (Solanaceae) foram cultivadas em três níveis hídricos com a finalidade de determinar seus efeitos no metabolismo fenilpropanóides. Os fenólicos solúveis e o conteúdo de lignina em frutos de pimentão supridas com níveis intermediários de água foram elevados se comparados aos de plantas estressadas hidricamente. Os resultados do presente trabalho sugerem que condições ambientais como o estresse hídrico apresentam um forte efeito sobre o acúmulo de capsaicinoides (composto fenólico) em frutos de pimentão, que é o resultado da competição entre biossíntese de capsaicinoides e outros metabólitos fenilpropanóides (Estrada et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi quantificar o teor de fenóis totais em *Baccharis trimera*, em populações silvestre e cultivadas, em diferentes épocas do ano e horários de colheita, visando determinar o melhor momento para a colheita quanto à produção desta classe de compostos, e avaliar se os manejos culturais influenciam no teor desta classe de compostos através da comparação do comportamento de plantas silvestres com cultivadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições gerais

O presente trabalho foi conduzido entre março de 2003 e fevereiro de 2004, no município de Lavras, MG (21°13'40" e 44°57'50" W GRW).

O estudo foi conduzido em duas áreas, sendo as plantas cultivadas localizadas no campus da Universidade Federal de Lavras/Setor de Plantas Medicinais, e plantas silvestres estavam localizadas a 20 km das cultivadas, como descrito no capítulo 3, onde também está descrita a caracterização ambiental e condições meteorológicas durante o experimento.

Foram realizadas colheitas mensais durante um ano, nos horários de 06, 12 e 18 hs. O material vegetal coletado foi constituído de toda a parte aérea, incluindo inflorescências, quando existiam.

2.2 Análise Fitoquímica

O método de análise utilizado foi o espectrofométrico (Association of Agricultural Chemist - AOAC, 1970).

Extração de fenóis totais: 100 mg de planta desidratada triturada foram submetidas a três extrações consecutivas com metanol (3 mL) a quente, sendo cada extração com duração de 10 minutos. Os extratos resultantes foram pipetados e filtrados em algodão, no balão volumétrico, e o volume foi completado para 10 mL com metanol.

Preparação da curva padrão: no preparo da curva padrão foram adicionados, em balão volumétrico de 10 mL, solução padrão de ácido tânico (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mL), 7,5 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente Folin-

Denis e 1,0 mL de solução saturada de NaCO_3 , diluindo-se para 10 mL com água. Após agitação, foi determinada a absorvância, após 30 minutos, em 760 nm, obtendo-se a curva padrão com a absorvância em função de mg de ácido tânico/100 mL.

Leitura em espectrofotômetro: as leituras foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U-2000, sendo realizadas três leituras por amostra. Na preparação de amostra para leitura de absorvância, foi pipetado 0,4 mL de extrato em balão volumétrico de 10 mL, ao qual foram adicionados 7,5 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente Folin-Denis e 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo completado o volume de 10 mL com água destilada. Após a adição dos reagentes, esperou-se 30 minutos para leitura de absorvância em 760 nm. Determinada, de acordo com a curva-padrão, a concentração das amostras mg de ácido tânico/100 mL, estas foram convertidas em porcentagem de tanino por 100 mg de amostra de planta desidratada, unidade utilizada no cálculo de análise de variância.

2.3 Análise estatística

O experimento foi constituído de um fatorial $2 \times 3 \times 12$, sendo 2 populações, 3 horários de colheita e 12 épocas. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC), com 3 repetições, perfazendo 216 unidades experimentais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, o teor de fenóis totais em plantas de *B. trimera* se mostrou com pouca variação entre populações, épocas do ano e horários de colheita. O teor variou de 3,26%, em plantas cultivadas, colhidas no mês de novembro as 6 horas a 7,32% em plantas silvestres, colhidas no mês de julho as 12 horas (Tabela 4.1). Castro et al., (1999) trabalhando com *B. myriocephala* verificaram que o teor de tanino expresso através do teor de fenóis totais variou consideravelmente, partindo de 0,26% a 12,18%, resultados bastante superiores aos encontrados no presente trabalho.

TABELA 4.1. Teor (%) de fenóis totais de partes aéreas em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.], cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes horários e épocas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Época do ano	Populações					
	Cultivadas			Silvestres		
	Horário de coleta					
	06:00	12:00	18:00	06:00	12:00	18:00
Jan/2004	5,59 Aa(a)	5,79 Aa(a)	5,45 Aa(a)	5,43 Aa(b)	5,29 Aa(a)	5,72 Aa(b)
Fev/2004	5,29 Aa(a)	5,34 Aa(a)	5,32 Aa(a)	4,76 Aa(b)	5,15 Aa(a)	5,00 Aa(b)
Mar/2003	4,35 Aa(b)	5,39 Aa(a)	5,63 Aa(a)	4,96 Aa(b)	5,19 Aa(a)	5,66 Aa(b)
Abr/2003	4,81 Aa(b)	5,23 Aa(a)	5,30 Aa(a)	5,27 Aa(b)	5,59 Aa(a)	5,36 Aa(b)
Mai/2003	6,21 Aa(a)	6,09 Aa(a)	5,97 Aa(a)	6,17 Aa(a)	5,83 Aa(a)	6,02 Aa(b)
Jun/2003	6,24 Aa(a)	6,38 Aa(a)	6,14 Aa(a)	6,46 Aa(a)	6,95 Aa(a)	7,07 Aa(a)
Jul/2003	7,20 Aa(a)	7,25 Aa(a)	6,86 Aa(a)	7,11 Aa(a)	7,32 Aa(a)	7,17 Aa(a)
Ago/2003	5,36 Aa(a)	6,52 Aa(a)	6,31 Aa(a)	6,43 Aa(a)	6,05 Aa(a)	6,47 Aa(a)
Set/2003	6,55 Aa(a)	6,60 Aa(a)	6,74 Aa(a)	6,59 Aa(a)	6,40 Aa(a)	7,02 Aa(a)
Out/2003	5,42 Aa(a)	6,34 Aa(a)	6,13 Aa(a)	5,50 Aa(b)	6,13Aa(a)	5,40 Aa(b)
Nov/2003	3,26 Ab(b)	5,88 Aa(a)	5,95 Aa(a)	5,71 Aa(b)	5,96 Aa(a)	6,07 Aa(b)
Dez/2003	4,58 Aa(b)	4,46 Aa(a)	4,66 Aa(a)	4,57 Aa(b)	5,22 Aa(a)	5,14 Aa(b)

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre horário de colheita, minúscula entre populações e dentro de parênteses entre época de colheita não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Cada ponto representa média de três repetições.

O teor de fenóis totais não diferiu entre as populações silvestre e cultivada, independentemente da época do ano. Quanto às épocas de colheita, os maiores teores ocorreram entre os meses de maio e outubro para a população cultivada e de junho a setembro para a silvestre (Figura 4.1 e tabela 4.1). Maiores teores de fenóis totais ocorreram nos meses com menor temperatura, precipitação e umidade do solo (Figura 3.1a, b e c, capítulo 3). Os menores teores de fenóis totais foram encontrados no período de crescimento vegetativo, o qual, no presente trabalho, ocorreu entre os meses de novembro a abril. Neste período as plantas se apresentavam em crescimento vegetativo. Resultados diferentes foram encontrados para a espécie *B. myriocephala* onde o início do florescimento coincidiu com a fase de aumento no teor de tanino (Castro et al., 1999).

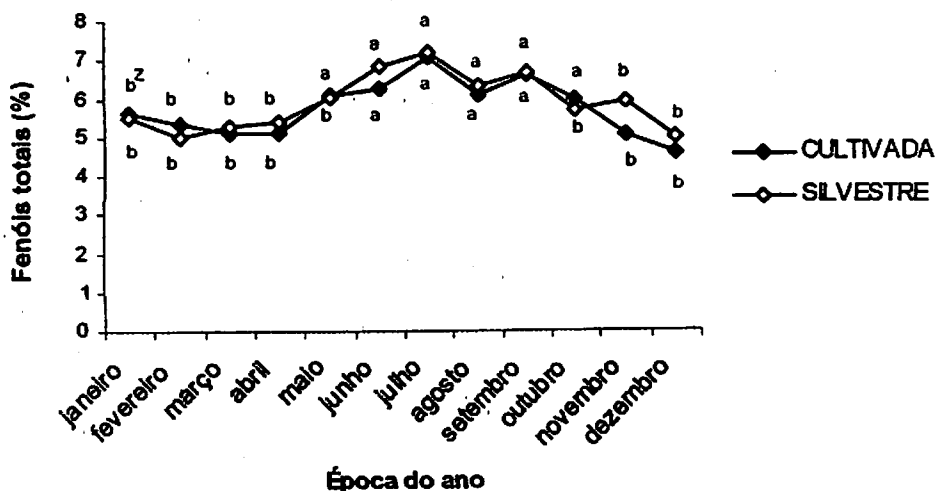


FIGURA 4.1. Teor (%) de fenóis totais de partes aéreas de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.], cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes épocas do ano. ^z Médias seguidas pela mesma letra em cada população não diferem entre si pelo teste de Scoot-Knott a de 5% de probabilidade. Cada ponto representa média de três repetições. Médias sobre horário de colheita. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Segundo Herms e Mattson (1992), há uma tendência de a concentração de compostos químicos de defesa ricos em carbono, como os fenóis, serem negativamente correlacionados com a taxa de crescimento e a redução do vigor das plantas, o que também foi constatado para as plantas de carqueja. Por outro lado, nem todas as espécies seguem este padrão. Como exemplo, *S. myrtina* e *Acacia karroo* apresentaram os teores mais elevados de fenóis totais na estação de crescimento. Mesma observação foi realizada para *D. lycioides*, *E. rigida*, *G. accidentalis* e *R. longispina* (Anacardiaceae) (Scogings et al., 2004).

Quanto ao horário de colheita, este não influenciou o teor de fenóis totais em nenhum dos meses ao longo do ano (Figura 4.2 e tabela 4.1).



FIGURA 4.2. Teor (%) de fenóis totais de partes aéreas em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.], colhidas em diferentes épocas e horários. Cada ponto representa médias de três repetições. Médias sobre populações. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Quando se avalia a interação entre os fatores populações, horários e época do ano, verifica-se, entre populações, que plantas cultivadas e colhidas no mês de novembro, às 6 horas, apresentaram teores de fenóis totais inferiores aos das silvestres (Tabela 4.1). As diferenças verificadas entre as épocas de colheita, quando analisadas sobre o horário, como demonstrado na figura 4.1, não foram verificadas em todos horários. Estas diferenças ocorreram em plantas cultivadas apenas nos horários de 6 horas. Nas silvestres, além do horário das 6 horas, ocorreu diferença também às 18 horas.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- a) O horário de colheita não influenciou o teor de fenóis totais;
- b) Plantas cultivadas não diferiram das silvestres quanto ao teor de fenóis totais;
- c) Maiores teores de fenóis totais ocorreram no período de seca e menores temperaturas, em repouso vegetativo e no florescimento das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Análise enzimática e quimiota xonomia de duas variedades de *Ocimum nudicaule* Benth. (Labiatae). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, n. 1, p. 75-80, jul. 1986.

ASSOCIATION OF AGRICULTURAL CHEMIST - AOAC. Official methods of analysis. 11. ed. Washington, 1970. 1015 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. Normas climatológicas - 1960-1991. Brasília, 1992. 84 p.

BUCHER, E. H.; TAMBURINI, D.; ABRIL, A.; TORRES, P. Folivory in the white-tipped plantcutter *Phytotoma rutila*: seasonal variations in diet composition and quality. *Jornal of Avian Biology*, Copenhagen, v. 34, n. 2, p. 211-216, June 2003.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et. al. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 519-535.

CASTRO, H. G.; CASALI, V. W.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D. C.), em diferentes épocas de colheita em Voçosa - MG. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai s*, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 29-33, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. B. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

ESPIRITO-SANTO, M. M.; FERNANDES, G. W. Abundance of *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) galls on the dioecious shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Environmental Entomology*, Lanham, v. 27, n. 4, p. 870-876, Aug. 1998.

ESTRADA, B.; POMAR, F.; DÍAZ, J.; MERINO, F.; BERNAL, M. A. Pungency level in fruits of the pardón pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 81, n. 4, p. 385-396, Oct. 1999.

HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, Chicago, v. 67, n. 3, p. 283-335, Sept. 1992.

MACCONCHIE, R.; LANH, N. S.; LAX, A. R.; LANG, G. A. Reexamining polyphenol oxidase, peroxidase, and leaf-blackening activity in *Protea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 119, n. 6, p. 1248-1254, Nov. 1994.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Farmacognosia e farmacobiotechnologia*. São Paulo: Editora Premier, 1997. 372 p.

SCOGINGS, P. F.; DZIBA, L. E.; GORDON, I. J. Leaf chemistry of woody plants in relation to season, canopy retention and goat browsing in a semiarid subtropical savanna. *Austral Ecology*, Carlton, v. 29, n. 3, p. 278-286, June 2004.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Science*, Boca Raton, v. 10, n. 1, p. 63-121, Jan. 1991.

SOUTHERTON, S. G.; DEVERALL, B. J.; Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *Tritia*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 37, n. 6, p. 437-450, Dec. 1990.

SOUZA, M. M. Crescimento e metabolismo secundário em duas condições de luminosidade e cultura *in vitro* de *Plantago major* L. 1998. 106 p. Tese (Doutorado em Fototecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAPÍTULO V

VARIAÇÃO DIURNA E SAZONAL NO TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL EM POPULAÇÕES SILVESTRE E CULTIVADA DE CARQUEJA [*Baccharis trimera* (LESS) D.C.]

RESUMO

SILVA, Fabiano Guimarães. **Variação diurna e sazonal no teor e composição química do óleo essencial em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.].** 2005. Cap. 5, p.96-133. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da variação circadiana e sazonal no teor e composição química do óleo essencial de carqueja, em populações silvestre e cultivada. Realizaram-se coletas mensais durante 12 meses e três horários (6:00, 12:00 e 18:00 horas). O experimento foi constituído de um fatorial 2x3x12, sendo 2 populações, 3 horários de colheita e 12 épocas. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC), com 3 repetições, perfazendo 216 unidades experimentais. O material vegetal coletado foi constituído de toda a parte aérea da planta. Esta foi colhida, desidratada e, no momento da extração, triturada. Para extração e determinação da porcentagem de óleo essencial, empregou-se a técnica de hidrodestilação. O material foi submetido a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). O período de maior teor de óleo essencial coincidiu com a época de maior crescimento vegetativo, que ocorreu entre os meses de novembro e fevereiro. Durante o período reprodutivo e três meses após, as plantas apresentaram o menor teor de óleo. Quanto ao horário de colheita e às populações, estes não influenciaram o teor de óleo essencial. Quanto à composição do óleo essencial da carqueja, foi constatado que o mesmo é constituído por sesquiterpenos. As porcentagens de hidrocarbonetos sesquiterpênicos entre os diferentes horários de colheita não diferiram entre si. Verificaram-se também, independentemente do horário de colheita, em plantas cultivadas em diferentes épocas do ano, valores inferiores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos em comparação com plantas silvestres. Ao longo do ano, maiores teores de sesquiterpenos oxigenados foram constatados entre os meses de março a agosto, dependendo da população e horário de coleta. As diferenças entre populações foram mínimas e ocorreram em pontos isolados na população silvestre.

¹ Comitê Orientador: Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Dr. Pedro Henriques Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Januário - UNAERP.

ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Diurnal and seasonal variation in the content and chemical composition of the essential oil in wild and cultivated populations of carqueja [*Baccharis trimeria* (Less) D.C.]. 2005. Cap. V, p.96-133. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The scope of this work was to evaluate the influence of the circadian and seasonal variation in the content and chemical composition of carqueja essential oil, in wild and cultivated populations. Monthly collections were performed during 12 months and three schedules (06:00, 12:00 and 18:00). The experiment was made up of 2x3x12 factorial, being 2 populations, 3 collection schedule and 12 times during the year. The experimental design was randomized blocks, with three replications, amounting to 216 experimental units. The collected plant material consisted of plants shoot. This was collected, dehydrated and at the moment of extraction, ground. For the extraction and determination of the percentage of essential oil, the hydrodistillation technique was employed. The material was submitted to gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GC/MS). The highest period content for essential oil coincided with the time of the greatest vegetative growth, which occurred between the months of November and February. During the reproductive period and three months later, the plants presented the lowest oil content. About the collection schedule and the populations, these did not influence the essential oil content. But for the composition of the carqueja essential oil, it was noticed that it is made up of sesquiterpenes. The percentages of sesquiterpene hydrocarbons among the different collection schedule did not differ from one another. Inferior values of sesquiterpene hydrocarbons as compared with wild plants were also verified, regardless of harvest schedule, in cultivated plants at different month of the year. Over the year, higher contents of oxygenated sesquiterpenes were found among the months of March to August, depending on the population and collection schedule. The differences among populations were minimal and occurred on isolated spots in the wild population. Some modifications in the individual components were demonstrated among the evaluated factors.

¹ Guidance Committee: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Adviser), Dr. Pedro Henrique Ferri - UFG, Dr^a. Ana Helena Jamário - UNAERP.

1 INTRODUÇÃO

As variações sazonais têm demonstrado influenciar o teor dos óleos essenciais. Neste sentido, o óleo de *Salvia libanotica* Boiss. & Gaill. (Lamiaceae) extraído durante as quatro estações do ano variou dependendo da estação (Farhat et al., 2001); *Santolina rosmarinifolia* L. (Asteraceae) apresentou acréscimo no teor de óleo nos meses de março, abril, maio e junho. O teor de óleo mostrou correlação positiva com precipitação e negativa com temperatura (Palá-Paúl et al., 2001).

Em *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae), os teores do óleo essencial variaram ao longo de um ano, apresentando-se mais elevados no mês de março e menos em setembro e outubro (Couto et al., 2003); *Piper aduncum* L. (Piperaceae) apresentou maior teor de óleo essencial nos meses mais quentes e chuvosos (Ming et al., 2002); *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (Poaceae) demonstrou teor bastante elevado de óleo essencial em outubro, decrescendo em fevereiro e reduzindo ainda mais em junho (Leal, et al., 2001).

Em *Cistus monspeliensis* L. (Cistaceae) o óleo essencial foi mais elevado em maio e menos em fevereiro (Angelopoulou et al., 2002); *Artemisia verlotiorum* Lamotte (Asteraceae), cultivado na Itália, apresentou teor de óleo essencial mais elevado no mês de abril e o mínimo em janeiro (Cherioconi et al., 2004); e em *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), o teor de óleo variou entre 0,75%, nos meses de junho e julho, e 0,08% no mês de dezembro (Hudaib et al., 2002).

Por outro lado, algumas espécies parecem não ser influenciadas pelas mudanças sazonais. Em *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae), o teor de óleo foi praticamente constante nos ramos entre as estações (Putievsky et al., 1995); em *Virola surinamensis* (Roland) Warburg, o teor de óleo essencial das folhas foi aproximadamente constante nas diferentes estações (Lopes et al., 1997); e em

Juniperus oxycedrus L. (Cupressaceae), o teor de óleo não apresentou modificações (Salido et al., 2002).

Mudanças sazonais também têm influenciado a quantidade de terpenos emitidos pelos vegetais para a atmosfera. As espécies arbóreas de *Cryptomeria japonica* (L. F.) D. Don, *Chamaecyparis obtusa* Siebold & Zucc. (Cupressaceae), *Abies sachalinensis* Mast. (Pinaceae), *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae), *T. sempervirens* L. (Cupressaceae), *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae) e *Cinnamomum japonicum* Siebold (Lauraceae) foram estudadas e verificou-se que o teor de óleo na folha e a quantidade de emissão de terpenos foram elevados no verão e baixos no inverno. Os teores de óleo essencial de *A. sachalinensis*, *T. occidentalis* e *T. sempervirens* mostraram pequena variação durante o ano, enquanto as demais espécies mostraram grandes diferenças entre a estação de verão e inverno. Foi sugerido que a emissão de terpeno variou com a produção de óleo, ou seja, essa emissão depende do óleo produzido, além da influência dos fatores ambientais temperatura e luz. A quantidade de emissão de terpeno de *C. obtusa* foi elevada a 30 °C, comparados a 15 °C (Yatagai et al., 1995); *Pinus pinea* L. (Pinaceae) e *Quercus ilex* L. (Fagaceae) também revelaram variações sazonais na emissão de monoterpenos (Sabillón e Cremades, 2001). A concentração de emissão de monoterpenos em floresta do norte da Finlândia variou de 97 no inverno para 250 ppt no verão (Hakola et al., 2003).

Assim como o teor dos óleos essenciais, a composição também tem demonstrado variar conforme a estação. Em *V. surinamensis* houve variação na composição relativa das classes de compostos (Lopes et al., 1997); *S. libanotica*, acompanhada durante as quatro estações do ano, revelou grandes modificações composicionais no óleo essencial (Farhat et al., 2001); *S. rosmarinifolia*, monoterpenos como β -felandreno, limoneno e 1,8-cineol mostraram correlação negativa com temperatura, enquanto capileno apresentou uma forte correlação

positiva com a precipitação. Os demais componentes do óleo essencial não apresentaram modificações (Palá-Paúl, 2001).

A. rosaeodora apresentou variação ao longo do ano no composto linalool (Couto et al., 2003); em *C. monspeliensis* durante novembro e fevereiro, monoterpenos foram ausentes, porém seu nível aumentou em maio e agosto. Sesquiterpenos alcançaram teores mais elevados nos meses de agosto e novembro (Angelopoulou et al., 2002). Os componentes do óleo essencial também apresentaram modificações ao longo do ano em *A. verlotiorum* (Cherioconi et al., 2004).

Avaliação da composição do óleo essencial em *J. oxycedrus* demonstrou que o aumento no componente majoritário α -pineno ocorreu do inverno para o verão e decresceu no outono (Salido et al., 2002). Em *A. canalilla*, os compostos metileugenol e 1-nitro-2-feniletano foram dependentes da estação. No período chuvoso, este alcançou valores próximos a 95%, enquanto metileugenol permaneceu abaixo de 18%. Em contraste, no período seco, 1-nitro-2-feniletano reduziu para 39%, enquanto metileugenol alcançou 45% (Taveira et al., 2002). Os óleos essenciais de *Commiphora quadricincta* Schweinf. (Burseraceae), coletados antes do inverno chuvoso e após o inverno, diferiram consideravelmente. Em outubro, este óleo essencial apresentou 22 compostos contra 12 no mês de março (Assad et al., 1997).

Thymus mastichina (L.) (Lamiaceae) cultivados em Portugal apresentou maior teor de (E)- β -ocimeno em maio (2,3%) e menor em outubro (0,6%) (Miguel et al., 2004); em *T. vulgaris* crescidos na Itália, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram maiores em dezembro do que em julho e os sesquiterpenos oxigenados não variaram nas duas épocas (Hudaib et al., 2002).

Em *Lippia Alba* cultivada no Rio Grande do Sul, no verão, o óleo essencial foi rico em linalool (72,7 – 79,2%), se comparado com o período de

inverno (50%) (Atti-Serafini et al., 2002). Ainda em *L. Alba*, a composição química do óleo essencial foi alterada em função das épocas de colheita. O sesquiterpeno majoritário do óleo essencial desta espécie (t-cariofileno) foi de 13,04% no verão para 8,16% no outono. O sesquiterpeno germacreno D apresentou maior teor no outono (5,56%) e menor no verão (1,89%) (Castro et al., 2002).

Estudos de emissão de terpenos com *P. pinea* e *Q. ilex*, revelaram variações sazonais. Alguns compostos como *trans*-ocimeno e 1,8-cineol foram encontrados somente no verão. Nestas mesmas espécies, a emissão relativa mudou fortemente durante o dia. O linalool aumentou consideravelmente no final do dia, ao contrário de *trans*-ocimeno e do 1,8 cineol, que aumentaram durante o dia, nas condições mais quentes e ensolaradas, e decresceram com os valores de temperatura e radiação fotossinteticamente ativa diurna (Sabillón e Cremades, 2001).

Da mesma maneira que as variações sazonais, mudanças climáticas ao longo de um dia têm causado modificações tanto no teor quanto na composição dos óleos essenciais. Em *L. alba*, os maiores teores de óleo essencial foram obtidos nos horários de colheita de 8, 12, 14 e 18 horas, superiores a 10 e 16 horas (Ehlert et al., 2003), e em *C. citratus* foram observados teores diferenciados de acordo com horário de colheita, mas este horário foi dependente do ambiente, ou seja, plantas crescidas em laboratório, com condições de temperatura e umidade relativa do ar constantes, e no campo, colhidas no mês de março, não apresentaram efeito, o que não foi observado em plantas colhidas em campo no mês de junho. Neste último mês, houve um aumento significativo no teor do óleo essencial às 16 e 20 horas. Estes resultados levam a crer que, em alguns casos, as alterações climáticas diárias são suficientes para alterar o metabolismo dos terpenos (Leal, et al., 2001).

Para algumas espécies, o horário de maior teor muda de acordo com a época do ano, como ocorrido em *C. monspeliensis*, para a qual nos meses de maio, agosto e fevereiro, o teor foi maior às 18 horas. Já no mês de novembro, o teor foi maior às 12 horas (Angelopoulou et al., 2002).

Em outras espécies, o teor de óleo essencial parece não sofrer alteração no período de um dia. Em *Aloysia triphylla* Royle (Verbenaceae), a colheita das folhas às 8, 12 e 18 horas não influenciou o teor de óleo essencial (Silva et al., 2004); em *Hyptis suaveolens* Poit. (Lamiaceae) não foram constatadas alterações no teor do óleo essencial de acordo com os diferentes horários de colheita, sendo iguais nos horários de 8, 12 e 16 horas (Costa et al., 2003); para *V. surinamensis*, o teor de óleo essencial das folhas foi aproximadamente constante ao longo do dia (Lopes et al., 1997).

Quanto à influência da variação diurna na composição dos óleos essenciais, a literatura registra várias ocorrências. O óleo essencial extraído de folhas de *V. surinamensis* apresentou variação circadiana no conteúdo de elemicina e monoterpenos durante a estação chuvosa (Lopes et al., 1997). Ao longo do dia, *L. alba* apresentou variações nos constituintes majoritários do óleo essencial, carvona e limoneno, que atingiram o maior teor às 10 e 16 horas respectivamente, decrescendo ao longo dos horários seguintes e voltando a subir às 18 horas. Porém, a máxima produção para ambas as substâncias foi atingida às 16 horas (Ehlert et al., 2003).

Em *C. monspeliensis* verificou-se que o teor de monoterpenos em maio e agosto foi mais elevado às 18 e 12 horas. Os sesquiterpenos alcançaram seus mais elevados valores às 18 horas em agosto e às 12 em novembro (Angelopoulou et al., 2002); em *Ocimum gratissimum* Forssk. (Lamiaceae), considerável variação foi observada na composição do óleo essencial ao longo do dia, quando o composto majoritário eugenol variou de 98%, às 12 horas, para

11%, às 05 horas. Já para o 1,8 cineol, verificou-se uma variação próxima de zero nas plantas colhidas às 12 hs para 75,5% nas plantas colhidas às 17 hs. Esta diferença foi atribuída à influência da radiação solar na produção deste composto e pode ser um parâmetro para indicar a hora ótima para a colheita da planta (Silva et al., 1999).

Os fatores ambientais poderão também influenciar indiretamente o teor e a composição dos metabólitos especiais através da influência direta no estágio de desenvolvimento dos vegetais. Segundo Pereira et al. (2000), o estágio fisiológico da planta é um fator de grande importância, como demonstrado em *Mikania glomerata*. Em *P. aduncum*, maiores teores do óleo essencial ocorreram na presença de inflorescências, portanto na fase reprodutiva (Ming et al., 2002); em *S. libanotica* ocorreram modificações entre o estágio de crescimento vegetativo e o reprodutivo (pós-florescimento) (Farhat et al., 2001).

Para *M. fruticosa*, o mais baixo teor de óleo essencial na folha ocorreu no florescimento, sendo que este fator influenciou também a composição do óleo essencial (Putievsky et al., 1995); em *A. verlotiorum*, a composição do óleo essencial foi influenciada pela época de florescimento, quando alguns compostos aumentaram e outros reduziram (Cherioconi et al., 2004); Em *J. oxycedrus*, os frutos maduros apresentaram maior teor de óleos essenciais que frutos verdes, assim como as suas composições diferiram (Salido et al., 2002). Em *T. mastichina*, o mais elevado teor de óleo essencial foi isolado no pleno florescimento (2,1%), comparado com a fase vegetativa (0,7%) (Miguel et al., 2004).

O estresse hídrico tem demonstrado exercer grande influência não apenas no acúmulo de fitomassa como também, conseqüentemente, no rendimento e composição dos metabólitos especiais. Plantas de *Mentha x piperita* L. (Lamiaceae) crescidas em solução hidropônica tiveram o teor e

composição do óleo essencial afetados pela duração e o nível do estresse hídrico. Constatou-se que as folhas produzidas por plantas crescidas em elevados níveis de estresse osmótico podem ter levado a uma alta intensidade de glândulas oleíferas como resultado da redução em área foliar, o que pode ter contribuído para elevar o teor de óleo essencial por unidade de folha seca. Os principais constituintes do óleo essencial, mentona e mentol, compondo cerca de 80% do total de monoterpenos, tiveram sua proporção inalterada pelos tratamentos (Charles et al., 1990).

Plantas cultivadas e silvestres de *T. mastichina* foram comparadas quanto ao teor e composição do óleo essencial. Este, em de plantas cultivadas foram encontrados elevados teores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos em comparação com plantas silvestres. Os sesquiterpenos oxigenados também apresentaram comportamento similar, ou seja, plantas cultivadas apresentaram teores bem mais elevados, como os compostos elemol (0,9 e 6,6%, respectivamente para plantas silvestres e cultivadas), T-cadinol (epi- α -cadinol) (1,2 e 4,6%, respectivamente para plantas silvestres e cultivadas) (Miguel et al., 2004). A avaliação da composição do óleo essencial de plantas cultivadas e silvestres de *Atractylodes lancea* DC. (Asteraceae) revelou variações significativas no conteúdo dos componentes após o cultivo. Como exemplo disto, o sesquiterpeno atractilona tendeu a aumentar, enquanto os sesquiterpenos hinesol e β -eudesmol decresceram significativamente com o cultivo (Takeda et al., 1996).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da variação circadiana e sazonal no teor e composição química do óleo essencial de carqueja [(*Baccharis trimera* (Less) D.C.) (Compositae) em populações silvestre e cultivada, estabelecendo um padrão do teor e composição de acordo com os fatores estudados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições gerais

O presente trabalho foi conduzido entre março de 2003 e fevereiro de 2004, no município de Lavras, MG (21°13'40" S e 44°57'50" W GRW).

O estudo foi conduzido em duas áreas, sendo as plantas cultivadas localizadas no campus da Universidade Federal de Lavras/Setor de Plantas Mediciniais, e plantas silvestres estavam localizadas a 20 km das cultivadas, como descrito no capítulo 3, onde também está descrita a caracterização ambiental e condições meteorológicas durante o experimento.

Foram realizadas colheitas mensais durante um ano, nos horários de 6, 12 e 18 horas. O material vegetal coletado foi constituído de toda a parte aérea das plantas, incluindo inflorescências, quando existiam.

2.2 Teor e composição do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido pela técnica de hidrodestilação. As partes aéreas foram colhidas, desidratadas em estufa com circulação forçada à temperatura máxima de 35 °C até massa constante e, no momento da extração, trituradas em moinho. Foram utilizadas amostras de 50 g de fitomassa seca em 500 mL de água destilada. O hidrolato coletado foi lavado com diclorometano, na proporção de ¼ do total obtido, dividido em três vezes. Como dessecante, foi adicionado sulfato de magnésio anidro durante 24 horas, sendo em seguida filtrado e levado ao evaporador rotatório. Após evaporação do solvente a temperatura de 35 °C, o material foi transferido para um frasco de vidro, que foi

deixado em capela em temperatura ambiente para completa evaporação do diclorometano, até peso constante.

As análises químicas foram realizadas em um aparelho de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro quadrupolar de massas (CG-EM), Shimadzu QP5050A (Kyoto, Japão), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo CBP-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme em 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu, Japão), com fluxo de 1 ml.min⁻¹ de Hélio como gás de arraste; aquecimento com temperatura programada (60°C com um gradiente de 3°C.min⁻¹ até 240°C e, em seguida, com um gradiente de 10°C.min⁻¹ até 270°C, mantendo-se uma isoterma de 7 min, com um tempo total de corrida de 70 min). A energia de ionização do detector foi de 70 e V, sendo o volume de injeção da amostra de 0,5 µl diluídas em diclorometano (grau ultra-resíduo, Baker, EUA) e uma razão de injeção de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A análise foi conduzida no modo varredura, a uma velocidade de 1,0 varredura.s⁻¹, com um intervalo de massas de 40-400 *m/z*. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação, automática e manual, dos espectros de massas com os das bibliotecas NIST/EPA/NHI (1998), por comparação dos espectros de massas e Índices de Retenção (IR) com os da literatura (Adams, 1995; 2001) e co-injeção com padrões autênticos. Os Índices de Retenção foram calculados através da co-injeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C₈-C₃₂ (Sigma, EUA), e com aplicação da equação de Dool e Kratz (Dool & Kratz, 1963):

$$IR = 100N [(t_x - t_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})] + 100C_{n-1} ; \text{ onde,}$$

C_n = n^o de carbonos do n-alcano que elui após a substância analisada,

C_{n-1} = n^o de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada,

t_x = tempo de retenção da substância analisada,

t_n = tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância analisada,

t_{n-1} = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância analisada, e

$$N = C_n - C_{n-1}$$

2.3 Análise estatística

O experimento foi constituído de um fatorial 2x3x12, sendo 2 populações, 3 horários de colheita e 12 épocas. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC) com 3 repetições, perfazendo 216 unidades experimentais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de óleo essencial

Entre as populações não ocorreram diferenças no teor de óleo essencial. Quanto às épocas do ano, foram verificados maiores teores nos meses de janeiro e fevereiro, a partir dos quais ocorreram decréscimos contínuos até o mês de outubro, quando se iniciou o acréscimo (Figura 5.1). O período de maior teor de óleo essencial coincidiu com a época de maior crescimento vegetativo, parece ser um reflexo de fatores ambientais (Figura 3.1a, b e c, capítulo 3), principalmente a umidade do solo. Atti-Serafini et al., (2002) trabalhando com *L. Alba*, cultivada no Rio Grande do Sul, também verificaram maior teor de óleo essencial nos meses mais quentes (dezembro a março), comparados aos meses mais frios (junho a agosto).

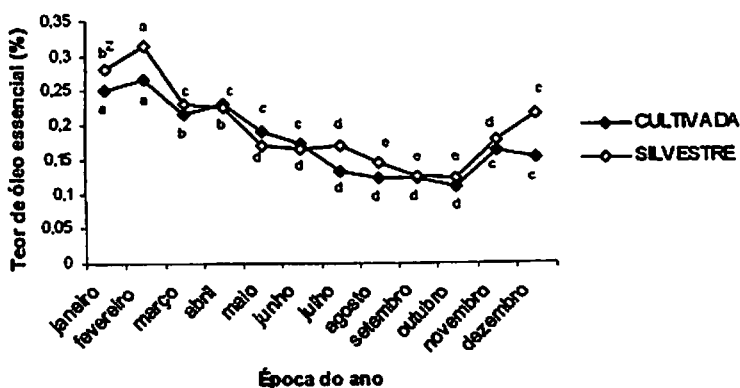


FIGURA 5.1. Teor médio de óleo essencial em plantas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.], cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes épocas do ano. ²Médias seguidas pela mesma letra em cada população não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias sobre horário de colheita. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Após o período de floração, que ocorreu entre os meses de março e julho, as plantas permaneceram em repouso vegetativo, situação que só foi modificada com o início da estação chuvosa no mês de outubro, causando uma elevação no teor de óleo essencial a partir do mês de novembro. O tempo necessário para a *B. trimera* ativar o metabolismo e produzir o óleo essencial após a retomada do período chuvoso e do intenso crescimento vegetativo foi curto, um mês, quando comparado com a *S. rosmarinifolia* (Pala-Paúl et al., 2001). Maiores teores de óleo essencial em *P. aduncum*, também ocorreram na época mais quente e chuvosa; porém, nesta espécie, coincidiu com a fase de florescimento (Ming et al., 2002). Também em *C. monspeliensis*, cultivados na Grécia, o maior teor de óleo essencial ocorreu entre os meses de maio e agosto, durante o florescimento (0,46%), comparados ao estágio pós-florescimento (novembro a fevereiro - 0,05%) (Angelopoulou et al., 2002).

Já outras espécies têm apresentado maiores teores de óleo essencial na época mais seca do ano, como ocorrido para *S. libanotica* (Farhat et al., 2001). Como descrito por Dudai et al. (1986), para *S. officinalis*, no período do florescimento não ocorreram novas regenerações, como brotações. No verão ocorre um grande número de folhas jovens, com elevado teor de óleo essencial. Também neste sentido, Dudai et al. (2001) demonstraram, em seu trabalho com *M. fruticosa*, o efeito indireto das mudanças sazonais no teor de óleo essencial, o que influenciou diretamente o metabolismo dos monoterpenos, o qual foi mais intenso em folhas jovens do que em folhas mais próximas da senescência.

Quanto ao horário de colheita, este não influenciou o teor de óleo essencial, independentemente da época de colheita (Figura 5.2a e b; tabela 5.1). As mudanças climáticas ao longo do dia variam com a estação do ano e com a localidade. Além destes dois fatores, o tipo de tecido e órgão vegetal que está sendo avaliado também pode influenciar a síntese e acúmulo dos óleos essenciais. Como exemplos, o teor de óleo essencial em *C. citratus*, cultivados

na região de Campos dos Goytacazes – RJ, não apresentou variação ao longo do dia em plantas cultivadas em ambiente controlado e a de campo nos meses de fevereiro e março. Por outro lado, para plantas cultivadas no campo e colhidas no mês de julho houve diferença. Estes resultados evidenciam a inexistência de mecanismos endógenos que determinam mudanças no teor de óleo essencial ao longo do ciclo de 24 horas (Leal, et al., 2001).

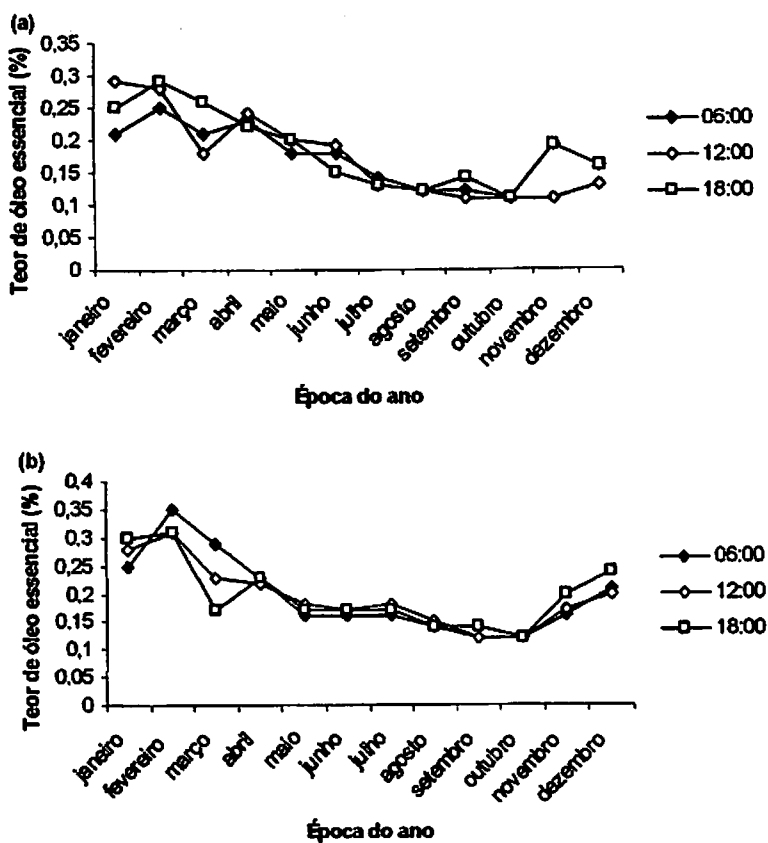


FIGURA 5.2. Teor médio (%) de óleo essencial em populações silvestre (a) e cultivada (b) de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.] colhidas em diferentes épocas e horários. UFLA, Lavras, MG, 2005.

TABELA 5.1. Teor de óleo essencial (%) de plantas de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.] cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes horários e épocas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Época do ano	Plantas					
	Cultivadas			Silvestres		
	Horário de colheita					
	06:00	12:00	18:00	06:00	12:00	18:00
Janeiro	0,21 Ba(a) ^z	0,29 Aa(a)	0,25 Ba(a)	0,25 Aa(b)	0,28 Ba(a)	0,30 Aa(a)
Fevereiro	0,25 Ab(a)	0,28 Aa(a)	0,29 Aa(a)	0,35 Aa(a)	0,31 Aa(a)	0,31 Aa(a)
Março	0,21 Bb(a)	0,18 Ba(b)	0,26 Aa(a)	0,29 Aa(a)	0,23 Ba(b)	0,17 Cb(c)
Abril	0,23 Aa(a)	0,24 Aa(a)	0,22 Aa(b)	0,23 Aa(b)	0,22 Aa(b)	0,23 Aa(b)
Maiο	0,18 Aa(a)	0,19 Aa(b)	0,20 Aa(b)	0,16 Aa(c)	0,18 Aa(c)	0,17 Aa(c)
Junho	0,18 Aa(a)	0,19 Aa(b)	0,15 Aa(c)	0,16 Aa(c)	0,17 Aa(c)	0,17 Aa(c)
Julho	0,14 Aa(b)	0,13 Aa(c)	0,13 Aa(c)	0,16 Aa(c)	0,18 Aa(c)	0,17 Aa(c)
Agosto	0,12 Aa(b)	0,12 Aa(c)	0,12 Aa(c)	0,14 Aa(c)	0,15 Aa(c)	0,14 Aa(c)
Setembro	0,12 Aa(b)	0,11 Aa(c)	0,14 Aa(c)	0,12 Aa(c)	0,12 Aa(c)	0,14 Aa(c)
Outubro	0,11 Aa(b)	0,11 Aa(c)	0,11 Aa(c)	0,12 Aa(c)	0,12 Aa(c)	0,12 Aa(c)
Novembro	0,19 Aa(a)	0,11 Bb(c)	0,19 Aa(b)	0,16 Aa(c)	0,17 Aa(c)	0,20 Aa(c)
Dezembro	0,16 Aa(b)	0,13 Ab(c)	0,16 Ab(c)	0,21 Aa(c)	0,20 Aa(c)	0,24 Aa(b)

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre horário de colheita, minúscula entre populações e entre parêntesis entre época do ano não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.1 e tabela 5.1, plantas colhidas nos quatro primeiros meses do ano, com poucas exceções, apresentaram teores mais elevados de óleo essencial, com uma tendência de superioridade no mês de fevereiro, independentemente da população e do horário de colheita, exceto plantas cultivadas e colhidas às 06 horas.

Quanto à composição do óleo essencial da carqueja, foi constatado que o mesmo é constituído por sesquiterpenos. As porcentagens de hidrocarbonetos

sesquiterpênicos entre os diferentes horários de colheita não diferiram entre si (Tabela 5.2). Verificou-se ainda, em diferentes épocas do ano, uma tendência de valores inferiores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos em plantas cultivadas, comparadas a plantas silvestres. Resultados opostos foram verificados para *T. mastichina*, para a qual plantas cultivadas apresentaram elevados teores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, comparadas a plantas silvestres. Por outro lado, para os sesquiterpenos oxigenados, os resultados foram semelhantes; ambas as espécies apresentaram aumento desta classe em plantas silvestres comparadas a cultivadas (Miguel et al., 2004).

TABELA 5.2. Porcentagem de hidrocarbonetos sesquiterpênicos no óleo essencial em plantas de carqueja [*B. trimeria* (Less) D.C.] cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes horários e épocas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Época do ano	Plantas					
	Cultivadas			Silvestres		
	Horário de colheita					
	06:00	12:00	18:00	06:00	12:00	18:00
Janeiro	79,86 Aa(a) ^z	81,68 Aa(a)	80,94 Aa(a)	85,43 Aa(a)	81,16 Aa(a)	85,91 Aa(a)
Fevereiro	78,34 Ab(a)	79,40 Aa(a)	80,58 Aa(a)	86,36 Aa(a)	89,70 Aa(a)	86,50 Aa(a)
Março	52,19 Aa(b)	57,56 Aa(b)	59,12 Aa(b)	57,98 Aa(b)	57,22 Aa(b)	57,74 Aa(b)
Abril	66,57 Aa(b)	67,65 Aa(a)	70,23 Aa(b)	74,55 Aa(a)	66,77 Aa(b)	66,47 Aa(b)
Mai	59,91 Aa(b)	47,67 Ab(b)	59,45 Aa(b)	63,14 Aa(b)	65,14 Ab(b)	69,07 Aa(b)
Junho	66,29 Aa(b)	65,00 Aa(a)	65,04 Aa(b)	69,04 Aa(b)	72,27 Aa(b)	75,88 Aa(a)
Julho	68,96 Ab(b)	66,37 Aa(a)	68,06 Ab(b)	83,73 Aa(a)	74,88 Aa(a)	83,88 Aa(a)
Agosto	62,45 Ab(b)	73,91 Aa(a)	66,68 Ab(b)	80,51 Aa(a)	78,31 Aa(a)	81,89 Aa(a)
Setembro	72,27 Aa(a)	71,29 Aa(a)	71,10 Ab(b)	75,84 Aa(a)	83,07 Aa(a)	87,05 Aa(a)
Outubro	73,23 Aa(a)	74,79 Aa(a)	68,39 Ab(b)	84,78 Aa(a)	77,92 Aa(a)	84,96 Aa(a)
Novembro	81,46 Aa(a)	72,04 Ab(a)	77,90 Aa(a)	82,19 Aa(a)	86,55 Aa(a)	80,56 Aa(a)
Dezembro	73,36Aa(a)	69,90 Ab(a)	75,43 Aa(a)	81,50 Aa(a)	87,26 Aa(a)	81,71 Aa(a)

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre horário de colheita, minúscula entre populações e entre parêntesis entre época do ano não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Nota-se uma tendência de maiores teores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos na fase vegetativa, que coincidiu com o período mais quente do ano. Em *T. vulgaris*, o teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos foi maior na época mais fria do ano (Hudaib et al., 2002).

Ao longo do ano, maiores teores de sesquiterpenos oxigenados foram constatados entre os meses de março e agosto, dependendo da população e do horário de coleta (Tabela 5.3). Grande parte dos sesquiterpenos oxigenados aumentaram seus teores no estágio de florescimento (nas populações cultivadas, com predomínio maior de maio a agosto, e nas silvestres, de março a junho). O horário de colheita não exerceu influência na porcentagem de sesquiterpenos oxigenados, exceto em plantas silvestres colhidas no mês de abril, às 6 e 12 horas, que proporcionaram teores inferiores aos obtidos às 18 hs. As diferenças entre populações foram mínimas e ocorreram em pontos isolados na população silvestre.

Foi constatado predomínio de hidrocarbonetos sesquiterpênicos no óleo essencial, com média de 74,17%; dentre eles o germacreno D (20,46%) (Figura 5.3); biciclogermacreno (18,47%) e (E)-cariofileno (16,35%), como constituintes majoritários, além de (20,46%); δ -cadineno (5,74%); γ -muuroleno (3,15%); α -guaiano (2,54%); α -humuleno (1,64%); α -copaeno (1,39%); guaiano (1,04%), α -muuruleno (1,00%); α -bulneceno (0,89%); β -selineno (0,76%); β -elemeno (0,51%); γ -cadineno (0,48%); γ -gurjuneno (0,40%); α -gurjuneno (0,38%); germacreno B (0,35%); β -cubebeno (0,06%) e α -calacoreno (0,007%), como constituintes minoritários.

TABELA 5.3. Porcentagem de sesquiterpenos oxigenados no óleo essencial em plantas de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.] cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes horários e épocas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Época do ano	Plantas					
	Cultivadas			Silvestres		
	Horário de colheita					
	06:00	12:00	18:00	06:00	12:00	18:00
Janeiro	19,44 Aa(b) ²	17,83 Aa(b)	18,37 Aa(b)	14,11 Aa(b)	14,43 Aa(b)	12,72 Aa(c)
Fevereiro	20,87 Aa(b)	20,22 Aa(b)	19,41 Aa(b)	12,29 Aa(b)	9,57 Aa(b)	12,38 Aa(c)
Março	46,76 Aa(a)	39,75 Aa(a)	40,09 Aa(a)	40,42 Aa(a)	41,24 Aa(a)	38,52 Aa(b)
Abril	28,83 Aa(b)	27,31 Aa(b)	25,93 Ab(b)	21,92 Ba(b)	31,16 Ba(a)	49,55 Aa(a)
Maiο	37,12 Aa(a)	49,34 Aa(a)	36,70 Aa(a)	34,50 Aa(a)	31,12 Ab(a)	30,47 Aa(b)
Junho	33,40 Aa(a)	34,69 Aa(a)	34,30 Aa(a)	27,29 Aa(a)	24,11 Aa(b)	23,43 Aa(c)
Julho	30,70 Aa(b)	29,51 Aa(a)	31,62 Aa(a)	15,34 Ab(b)	22,86 Aa(b)	15,47 Ab(c)
Agosto	33,78 Aa(a)	26,08 Aa(a)	33,32 Aa(a)	19,21 Ab(b)	21,54 Aa(b)	16,55 Ab(c)
Setembro	27,26 Aa(b)	28,15 Aa(b)	28,19 Aa(b)	23,39 Aa(b)	15,42 Aa(b)	12,31 Ab(c)
Outubro	26,38 Aa(b)	24,79 Aa(b)	24,43 Aa(b)	14,28 Aa(b)	19,74 Aa(b)	14,58 Aa(c)
Novembro	24,01 Aa(b)	27,96 Aa(b)	21,93 Aa(b)	16,12 Aa(b)	13,29 Ab(b)	19,44 Aa(c)
Dezembro	26,58Aa(b)	29,43 Aa(b)	24,20 Aa(b)	17,55 Aa(b)	12,16 Ab(b)	17,98 Aa(c)

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre horário de colheita, minúscula entre populações e entre parêntesis entre época do ano não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

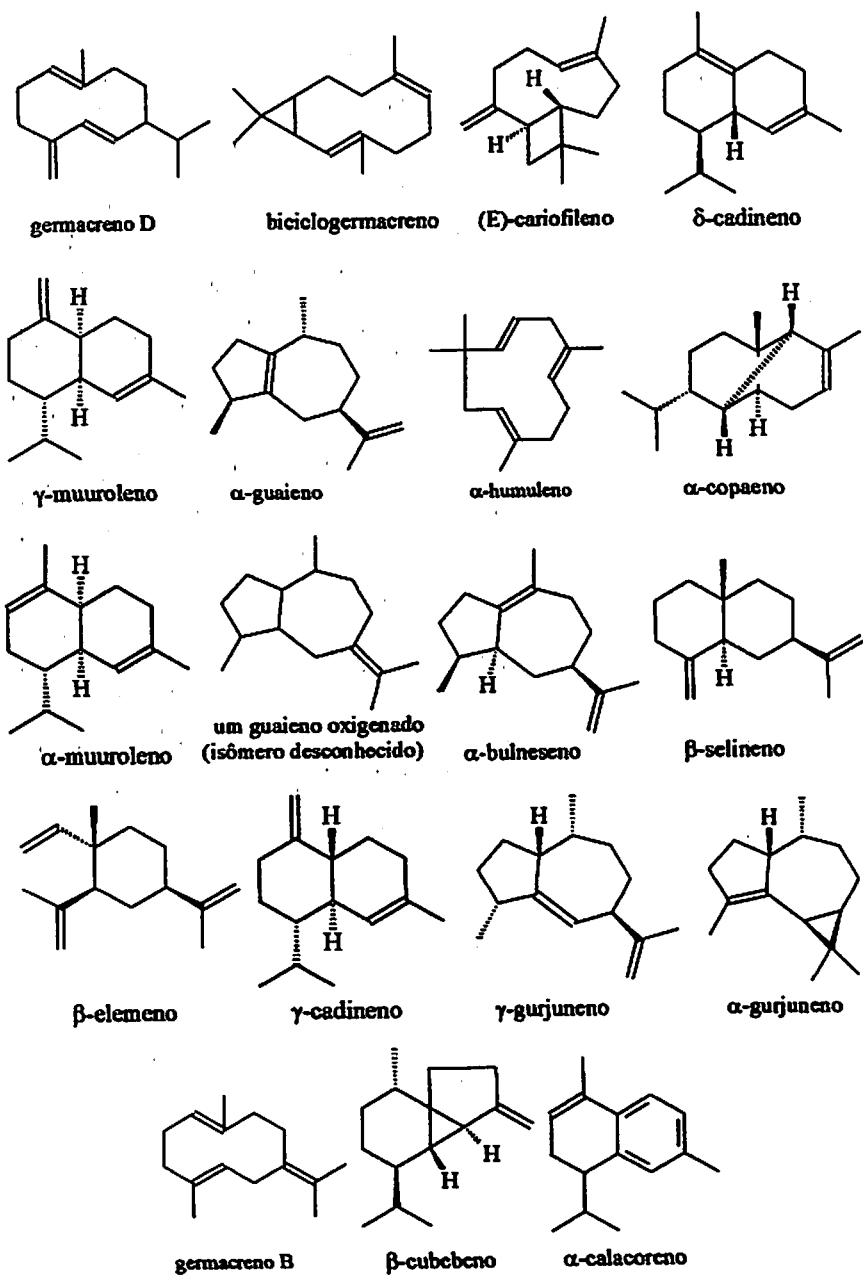


FIGURA 5.3. Componentes hidrocarbonetos sesquiterpênicos dos óleos essenciais de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.], determinados por CG/EM. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Os sesquiterpenos oxigenados apresentaram teores médios de 23,25% do óleo essencial. O composto majoritário foi o ledol (8,76%) (Figura 5.4), seguido por globulol (5,43%), espatulenol (4,98%), guaiol (2,22%), viridiflorol (1,77%), *epi- α -cadinol* (0,33%) e eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol (0,25%). Os compostos desta classe também não apresentaram variações nos teores entre os horários de colheita (Tabela 5.4). Diferindo dos resultados encontrados para a carqueja, em *C. monspeliensis* o teor de sesquiterpenos apresentou diferenças entre os horários de colheita dependendo da época do ano (Angelopoulou et al., 2002).

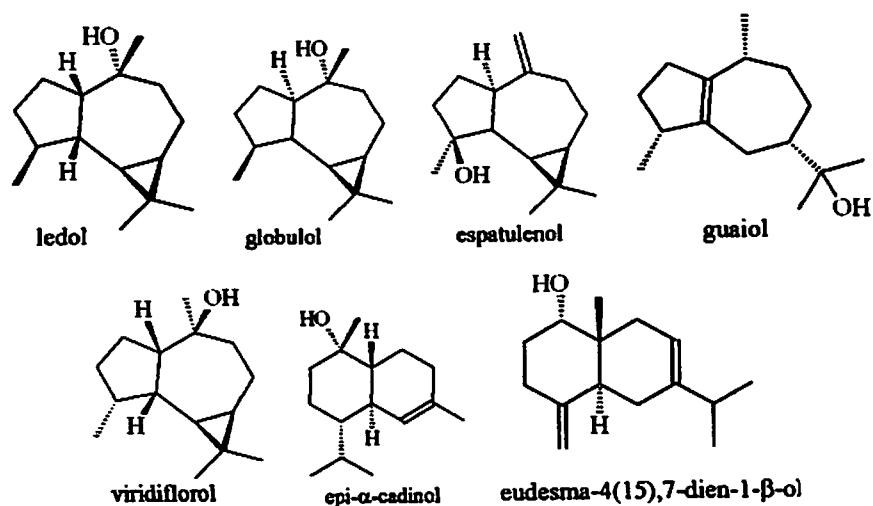


FIGURA 5.4. Componentes sesquiterpenos oxigenados dos óleos essenciais de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.], determinados por CG/EM. UFLA, Lavras, MG, 2005.

TABELA 5.4. Teores médios (%) dos sesquiterpenos oxigenados (SO) no óleo essencial em plantas de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.] cultivadas e silvestres, coletadas em diferentes horários e épocas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Composto (%)	Plantas					
	Cultivadas			Silvestres		
	Horário de coleta					
	06:00	12:00	18:00	06:00	12:00	18:00
Ledol	10,53 Aa ^z	10,56 Aa	11,02 Aa	6,37 Ab	6,08 Ab	5,03 Ab
Globulol	6,26 Aa	5,96 Aa	5,33 Aa	4,79 Ab	5,39 Aa	4,87 Aa
Espatulanol	5,49 Aa	5,81 Aa	4,96 Aa	4,33 Ab	4,46 Ab	4,85 Aa
Guaiol	2,89 Aa	2,62 Aa	2,81 Aa	1,87 Ab	1,63 Ab	1,47 Ab
Viridiflorol	1,81 Aa	1,91 Aa	1,16 Ab	1,78 Aa	1,76 Aa	2,21 Aa
<i>Epi-α</i> -Cadinol	0,29 Aa	0,28 Aa	0,34 Aa	0,20 Aa	0,31 Aa	0,58 Aa
Eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol	0,29 Aa	0,35 Aa	0,25 Aa	0,21 Aa	0,16 Aa	0,22 Aa
Total SO	27,56 Aa	27,49 Aa	25,87 Aa	19,55 Ab	19,79 Ab	19,23 Ab

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre horário de coleta e minúscula entre populações não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Nota-se que o horário de colheita não exerceu influência em nenhum dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Tabela 5.5). Dos três principais hidrocarbonetos sesquiterpênicos, dois se apresentaram em menor concentração em plantas cultivadas: germacreno D e o (E)-cariofileno. Além destes, α -humuleno foi inferior em plantas cultivadas independentemente do horário de colheita; α -bulneceno e β -salineno, coletados às 12 hs, também foram inferiores em plantas cultivadas. Apenas os compostos γ -gurjuneno e α -gurjuneno foram inferiores na população silvestre, o primeiro nos horários de 12 e 18 hs e o segundo nos três horários de colheita.

TABELA 5.5. Teores médios (%) dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (HS) no óleo essencial em plantas de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.] cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes horários e épocas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Composto (%)	Plantas					
	Cultivadas			Silvestres		
	Horário de colheita					
	06:00	12:00	18:00	06:00	12:00	18:00
Germacreno D	19,27 Ab ^z	19,01 Ab	18,87 Ab	22,39 Aa	21,96 Aa	21,23 Aa
Biciclogermacreno	17,98 Aa	17,56 Aa	17,77 Aa	18,97 Aa	18,80 Aa	19,75 Aa
(E)-Cariofileno	15,01 Ab	14,67 Ab	14,85 Ab	17,80 Aa	17,72 Aa	18,07 Aa
δ-Cadineno	5,51 Aa	5,69 Aa	5,15 Aa	6,24 Aa	6,09 Aa	5,74 Aa
γ- Muuroleno	1,73 Aa	1,66 Aa	1,62 Aa	1,80 Aa	1,82 Aa	1,65 Aa
α- Guaieno	2,46 Aa	2,57 Aa	2,4 Aa	2,58 Aa	2,52 Aa	2,71 Aa
α- Humuleno	1,52 Ab	1,45 Ab	1,46 Ab	1,78 Aa	1,83 Aa	1,81 Aa
α- Copaeno	1,43 Aa	1,46 Aa	1,30 Aa	1,32 Aa	1,45 Aa	1,37 Aa
α- Muuruleno	1,00 Aa	1,04 Aa	0,91 Aa	1,06 Aa	1,06 Aa	0,94 Aa
Guaieno	1,45 Aa	1,48 Aa	1,32 Ab	1,58 Aa	0,16 Aa	0,22 A
α- Bulneceno	0,88 Aa	0,77 Ab	0,82 Aa	0,92 Aa	0,96 Aa	0,98 Aa
β- Selineno	0,84 Aa	0,66 Ab	0,76 Aa	0,83 Aa	0,85 Aa	0,63 Aa
β- Elemeno	0,46 Aa	0,45 Aa	0,54 Aa	0,52 Aa	0,49 Aa	0,62 Aa
γ-Cadineno	0,36 Aa	0,54 Aa	0,44 Aa	0,46 Aa	0,51 Aa	0,59 Aa
γ- Gurjuneno	0,49 Aa	0,82 Aa	0,52 Aa	0,18 Aa	0,22 Ab	0,18 Ab
α- Gurjuneno	0,56 Aa	0,53 Aa	0,62 Aa	0,19 Ab	0,18 Ab	0,17 Ab
Germacreno B	0,13 Aa	0,65 Aa	0,07 Aa	0,29 Aa	0,33 Aa	0,60 Aa
β- Cubebeno	0,03 Aa	0,04 Aa	0,07 Aa	0,02 Aa	0,11 Aa	0,1 Aa
α-Calacoreno	0,0008 Aa	0,0008 Aa	0 Aa	0,02 Aa	0,02 Aa	0,0008 Aa
Total HS	71,11 Ab	71,05 Ab	69,49 Ab	78,95 Aa	77,08 Aa	77,36 Aa

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre horário de colheita e minúscula entre populações não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias sobre época do ano.

Dentre os sesquiterpenos oxigenados, o teor do componente majoritário, ledol, foi inferior em plantas silvestres, independentemente do horário de colheita. Globulol foi inferior em plantas silvestres coletadas às 6 horas. Espatuleno foi inferior nestas plantas, colhidas às 6 e 12 horas, e o composto Guaiol foi inferior em plantas silvestres, independentemente do horário de colheita. Apenas os compostos viridiflorol e guaieno se apresentaram inferiores em plantas cultivadas, no horário de colheita de 18 horas.

Com relação às variações entre as populações, os componentes hidrocarbonetos sesquiterpênicos germacreno-D, α -guaieno, γ -gurjuneno, Amuuruleno, β -selineno, α -bulneceno, γ -cadieno, δ -cadineno, α -copaeno, β -elemeno, germacreno B e γ -muuroleno praticamente não apresentaram diferenças (Tabela 5.6). Os compostos β -cubebeno e α -calacoreno, mesmo se apresentando em apenas alguns meses do ano, não diferiram entre as populações. Já o α -humuleno, biciclogermacreno e o (E)-cariofileno apareceram em algumas épocas do ano, com menores teores em plantas cultivadas. O composto α -gurjuneno se mostrou inferior em plantas silvestres em oito meses do ano.

TABELA 5.6. Teores médios (%) dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos no óleo essencial de plantas de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.] cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes épocas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Germacreno D (%)												
Cultivada	24,66 Aa ²	24,56 Aa	7,67 Da	12,37 Ca	6,27 Db	17,83 Ba	22,43 Ab	19,98 Bb	25,01 Aa	25,61 Aa	22,29 Aa	19,93 Ba
Silvestre	24,00 Ba	26,55 Aa	8,85 Ca	11,84 Ca	12,52 Ca	19,79 Ba	27,18 Aa	26,56 Aa	28,20 Aa	27,49 Aa	26,44 Aa	22,91 Ba
Biclogermacreno (%)												
Cultivada	22,86 Aa	22,61 Aa	14,27 Ba	13,76 Ba	11,81 Ba	19,87Aa	17,05 Bb	24,01 Aa	16,23 Bb	15,13 Bb	14,76 Bb	20,91 Aa
Silvestre	19,67 Aa	21,94 Aa	14,48 Ba	14,77 Ba	13,15 Ba	16,93 Ba	23,30 Aa	23,22 Aa	21,26 Aa	21,90 Aa	20,12 Aa	19,31 Aa
(E)-cariofileno (%)												
Cultivada	16,19 Ab	16,76 Ab	16,07 Aa	15,96 Aa	16,59 Aa	13,60 Bb	12,63 Bb	12,18 Bb	14,11 Ba	13,97 Ba	14,20 Ba	15,86 Ab
Silvestre	21,03 Aa	19,91 Aa	15,92 Ba	15,76 Ba	18,94 Aa	19,23 Aa	16,86 Ba	16,72 Ba	16,79 Ba	16,18 Ba	16,66 Ba	20,37 Aa
δ-Cadineno (%)												
Cultivada	5,47 Aa	4,16 Ba	5,81 Aa	8,70 Aa	5,94 Aa	3,80 Ba	5,10 Ba	3,03 Ba	6,41 Aa	6,08 Aa	6,15 Aa	4,73 Bb
Silvestre	6,18 Aa	6,34 Aa	6,05 Aa	5,22 Ab	6,78 Aa	5,11 Aa	5,00 Aa	4,52 Aa	5,99 Aa	6,38 Aa	7,44 Aa	7,26 Aa
γ-muroleno (%)												
Cultivada	1,57 Ca	1,42 Ca	2,07 Ca	3,79 Aa	2,48 Ba	1,14 Ca	1,20 Ca	0,85 Ca	1,26 Ca	1,24 Ca	1,59 Ca	1,43 Cb
Silvestre	2,16 Ba	1,97 Ba	2,00 Ba	2,95 Ab	2,58 Aa	1,36 Ca	0,97 Ca	1,03 Ca	1,22 Ca	1,24 Ca	1,42 Ca	2,13 Ba
α-gualeno (%)												
Cultivada	2,41 Ba	2,36 Ba	3,42 Aa	3,66 Aa	3,65 Aa	2,42 Ba	1,85 Ca	1,94 Ca	1,68 Ca	1,55 Ca	2,24 Ba	2,53 Ba
Silvestre	2,62 Ca	2,95 Ba	3,32 Aa	3,76 Aa	2,83 Bb	2,52 Ca	1,89 Ba	1,97 Ba	1,86 Da	2,12 Da	2,44 Ca	2,94 Ba
α-humuleno (%)												
Cultivada	1,44 Bb	1,43 Bb	1,77 Aa	1,93 Aa	1,62 Ab	1,31 Bb	1,40 Ba	1,24 Bb	1,40 Ba	1,55 Bb	1,21 Bb	1,44 Bb
Silvestre	1,90 Aa	1,80 Ba	1,96 Aa	1,78 Ba	1,94 Aa	1,74 Ba	1,57 Ba	1,61 Ba	1,62 Ba	1,90 Aa	1,77 Ba	2,08 Aa

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias sobre horário de colheita.

“...Continua”

“TABELA 5.6. Continuação”

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
α-copaeno (%)												
Cultivada	1,33 Ba	1,14 Ba	1,26 Ba	2,40 Aa	2,03 Aa	0,56 Ca	1,57 Aa	0,50 Ca	1,42 Ba	1,99 Aa	1,60 Aa	0,99 Ba
Silvestre	1,70 Aa	1,29 Aa	1,19 Aa	1,36 Ab	1,74 Aa	1,23 Aa	0,97 Aa	0,93 Aa	1,32 Aa	1,53 Aa	1,67 Aa	1,64 Aa
α-muuruleno (%)												
Cultivada	1,01 Ba	0,88 Ba	1,07 Ba	2,07 Aa	1,69 Aa	0,48 Bb	0,80 Ba	0,45 Ba	0,78 Ba	0,86 Ba	0,82 Ba	0,90 Ba
Silvestre	1,32 Aa	1,11 Ba	1,02 Ba	1,45 Ab	1,53 Aa	0,92 Ba	0,52 Ba	0,68 Ba	0,88 Ba	0,71 Ba	1,05 Ba	1,06 Ba
Gualeno (%)												
Cultivada	1,10 Ba	1,00 Ba	2,39 Aa	2,88 Ab	2,74 Aa	0,99 Ba	0,76 Ba	0,84 Ba	1,16 Ba	0,95 Ba	0,99 Ba	1,22 Ba
Silvestre	1,59 Ba	1,41 Ba	2,48 Ba	4,74 Aa	2,28 Ba	1,12 Ba	1,29 Ba	0,90 Ba	1,00 Ba	1,52 Ba	1,65 Ba	1,35 Ba
α-bulneceno (%)												
Cultivada	1,01 Aa	1,02 Aa	0,43 Ba	0,34 Ba	0,10 Bb	1,18 Aa	0,92 Aa	1,18 Aa	0,99 Aa	1,11 Aa	0,73 Ab	0,86 Aa
Silvestre	1,06 Aa	1,06 Aa	0,39 Ba	0,46 Ba	0,45 Ba	1,18 Aa	0,95 Aa	1,33 Aa	1,19 Aa	1,30 Aa	1,13 Aa	0,92 Aa
β-selineno (%)												
Cultivada	0,75 Ba	0,74 Ba	1,20 Aa	1,30 Aa	1,08 Aa	0,62 Ba	0,0022 Cb	0,52 Ba	0,57 Ba	0,41 Ba	0,90 Aa	0,93 Aa
Silvestre	0,79 Ba	0,77 Ba	1,26 Aa	1,11 Aa	0,86 Ba	0,85 Ba	0,41 Ca	0,49 Ca	0,60 Ca	0,67 Ca	0,76 Ba	0,91 Ba
β-elemeno (%)												
Cultivada	0,77 Ca	0,36 Ca	0,008 Ca	0,99 Ca	0,14 Ca	0,86 Ba	0,62 Ba	0,60 Ba	0,81 Ba	1,18 Aa	0,37 Cb	0,57 Ba
Silvestre	0,21 Ca	0,54 Ba	0,009 Ca	0,009 Ca	0,44 Ba	0,62 Ba	0,74 Aa	0,59 Ba	0,63 Ba	0,81 Ab	1,10 Aa	0,81 Aa
γ-cadieno (%)												
Cultivada	0,48 Aa	0,28 Ba	0,76 Aa	1,28 Aa	1,02 Aa	0,002 Ba	0,72 Aa	0 Ba	0 Ba	0,08 Ba	0,31 Ba	0,43 Ba
Silvestre	0,85 Aa	0,77 Aa	0,77 Aa	1,30 Aa	0,87 Aa	0,14 Ba	0,002 Bb	0,05 Ba	0,25 Ba	0,07 Ba	0,54 Aa	0,64 Aa

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias sobre horário de colheita.

“...Continua...”

“TABELA 5.6. Continuação”

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
γ- gurjuneno (%)												
Cultivada	0,55 Aa	0,60 Aa	0,27 Aa	0,11 Aa	0,94 Aa	0,86 Aa	0,69 Aa	0,58 Aa	0,37 Aa	0,54 Aa	1,05 Aa	0,73 Aa
Silvestre	0,08 Aa	0,07 Aa	0,10 Aa	0 Aa	0,92 Aa	0,30 Aa	0,001 Ab	0,16 Aa	0,001 Aa	0 Aa	0,46 Aa	0,27 Aa
α- gurjuneno (%)												
Cultivada	0,59 Aa	0,94 Aa	0,24 Ba	0,25 Ba	0,31 Ba	0,90 Aa	0,69 Aa	0,63 Aa	0,51 Aa	0,59 Aa	0,54 Aa	0,66 Aa
Silvestre	0,24 Ab	0,18 Ab	0,15 Aa	0,11 Aa	0,23 Aa	0,47 Ab	0,20 Ab	0,31 Aa	0,37 Ab	0,11 Ab	0 Ab	0,25 Ab
Germacreno B (%)												
Cultivada	0,23 Ba	0,18 Ba	0,001 Ba	0,002 Ba	0,15 Ba	0,06 Ba	2,19 Aa	0,28 Ba	0,06 Ba	0,001 Ba	0,18 Ba	0,05 Ba
Silvestre	0,30 Aa	0,36 Aa	0,006 Aa	1,15 Aa	0,31 Aa	0,27 Aa	0,16 Ab	0,64 Aa	0,36 Aa	0,28 Aa	0,53 Aa	0,52 Aa
β- cubebeno (%)												
Cultivada	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0,22 Aa	0 Ba	0 Ba	0,13 Aa	0 Ba	0 Ba	0,24 Aa	0 Ba	0 Ba
Silvestre	0,06 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Bb	0 Ba	0 Ba	0,26 Aa	0,006 Ba	0,13 Aa	0,25 Aa	0,14 Aa	0 Ba
α-calacoreno (%)												
Cultivada	0 Aa	0 Aa	0,003 Ab	0,001 Aa	0 Aa	0 Aa	0,002 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
Silvestre	0,001 Ba	0 Ba	0,16 Aa	0,001 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba
Total Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos (%)												
Cultivada	81,93 Aa	80,44 Ab	58,68 Ca	71,03 Ba	58,42 Cb	66,43 Ba	68,55 Bb	68,52 Bb	72,71 Bb	73,09 Bb	78,13 Aa	74,11 Bb
Silvestre	85,76 Aa	88,93 Aa	60,12 Ca	74,00 Ba	68,06 Ba	73,52 Ba	82,12 Aa	81,14 Aa	82,94 Aa	85,08 Aa	84,75 Aa	84,84 Aa

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias sobre horário de colheita.

A respeito das variações entre épocas do ano, resguardado algumas alterações pontuais entre as populações, os componentes γ -muuroleno, α -guaiano, β -selineno, γ -cadineno α -humuleno e α -muuruleno apresentaram uma tendência de maior teor entre os meses de março e maio, coincidindo com o período de floração. Por outro lado, germacreno D e α -bulneceno apresentaram, neste mesmo período, resultados inversos. Germacreno D apresentou os menores teores por ocasião do florescimento. Ao contrário do ocorrido em *L. Alba*, constatado por Castro et al. (2002), no presente trabalho não foi observada associação qualitativa do teor deste componente com a temperatura, mas sim com o estágio fisiológico.

Os compostos γ gurjuneno, α -gurjuneno e germacreno B, com poucas exceções, se mostraram estáveis ao longo do ano.

Quanto aos compostos δ -cadineno e α -copaeno, estes não apresentaram diferenças ao longo dos meses em plantas silvestres, o que não ocorreu em plantas cultivadas. Para o β -elemeno, os maiores teores foram alcançados nos meses de outubro, novembro, dezembro e julho. Foram encontradas maiores concentrações de Bicyclogermacreno e (E)-cariofileno em ambas as populações, nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. Além destes meses, cada população apresentou outros pontos de máximo acúmulo. Observações semelhantes também foram observadas para o composto (E)-cariofileno.

Os compostos globulol, *epi*- α -cadinol, guaieno, eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol e viridiflorol foram iguais entre as populações (Tabela 5.7). Para espatulenol, ledol e guaiol ocorreram diferenças em alguns meses entre as populações com menor teor na população silvestre.

TABELA 5.7. Teores médios (%) dos sesquiterpenos oxigenados no óleo essencial de plantas de carqueja [*B. trimera* (Less) D.C.] cultivadas e silvestres, colhidas em diferentes épocas do ano. UFLA, Lavras, MG, 2005.

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Ledol (%)												
Cultivada	7,50 Ba	10,16 Aa	11,60 Aa	4,19 Ba	9,70 Aa	16,33 Aa	11,47 Aa	12,74 Aa	11,38 Aa	12,15 Aa	9,61 Aa	11,58 Aa
Silvestre	2,89 Ba	2,82 Ba	9,61 Aa	3,62 Ba	9,33 Aa	8,56 Ab	5,85 Bb	7,17 Ab	4,84 Bb	6,09 Bb	4,40 Bb	4,10 Bb
Globulol (%)												
Cultivada	3,77 Da	3,09 Da	8,25 Ba	8,55 Ba	11,23 Aa	4,76 Ca	5,79 Ca	6,17 Ca	6,24 Ca	5,00 Ca	3,00 Da	4,73 Ca
Silvestre	4,21 Ba	2,93 Ba	8,76 Aa	8,92 Aa	6,94 Ab	5,12 Ba	4,04 Ba	3,80 Ba	4,34 Ba	3,73 Ba	3,58 Ba	3,86 Ba
Espatulenol (%)												
Cultivada	2,55 Da	1,78 Da	11,71 Aa	5,17 Ca	9,35 Ba	6,56 Ca	6,43 Ca	6,34 Ca	5,06 Ca	3,11 Da	2,96 Da	4,00 Da
Silvestre	3,02 Ca	1,21 Ca	12,14 Aa	6,64 Ba	7,07 Bb	6,44 Ba	3,48 Cb	3,71 Cb	3,25 Ca	2,05 Ca	2,46 Ca	3,07 Ca
Gualol (%)												
Cultivada	2,21 Ba	2,49 Ba	3,50 Aa	3,47 Ba	3,80 Aa	3,48 Aa	1,91 Ba	2,82 Ba	2,43 Ba	2,57 Ba	2,65 Ba	2,96 Ba
Silvestre	0,90 Bb	0,88 Bb	3,25 Aa	3,03 Aa	2,71 Aa	1,71 Bb	1,42 Ba	1,52 Bb	1,18 Bb	0,77 Bb	1,51 Ba	1,02 Bb
Viridiflorol (%)												
Cultivada	1,44 Ba	1,33 Ba	3,50 Aa	3,51 Aa	3,60 Aa	1,49 Ba	1,54 Ba	1,45 Ba	0,74 Ca	0,54 Ca	0,67 Ca	1,71 Ba
Silvestre	2,00 Ca	1,64 Ca	2,88 Ba	4,30 Aa	2,63 Bb	1,39 Ca	1,31 Ca	1,11 Ca	1,47 Ca	1,24 Ca	1,36 Ca	1,65 Ca

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias sobre horário de colheita.

“...Continua...”

“TABELA 5.7. Continuação”

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<i>Epi-α-cadinol (%)</i>												
Cultivada	0,001 Aa	0 Aa	1,02 Aa	0,30 Ab	0,48 Aa	0,45 Aa	0,44 Aa	0,29 Aa	0,16 Aa	0,06 Aa	0 Aa	0,42 Aa
Silvestre	0,002 Ba	0,41 Ba	0,94 Aa	1,51 Aa	0,08 Ba	0,33 Ba	0,34 Ba	0,18 Ba	0,06 Ba	0 Ba	0,27 Ba	0,26 Ba
<i>Eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol (%)</i>												
Cultivada	0,37 Ba	0,32 Ba	0,23 Ba	0,29 Ba	0,002 Ba	0,002 Ba	0,08 Ba	0,12 Ba	0,63 Aa	0,81 Aa	0,66 Aa	0,07 Ba
Silvestre	0,15 Ba	0,12 Ba	0,003 Ba	0,31 Aa	0,08 Ba	0,001 Ba	0,002 Ba	0,07 Ba	0,54 Aa	0,52 Aa	0,52 Aa	0,06 Aa
<i>Total Sesquiterpenos Oxigenados (%)</i>												
Cultivada	17,45 Da	19,17 Da	39,81 Aa	24,48 Ca	38,31 Aa	33,14 Ba	29,85 Ca	30,22 Ca	26,71 Ca	24,25 Ca	23,64 Ca	25,52 Ca
Silvestre	13,12 Ca	10,01 Cb	37,58 Aa	23,09 Ba	29,75 Bb	23,82 Bb	16,60 Cb	18,20 Cb	16,04 Cb	14,68 Cb	14,63 Cb	14,54 Cb

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Médias sobre horário de colheita.

O composto ledol ocorreu, em plantas cultivadas, de maneira homogênea entre os meses, o que não foi observado nas plantas silvestres, nas quais mostrou teores menores em grande parte do ano. Já para o globulol, maiores flutuações ocorreram nas plantas cultivadas. O espatulenol variou em ambas populações, atingindo o máximo teor no mês de março, início do florescimento. Este composto também foi isolado em *B. linearis* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae), porém da cera epicuticular e foi descrito como altamente tóxico, impedindo o ataque de herbívoros e microorganismos (Faini et al., 1999). Sem ignorar raras exceções, pode-se observar, em plantas silvestres e cultivadas, que os maiores teores dos SO ocorreram entre os meses de março e maio.

4 CONCLUSÕES

- a) O período de maior teor de óleo essencial coincidiu com a época de maior crescimento vegetativo;
- b) Durante o período reprodutivo e três meses após (março a outubro), as plantas apresentaram o menor teor de óleo essencial;
- c) O horário de colheita e as populações não influenciaram o teor de óleo essencial;
- d) Constatou-se que quanto à composição química, o óleo essencial da carqueja é constituído por sesquiterpenos, sendo a maior parte hidrocarbonetos sesquiterpênicos e a menor sesquiterpenos oxigenados;
- e) As porcentagens de sesquiterpenos hidrocarbonetos entre os diferentes horários de colheita não diferiram entre si;
- f) Independentemente do horário e época de colheita, as plantas cultivadas possuem valores inferiores de sesquiterpenos hidrocarbonetos em relação aos observados em plantas silvestres;
- g) Maiores teores de sesquiterpenos oxigenados foram constatados entre os meses de março e agosto, dependendo da população e do horário de coleta;
- h) As diferenças no teor de sesquiterpenos oxigenados entre populações foram mínimas e ocorreram em pontos isolados na população silvestre

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy**. Allured, Illinois, 1995. 456 p.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v. 30, n. 3, p. 189-203, mar. 2002.

ASSAD, Y. O. H.; TORTO, B.; HASSANALI, A.; NJAGI, P. G. N.; BASHIR, N. H. H.; MAHAMAT, H. Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 833-841, May 1997.

ATTI-SERAFINI, L.; PANSERA, M. R.; ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; PAROUL, N.; MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown in southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 72-74, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. **Normas climatológicas – 1960-1991**. Brasília, 1992. 84 p.

CHARLES, D. J.; JOLY, R. J.; SIMON, J. Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2837-2840, Sept. 1990.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Br. em diferentes

épocas de colheita e partes do ramo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 75-79, 2002.

CHERIOCONI, S.; FLAMINI, G.; CAMPEOL, E.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochemical Systematics and Ecology*, London, v. 32, n. 4, p. 423-429, Apr. 2004.

COSTA, A. G.; SILVA-MANN, R.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; FILHO, L. G. S.; FILHO, J. L. S. C.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, M. F.; DANTAS, I. B.; AZEVEDO, V. G.; MENDONÇA, M. C.; BLANK, A. F. Influência do horário de colheita e de secagem na produção de óleo essencial de sambacaitá (*Hyptis pectinata* L. Poit). CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43., 2003, Recife. Resumos... Brasília: SOB, 2003b.

COUTO, H. A. R.; SILVA, A. C. M.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Estudo sazonal da produção de óleo essencial de pau-rosa e de espécimens identificados como suas variedades morfológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43., 2003, Recife. Resumos... Brasília: SOB, 2003.

DOOL, D. H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography, *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, 1963.

DUDAI, N.; LARKOV, O.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; LEWINSOHN, E. Developmental control of monoterpene content and composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. *Annals of Botany*, London, v. 88, n. 3, p. 349-354, Sept. 2001.

EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; FERNANDES, D. M.; FERRI, A. F.; ROCHA, W. A. T.; MEIRELES, M. A. A. Efeito do horário de colheita sobre a carvona e o limoneno de óleo essencial de erva-cidreira brasileira. Internet: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43., 2003, Recife. Resumos... Brasília: SOB, 2003.

FAINI, F.; LABBE, C.; COLL, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 27, n. 7, p. 673-679, Oct. 1999.

FARHAT, G. N.; AFFARA, N. I.; GALI-MUHTASIB, H. U.; Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of east mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. *Toxicon*, Oxford, v. 39, n. 10, p. 1601-1605, Oct. 2001.

HAKOLA, H.; TARVAINEN, V.; LAURILA, T.; HILTUNEN, V.; HELLÉN, H.; KERONEN, P. Seasonal variation of VOC concentrations above a boreal coniferous forest. *Atmospheric Environment*, Oxford, v. 37, n. 12, p. 1623-1634, Apr. 2003.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; PIETRA, A. M. D.; CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford, v. 29, n. 4, p. 691-700, July 2002.

LEAL, T. C. A. B.; FREITAS, S. P.; SILVA, J. F.; CARVALHO, A. J. C. Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim-cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf]. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 48, n. 278, p. 445-453, jul./ago. 2001.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. *Phytochemistry*, Oxford, v. 46, n. 4, p. 689-693, Apr. 1997.

MIGUEL, M. G.; GUERRERO, C.; RODRIGUES, H.; BRITO, J. C.; DUARTE, F.; VENÂNCIO, F.; TAVARES, R. Main components of the essential oils from wild Portuguese *Thymus mastichina* (L.) L. ssp *mastichina* in different developmental stages or under culture conditions. *Journal of Essential Oil Research*, Carol Stream, v. 16, n. 2, p. 111-114, mar./apr. 2004.

MING, L. C.; CHAVES, F. C. M.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, A. A. Produção sazonal de óleo essencial em uma população natural de *Piper aduncum* L. em Adrianópolis – PR. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, ju. 2002. Suplemento 2.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database. U. S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD, 1998.

PALÁ-PAÚL, J.; PÉREZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PALÁ-PAÚL, R.; SANZ, J.; CONEJERO, F. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, London, v. 29, n. 7, p. 663-672, July 2001.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; CÂMARA, F. L. A.; DUARTE, I. B.; QUEIROZ, M. E. C.; LEITE, V. G. M.; MORAES, R. M.; CARVALHO, D.; FRANÇA, S. C. Co-cultivation of plant cells as a technique for the elicitation of secondary metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 165-169, 2000.

PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; DUDAI, N. The influence of season and harvest frequency on essential oil yields from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 49, n. 2, p. 326-329, Mar/Apr. 1986.

PUTIEVSKY, E.; DUDAI, N.; RAVID, U.; KATZIR, I.; MICHAELOVICH, Y.; ZUABI, E.; SAADI, D. Morphology, phenology, and essential oil of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce in different seasons. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, v. 3, n. 3, 1995.

SABILLÓN, D.; CREMADES, L. V. Diurnal and seasonal variation of monoterpene emission rates for two typical Mediterranean species (*Pinus pinea* and *Quercus ilex*) from field measurements – relationship with temperature and PAR. *Atmospheric Environment*, Oxford, v. 35, n. 26, p. 4419-4431, Sept. 2001.

SALIDO, S.; ALTAREJOS, J.; NOGUERAS, M.; SÁNCHEZ, A.; PANNECOUQUE, C.; WITVROUW, M.; CLERCQ, E. Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *Badia*. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 81, n. 1, p. 129-134, June 2002.

SILVA, M. G. V.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, A. M.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia*, Milan, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.

SILVA, R.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Teores de óleos essenciais em folhas de cidrão (*Aloysia triphylla*) coletadas em diferentes horários. *Horticultura brasileira*, Brasília, v. 22, n. 2, jun. 2004. Suplemento. CD-ROM.

TAKEDA, O.; MIKI, E.; TERABAYASHI, S.; OKADA, M.; LU, Y.; HE, H. S.; HE, S. A. A comparative study on essential oil components of wild and cultivated *Atractylodes lancea* e *A. chinensis*. *Planta medica*, Stuttgart, v. 62, n. 5, p. 444-449, Oct. 1996.

TAVEIRA, F. S. N.; LIMA, W. N.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canalilla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, London, v. 31, n. 1, p. 69-75, Jan. 2003.

YATAGAI, M.; OHIRA, M.; OHIRA, T.; NAGAI, S. Seasonal variations of terpene emission from tress and influence of temperature, light and contact stimulation on terpene emission. *Chemosphere*, Oxford, v. 30, n. 6, p. 1137-1149, Mar. 1995.