

LUDMILA RAGGI

Teor, composição química e atividade biológica de
óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski
e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae)

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área
de Concentração de Plantas Vasculares em
Análises Ambientais.

São Paulo
2013

LUDMILA RAGGI

Teor, composição química e atividade biológica de
óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski
e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae)

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área
de Concentração de Plantas Vasculares em
Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DR^a MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Raggi, Ludmila

R142t Teor, composição química e atividade biológica de óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae) / Ludmila Raggi -- São Paulo, 2013.
147 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Variação sazonal e fenológica. 3. Arnica paulistana. I.

Título

CDU: 547.913

*Aos meus pais, Raggi e Fátima
e meus amores Ricardo e Sofia,
dedico.*

“Os homens falam, os cachorros latem, os gatos míam, os pássaros cantam, e as plantas???. Ah....elas conversam através de um outro sentido. E essa linguagem tem um idioma que na grande maioria das vezes é indecifrável...mas um dia, chegaremos lá! Com respeito, amor e muito estudo!”



AGRADECIMENTOS

Gratidão

À Gaia, planeta que a cada instante nos presenteia com a sua natureza estupenda!

Aos meus pais, pessoas maravilhosas, sempre presentes. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês!

Aos meus irmãos Hugo e Marco; minha cunhada Juliana, e claro a "pretinha" da titia, Duda.

Ao meu eterno amor, super companheiro, super pai, Ricardo Skubs. Pessoa que tanto admiro e amo. Muito grata por tudo meu amor, pelos seus ensinamentos, a sua paciência e ao seu amor.

À nossa linda e amada filha Sofia. Fruto de um amor verdadeiro que reverbera na sua pessoa. Você sempre será muito amada.

À minha querida orientadora, Dr^a. Maria Cláudia Marx Young. "Claudinha" você tem um lugar muito especial no meu coração. Já se foram mais de sete anos e cada vez mais minha admiração por ti aumenta. Sou muito grata pela sua companhia.

Ao Dr.^o Paulo Roberto H. Moreno, pelas incontáveis ajuda e incontáveis risadas!

À Dr^a. Inês Cordeiro e Dr.^o. Benoît Francis Patrice Loeuille pela identificação da *Sphagneticola* e especialmente do *Porophyllum*.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Dr^a. Rita de Cássia L. Figueiredo Ribeiro e Dra. Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Dr^a. Ângela Maria Ladeira, Dr^a. Márcia Braga, Dr^a. Maria Ângela Carvalho, Dr^a. Marília Gaspar, Dra. Luce Brandão, Dr^a. Rita de Cássia Figueiredo, Dr.^o. Edison Paulo Chu, Dr.^o. Marco Aurélio Tiné, Dr.^o. Emerson Alves da Silva, Dr.^o. Marcos Aidar.

Aos pesquisadores Dr^a. Carmen Lúcia Queiroga, Dr^a. Márcia Regina Braga e Dr.^o. João H.G. Lago, pelas sugestões, no exame de qualificação.

Aos pesquisadores Dr^a. Carmen Lúcia Queiroga, Dr.^o. João H.G. Lago, Miriam A. Apel e Kelly Simões pelas valiosas discussões na defesa da Tese.

Aos funcionários do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Mary Monteiro, Maria Aparecida, Ana Alice Martins Cardoso e ao Sr. Dairio por me ajudar a cuidar das minhas plantinhas.

Aos funcionários pós-graduação, Elvis, Márcia R. Ângelo "Marcinha", e Shirlei Dassi.

Aos funcionários da subfrota, Alfredo Miguel da Paz, Aliomar Oliveira Gomes "Mazinho", José Roberto Morelli, Luis Gustavo Zanqueta Batista, Renato Faria e Wilson Ferreira da Silva.

Aos queridos pesquisadores e funcionários da fazenda Campininha: Marcos Mecca Pinto, João Del Giudice Neto, Adão Martinho Barbosa, Ana Lúcia da Silva, Dorvalino Pinto de Godoy, Elisamara Augusto da Silva Guilherme, Maura Dias Peixoto, Paulo Barbosa da Silva e Samuel Barnuevo.

Aos senhores Sebastião Oliveira da International Paper, Alexandre Reis da Somar e Samantha, sempre muito prestativa, do IAG/USP, por disponibilizar os dados meteorológicos

Às amigas Amanda, Cynthia, Juliana Iura, Paola, Tatiana, experimentando agora a dádiva de ser mãe, e Vanessa Costa, pela amizade.

À amiga PqC Vanessa Rebouças, sempre tão enrolada e tão eficiente. Você é uma grande amiga. Ps. essa frase é da dissertação mas continua tão atual...rs..!

À querida Maryzinha, pelas preocupações, broncas e conselhos. Você sempre será muito especial.

Aos amigos e colegas de laboratório, Manu, Kassinha, Flávio, Marina, Vanessa, Vanessa Oliveira, Fê, Glaucia, Joãozinho, Kelly, Jú Z., Athos, Daiane(s), Thiara, Leila, Evandro, Jana, Celso, Glauco, com certeza irei esquecer alguém...

Aos companheiros de bancada, Anderson, Cabral, Maura e Verena.

À Naomi Leporini, aluna de PIBIC que aceitou e trabalhou com tanto empenho me ajudando a entender um pouquinho mais sobre as subespécies de *Porophyllum*

Ao Mauricio Pereira mais uma vez me socorrendo na reta final.

Á minha cunhada Cláudia Skubs, você não tem idéia do quanto ajudou!

Às "meninas da bio" Alê Schunck, Luana, e Priscila, mãezinha da Laura.

Ao eterno orientador Prof. Dr^o. Marco Aurélio Sivero Mayworm, pessoa que me inseriu nesse mundo mágico das plantas e seu metabolismo secundário.

Aos queridos amigos da FEN especialmente a Chris e o Fê, pessoas admiráveis.

Ao Instituto de Botânica e o Núcleo de Fisiologia e Bioquímica.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta ajudaram na concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO GERAL	1
LITERATURA CITADA	22

CAPÍTULO 2	
Composição química e atividade antifúngica dos óleos voláteis de <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski em diferentes biomas, Mata Atlântica e Cerrado, do Estado de São Paulo.	
Resumo	34
Abstract	35
Introdução	36
Material e métodos	37
Resultado e discussão	40
Literatura citada	54

CAPÍTULO 3	
Variação diuturna dos óleos voláteis de <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski	
Resumo	60
Abstract	61
Introdução	62
Material e métodos	64
Resultado e discussão	66
Literatura citada	73

CAPÍTULO 4	
Composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski cultivada sob elevada concentração atmosférica de CO₂	
Resumo	78
Abstract	79
Introdução	80
Material e métodos	82
Resultado e discussão	87
Literatura citada	96

CAPÍTULO 5***Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *macrocephalum* (DC.) R. R. Johnson
e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *runderale*: composição química dos
óleos voláteis durante o ciclo de desenvolvimento**

Resumo	102
Abstract	103
Introdução	104
Material e métodos	106
Resultado e discussão	109
Literatura citada	125
<hr/>	
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	129
LITERATURA CITADA	133
<hr/>	
RESUMO	135
ABSTRACT	136

1. A história dos aromas e plantas medicinais

Desde os tempos mais remotos o homem faz uso de plantas medicinais para o tratamento e combate a enfermidades. Lietava (1992) sugere que a presença de flores em sepulturas de Neandertais (60.000 a.C) é devida não somente ao ritual de sepultamento mas sim, ao potencial terapêutico dessas plantas. A análise dos polens, identificou espécies de interesse medicinal como *Ephedra altissima* com ação estimulante no sistema nervoso central; *Achilea* sp. Com atividade antiinflamatória e *Centaurea solstitialis* com ação antiséptica. A prática do uso de plantas para o tratamento de enfermidades também é utilizada pelos animais, os chimpanzés por exemplo, comem as folhas inteiras de *Aspilia* spp, Asteraceae, para combater vermes intestinais, tal prática é chamada hoje de zoofarmacognosia (Newton & Nishida 1990, Krief *et al.* 2005, Raman & Kandula 2008).

No Egito, por volta de 1550 a.C. surge um dos primeiros escritos sobre plantas medicinais, chamado de Papiro Ebers, assim denominado por seu tradutor Georg Ebers, no qual são descritos cerca de 700 drogas (de origem animal e vegetal), 811 fórmulas e 150 espécies vegetais tais como acácia, mamona, absinto, tâmara e figo (Kremers & Urdang 1976, Bueno 2009) que eram utilizadas como medicamentos e cosméticos.

Todo esse conhecimento estava associado às plantas medicinais e entre elas as plantas aromáticas, a partir das quais, surgiram os perfumes.

A origem da palavra perfume vem da palavra latina *per fumum* que significa através (*per*) da fumaça (*fumum*), conhecido hoje como incenso. Muito utilizado para fins religiosos, os egípcios acreditavam que através da fumaça aromática obtida da queima de madeiras odoríferas, seus pedidos e orações chegariam mais rápido. Os incensos eram utilizados também em cerimônias de purificação e limpeza, pois acreditavam que os maus espíritos que traziam doenças eram repelidos pela fumaça aromática. Existiam muitas fórmulas para o preparo dos incensos e a mais conhecida é o *kyphi* que além de incenso, era utilizada também como perfume e medicamento. Sua fórmula é guardada até hoje e alguns componentes presentes são: olíbano, mirra, henna, canela, menta,

açafraão, uva e mel. Hoje, os incensos são utilizados por diversas religiões como o Cristianismo, Budismo, Hinduísmo, Islamismo, entre outras (Pybus 2006, Altintaş 2010).

O uso de óleos aromáticos era muito comum, tanto para embalsamar os mortos como o uso no dia a dia (Hughes 1956). Nefertiti (1380 – 1345 a.C.) e Cleópatra (69 – 30 a.C.) eram apreciadoras das essências naturais, e produziam suas próprias fórmulas para uso cosmético. Cleópatra se banhava com essências aromáticas especialmente de rosas (Ashcar 2007, Altintaş 2010).

Na Grécia, o filósofo Alcmeón (535 a.C.) foi o primeiro a caracterizar a saúde como equilíbrio no corpo de qualidades opostas: frio e quente; úmido e seco; doce e amargo; a doença era o reflexo do predomínio de uma destas qualidades. Hipócrates, o pai da medicina, usou como base as teorias de Alcmeón para firmar a teoria dos quatro humores, bile negra correspondente ao baço; fleugma ao cérebro; bile amarela ao fígado e sangue correspondente ao coração, e acreditava que o organismo tinha a capacidade de curar a si próprio e que a doença era um desequilíbrio entre o ser e a natureza, hipótese também defendida pela medicina tradicional chinesa. O tratamento empregado por Hipócrates era a cura pelo semelhante aplicando substâncias tóxicas em pequenas quantidades, sendo este, o princípio da homeopatia (Kremers & Urdang 1976; Higby 2000; Dias, 2005).

Aristóteles em 335 a.C. funda em Atenas a escola Liceu, que dedica seus estudos principalmente às ciências naturais. Alexandre, o grande, durante as suas conquistas por todo o local que passava, coletava sementes e plantas e as enviava para o Liceu. Teofrasto (300 a.C.), discípulo de Aristóteles, foi o pai da botânica. Em seus dois livros, *De Historia Plantarum* e *De Causis Plantarum*, Teofrasto classifica as plantas de acordo com o tipo de folha, raiz e semente e discute o uso de plantas medicinais na região do Atlântico até a Índia (Cowen & Helfand. 1988, Bueno 2009).

A obra médica mais famosa foi matéria médica de Dioscórides publicada no ano 78 d.C. Cirurgião do exército de Nero, percorreu uma boa parte na região mediterrânea anotando e recolhendo informações de plantas medicinais. A obra, *De Materia Medica*, foi traduzida para o

inglês sendo dividida em cinco partes: livro I – aromáticos, óleos, pomadas e árvores; livro II – criaturas vivas, leite e produtos lácteos, cereais e ervas; livro III – raízes, sucos e ervas; livro IV – ervas e raízes; livro V – vinhas, vinhos, minérios metálicos e continha informações como, descrição da droga, uso, efeitos, coleta e enraizamento (Kremers & Urdang 1976, Higby 2000).

No império Romano o consumo de aromas era intenso, com a criação de rotas comerciais para a Arábia, Índia e China (périplo do mar da eritréia), a comercialização de matérias primas perfumadas foi estimulada. No século I foram consumidos ca. de 3000 t de olíbano e 500 t de mirra. Em dias de jogos romanos, o perfume era utilizado exalado das piras para amenizar o cheiro de sangue das batalhas (Pybus 2006, Castel *et al.* 2009).

Galeno (170 d.C.) médico particular do Imperador Romano Marco Aurélio retoma a teoria dos quatro humores de Hipócrates mas a sua forma de cura é contrária a de Hipócrates que curava o todo para atingir a fase afetada, Galeno trata apenas a fase afetada por exemplo: febre – antifebril; dor – analgésico, sendo esse o precursor da alopatia (Kremers & Urdang 1976, Newman 1999, Higby 2000, Hulse 2004).

Abu Ali-Husain Ibn Abdalah Ibn Sina, conhecido como Avicenna (980 – 1037) foi o maior filósofo Islâmico, com grande interesse pela química, física, astronomia, filosofia e matemática. Acreditando na teoria dos humores (Afshar 2011), Avicenna reúne em sua principal obra médica Cânon, os conhecimentos de Teofrasto e Dioscórides. No entanto, sua principal descoberta foi a movimentação de fluídos sem a necessidade de impulsão mecânica, a capilaridade. Com a capilaridade nasce a destilação e assim, Avicenna extraí o óleo essencial de rosas dando origem a água de rosas (Dias 2005, Ashcar 2007). A partir de então, a técnica de destilação foi empregada em larga escala para a extração de óleos voláteis de plantas.

Na Idade Média, uma figura marcante para a história da ciência e medicina foi o médico Paracelso (1493 – 1541). Ele afirmava que todas as substâncias eram venenosas, e que a dose certa diferencia um veneno de um remédio, empregando pela primeira vez a relação dose/resposta utilizada até hoje em farmacologia. Na medicina, inseriu compostos minerais como sal, enxofre, e

mercúrio e acreditava que Deus escolhia simples pessoas para ensinar a terapia correta e que o conhecimento popular era melhor do que os encontrados nas obras de Galeno e Avicena (Pioreschi 2006, Gallo 2008).

Durante o período da Renascença (XIII – XVII) Catarina de Médici parte de Florença para a França a fim de se casar com Henrique II. Junto à caravana de Catarina, está o seu perfumista particular o italiano Renato Bianco. Na França, Catarina se instala em Grasse, então capital do curtume, que mais tarde é conhecida como a capital do perfume (Pybus 2006). Em 1714 outro perfumista italiano, Giovanni Maria Farina (Jean Marie Farina), cria a primeira água de colônia tendo na composição óleos de bergamota, lavanda e alecrim. Napoleão Bonaparte, imperador da França entre 1804 e 1814, tornou-se garoto propaganda da água de colônia, feita exclusivamente para ele, que continha notas de limão, bergamota, alecrim, cedro e sândalo e que estava presente em todas as suas batalhas durante as guerras Napoleônicas (Pybus 2006, Ashcar 2007).

Segundo Dias e Silva (1996) a classificação das fragrâncias engloba um total de 14 grupos, organizados segundo a volatilidade de seus componentes: cítrica (limão), lavanda, ervas (hortelã), aldeídica, verde (jacinto), frutas (pêssego), florais (jasmim), especiarias (cravo), madeira (sândalo), couro (resina de vidoeiro), animal (algália), almíscar, âmbar (incenso) e baunilha. A nota superior, ou cabeça do perfume, é a parte mais volátil do perfume a que detectamos nos primeiros 15 minutos, o coração do perfume, ou nota do meio, é a parte intermediária do perfume, que leva de três a quatro horas para ser percebida. A nota de fundo corresponde aos fixadores, é a parte menos volátil e demora cerca de cinco horas para ser percebida. A diferença entre o perfume e a água de colônia, está na proporção de essência e proporção entre água e etanol.

Como visto, as fragrâncias fazem parte da cultura humana há milhares de anos. Primeiro através dos incensos e óleos dedicados aos Deuses, mais tarde os perfumes, sendo um privilégio apenas dos mais favorecidos.

As fragrâncias eram oriundas de matéria prima vegetal (raízes, resinas, sementes) e animal. Com o passar do tempo e os avanços nas técnicas de extração e os avanços da química orgânica, foi

possível, através da síntese química, diversificar as fragrâncias dos perfumes (Harder & Oelkers 1993).

A primeira geração dos aromas sintéticos (1874 – 1945) foi marcada pela síntese das mais importantes categorias primárias de fragrâncias como a vanilina, cumarina, acetato de linalila, acetato de benzila, musc cetona, acetaldeídos, feniletilalcool, fenilacetaldeídos, nerolidol, farnesol, álcool cinamila, entre outros. Na década de trinta do século XX, foi criado um grande número famílias de perfumes como *fougère*: composta por lavanda, gerânio e coumarinas com notas de carvalho e salicilato; oriental: cítrico, vanilina, heliotropina e labdanum; *chypre*: *citrus* e notas amadeiradas com óleo de patchouli; e aldeídico floral composto por jasmim, rosa, *ylang ylang*, metil ionona. Este último tem como principal representante o Chanel n°5.

Os aromas químicos da segunda geração (1945 – 1975) são marcados por variações nas famílias tradicionais como o verde floral; caracterizado por uma pronunciada nota verde com hexenol e fenilacetaldeído; e outras subfamílias de chipre. A terceira geração (1975 – atual) é marcada pela identificação de componentes minoritários através do uso de equipamentos como a cromatografia a gás e espectrômetro de massas (Harder & Oelkers 1993).

2. Vias de formação dos produtos naturais nos vegetais

Os compostos com propriedades medicinais e aromáticos são oriundos do metabolismo vegetal que, didaticamente é dividido em duas partes: primário e secundário.

O metabolismo primário está intrinsecamente ligado ao crescimento e desenvolvimento do vegetal. Os carboidratos, oriundos da fotossíntese, são matérias-primas para a síntese de uma série de moléculas como aminoácidos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Majetowicz 2008). Segundo Gottlieb *et al.* (1996), os metabólitos primários são fornecedores de matéria-prima e energia para a formação dos metabólitos secundários (Figura 1).

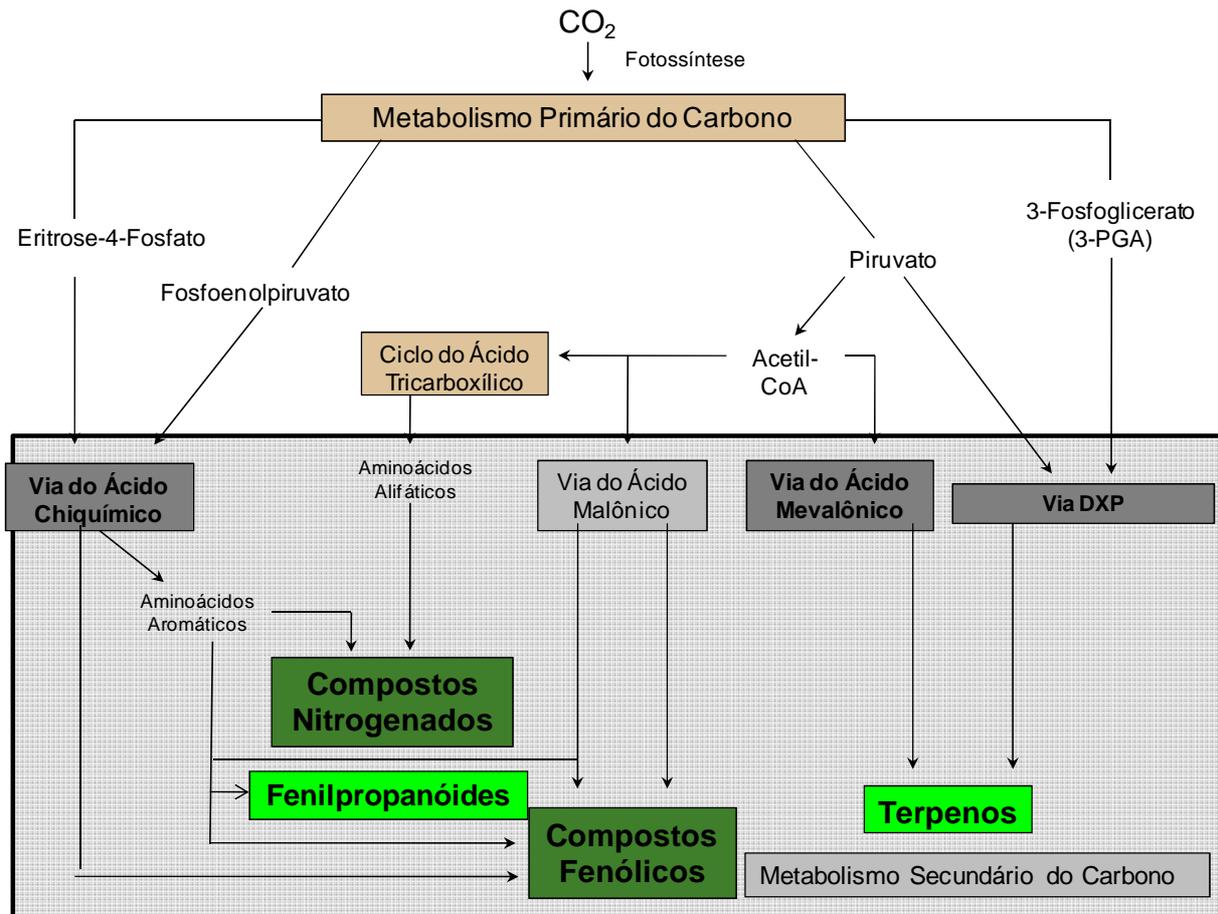


Figura 1. Principais rotas biossintéticas do metabolismo secundário e suas associações ao metabolismo primário (Taiz & Zeiger 2004 – modificado).

Os metabólitos secundários desempenham funções biológicas importantes para a sobrevivência e adaptação da planta ao meio ambiente. Eles são mensageiros da informação por possuírem polaridade, pequena massa molecular, meia vida curta, reatividade química, ocorrência esporádica e grande potencial antioxidante (Gottlieb *et al.* 1996). A riqueza destes metabólitos pode ser explicada, em parte, pelo simples fato das plantas não se locomoverem necessitando assim de defesas químicas contra ações do meio ambiente e de animais (Gottlieb 1990, Harborne 1993, Carvalho *et al.* 2006).

Segundo Figueiredo *et al.* (2008) para definir os metabólitos secundários deve-se levar em consideração que: não tem implicação direta no crescimento e desenvolvimento das plantas; são sintetizados a partir dos metabólitos primários; tem distribuição restrita e limitada a certos gêneros e espécies; podem mostrar toxicidade, frequentemente tem diferentes sítios de produção e acúmulo;

podem ser acumulados nos vacúolos de forma glicosilada ou em estruturas secretoras especiais tais como dutos, tricomas e canais laticíferos.

A seguir são descritos alguns metabólitos:

Compostos nitrogenados são formados a partir dos aminoácidos. Fazem parte deste grupo os alcalóides (coniina, morfina, cafeína, cocaína entre outros), os glicosídeos cianogênicos, os glucosinolatos e os aminoácidos não protéicos como a canavanina (Haslam 2001).

Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade de estruturas contendo pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, podendo ser formado a partir de duas rotas, via ácido chiquímico e via ácido malônico (Figura 1). Apresentam importantes propriedades biológicas que contribuem para o odor, o sabor e a coloração dos vegetais. Alguns exemplos desta classe são: lignóides, taninos, flavonóides, fenilpropanóides, entre outros (Carvalho *et al.* 2003).

Um importante grupo de substâncias do metabolismo secundário, com grande interesse econômico são os óleos voláteis, ou também chamados de óleos essenciais.

2.1 Óleos voláteis

Os óleos voláteis são produtos obtidos de matéria-prima vegetal por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado) podendo apresentar-se isoladamente ou em mistura (ANVISA 2007). São misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, solúveis em solventes orgânicos (Bruneton 2001, Bakkali *et al.* 2008). Sua composição química pode ser formada através de duas origens biossintéticas distintas, a partir de derivados de fenilpropanóides via ácido chiquímico e de terpenóides (Sangwan *et al.* 2001).

Os fenilpropanóides, são compostos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono derivados de ácidos aminados aromáticos, provenientes da via do ácido chiquímico. Este, por sua vez, é formado a partir da condensação do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato. O ácido chiquímico é responsável pela formação dos ácidos cinâmicos e *p*-cumárico que, através de

reduções, oxidações e ciclizações, formam os alil- e propenilbenzenos, aldeídos aromáticos e cumarinas. Na Figura 2 estão exemplificados alguns fenilpropanóides. O safrol, componente majoritário do óleo volátil de sassafrás (*Sassafras albidum*) e o eugenol componente majoritário do cravo (*Syzygium aromaticum*) são exemplos de alilbenzenos; os propenilbenzenos estão representados pelo isosafrol presente em *Jasminum officinale* e anetol principal componente do óleo volátil do anis-estrelado (*Illicium verum*); o cinamaldeído, um aldeído aromático, está presente no óleo da casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum*); e a cumarina (*Dipteryx odorata*) (Dewick 2009).

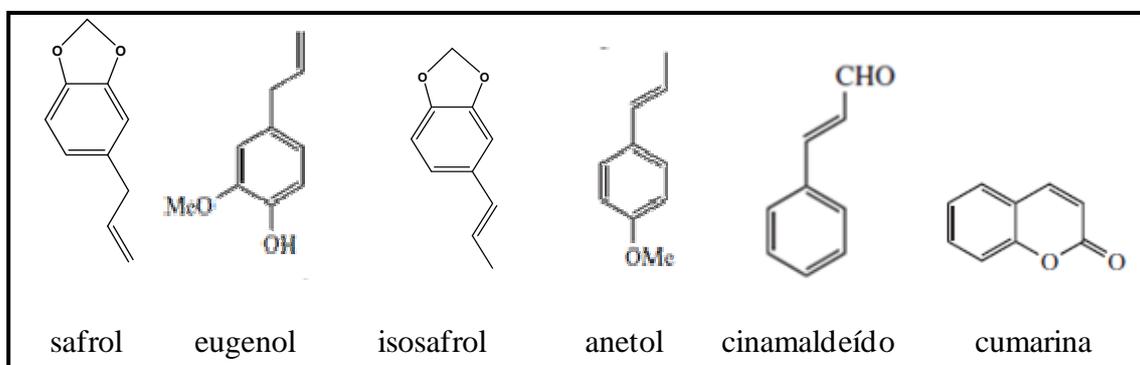


Figura 2. Exemplos de fenilpropanóides

Os terpenos representam uma grande classe de produtos naturais com cerca de 25.000 estruturas identificadas em plantas superiores (Bowsher *et al.* 2008, Wink 2010). A biossíntese dos terpenos foi dividida por Bowsher *et al.* (2008) em quatro estágios sendo eles:

1º estágio: produção das unidades básicas de cinco carbonos, o difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP); para tanto, há dois caminhos possíveis um é através do ácido mevalônico (via do mevalonato – MVA), e o outro é através da rota desoxixilulose fosfato (DXP) também chamada de via do metil eritritol fosfato - MEP (Figura 3). Animais e fungos sintetizam IPP apenas através da via do ácido mevalônico e em vegetais superiores e eubactérias ele é produzido simultaneamente nas duas rotas, mas em compartimentos celulares diferentes (Bouvier *et al.* 2005, Aharoni *et al.* 2006). A via DXP ocorre nos plastídios e são formados principalmente os monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos, enquanto que a via MVA, as reações ocorrem no citosol

formando principalmente sesquiterpenos e triterpenos (Dudareva *et al.* 2004, Bowsher *et al.* 2008, Dewick 2010, Phillips & Concepción 2010);

2° estágio: condensação de IPP e DMAPP por preniltransferases; os terpenos são sintetizados da condensação do IPP e seu isômero alílico DMAPP. A adição sequencial cabeçacauda de unidades de IPP com DMAPP forma o difosfato de geranila (GPP) e difosfato de farnesila (FPP), sendo aceito que a formação do GPP ocorre nos plastídios e do FPP no citosol. Esses dois componentes são precursores dos mono- e sesquiterpenos, respectivamente (Figura 3);

3° estágio: conversão de precursores pelas terpeno sintetases; as enzimas terpeno sintetases ou ciclases, convertem os terpenóides precursores (GPP, FPP) nos grupos básicos, os mono- e sesquiterpenos. Elas são uma grande família de enzimas, classificadas de acordo com o grupo terpenoídico que elas formam como, monoterpene sintetase e sesquiterpene sintetase e responsáveis pela introdução de uma considerável variação estrutural de esqueletos de carbono nesta fase da biossíntese; e

4° estágio: diversidade estrutural; os terpenóides produzidos pela ação das sintetases podem ainda ser modificados pela ação de uma variedade de enzimas como; hidrolases, desidrogenases, redutases, glicosil e metiltransferases.

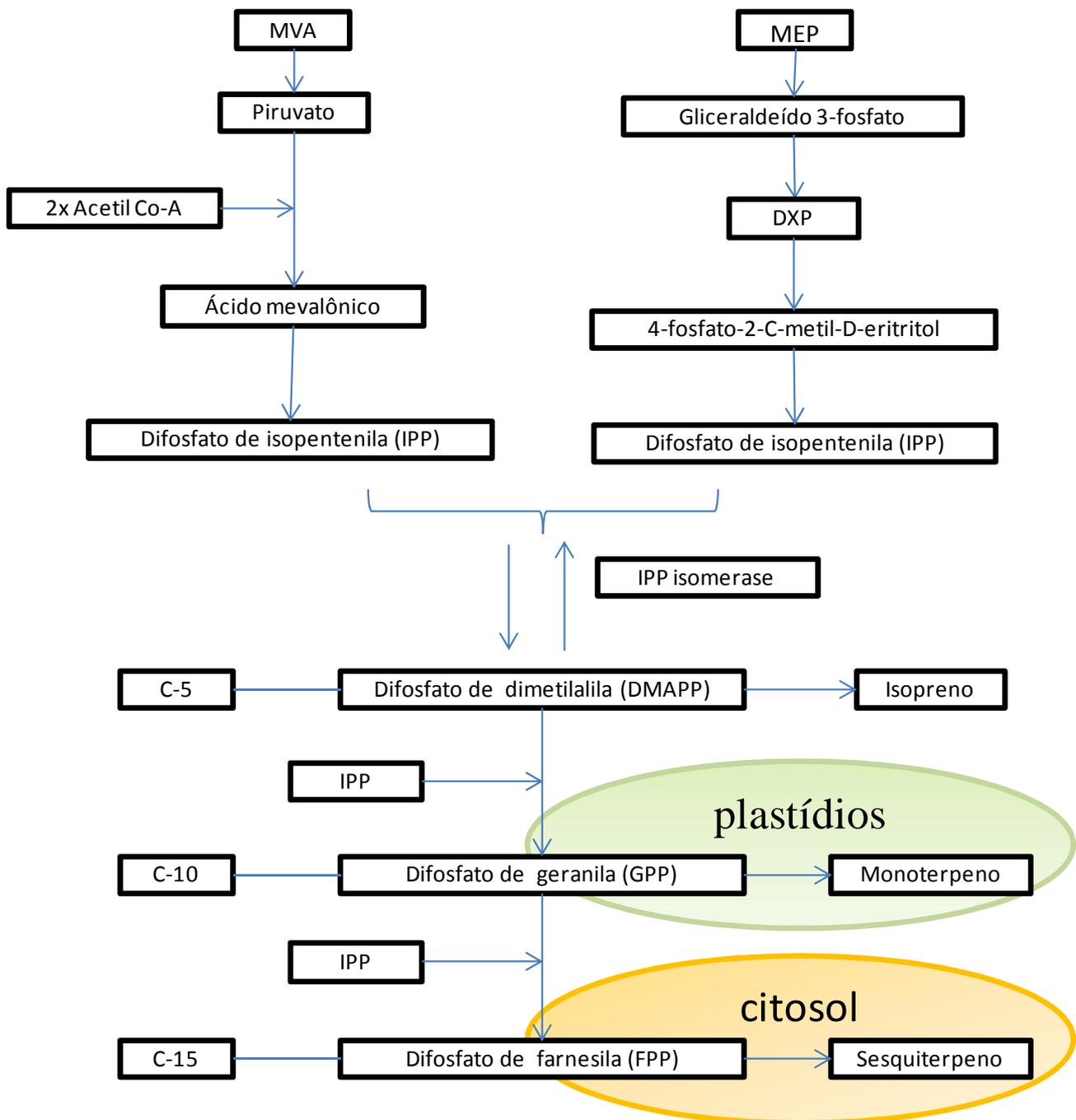


Figura 3. 1º e 2º estágios da biossíntese de terpenos. Esquema Owen & Peñuelas (2005) modificado.

A classificação dos terpenos se baseia no número de unidades isoprênicas: monoterpênos (C_{10} , 2 unidades), sesquiterpenos (C_{15} , 3 unidades), diterpenos (C_{20} , 4 unidades), sesterpenos (C_{25} , 5 unidades), triterpenos (C_{30} , 6 unidades) e tetraterpenos (C_{40} , 8 unidades) sendo os monoterpênos e sesquiterpenos os terpenos mais frequentes em óleos voláteis (Mahmoud & Croteau 2002).

Os monoterpênos (Figura 4) podem ser classificados de acordo com a ciclização: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (alfa-terpineol, terpinoleno), e bicíclicos (alfa-pineno, tujona, cânfora, fenchona), ou através do grupo funcional: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos (citrál), cetonas (carvona), lactonas (nepetalactona) e tropolonas (gama-tujaplicina). Os sesquiterpenos (Figura 5) são classificados de acordo com a ciclização sendo: acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico, gama bisaboleno) e bicíclicos (beta-selineno, beta-cariofileno) (Bruneton 2001, Simões & Spitzer 2003).

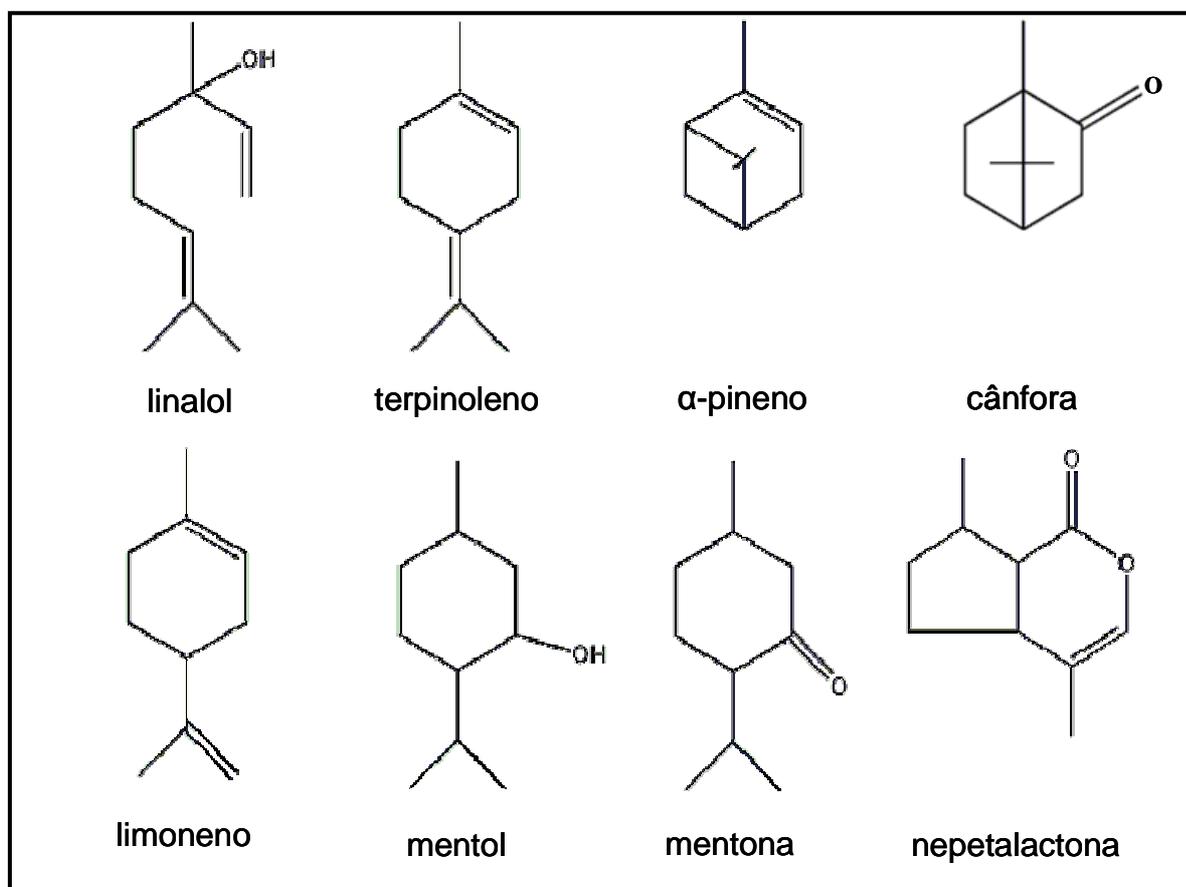


Figura 4. Exemplos de monoterpênos (Simões & Spitzer 2003, adaptado).

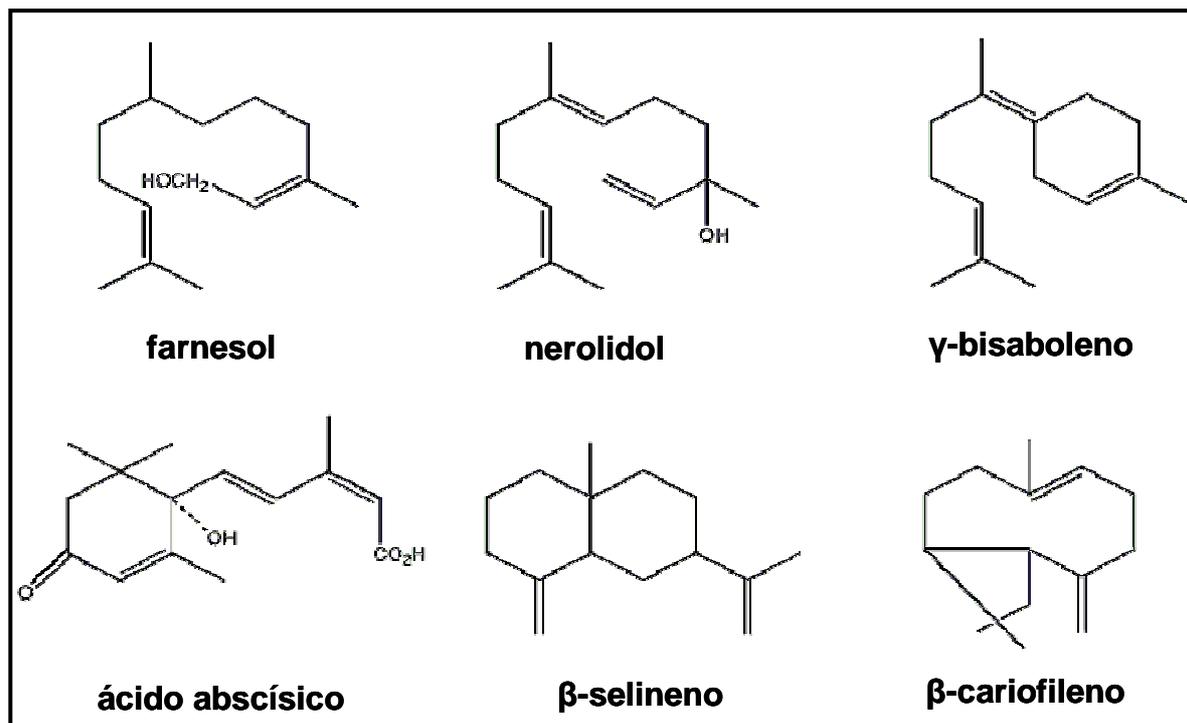


Figura 5. Exemplos de sesquiterpenos (Simões & Spitzer 2003, adaptado).

2.2 Ocorrência dos óleos voláteis nos vegetais

A presença de óleos voláteis em gimnospermas e angiospermas monocotiledôneas é rara, já em angiospermas eudicotiledôneas há uma abundância de famílias ricas em óleos voláteis destacando-se Lauraceae, Piperaceae, Rutaceae, Asteraceae, Rosaceae, Pinaceae, Apiaceae, Myristicaceae, Lamiaceae e Myrtaceae.

Os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas especializadas, como células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae), em tricomas glandulares (Lamiaceae) ou canais oleíferos (Apiaceae e Asteraceae). Eles podem também estar estocados em certos órgãos, como flores (laranjeira), folhas (louro, melissa, eucalipto), cascas do caule (canelas), madeira (pau-rosa), rizomas (gengibre), frutos (anis-estrelado) ou sementes (noz-noscada) (Metcalf & Chalk 1950, Bruneton 2001, Simões & Spitzer 2003, Farago *et al.* 2005, Coutinho *et al.* 2006).

2.3 Métodos de extração

As metodologias empregadas para a extração de óleos voláteis dependem da localização do óleo na planta, bem como da qualidade do óleo que se deseja obter. Dentre os métodos de extração existentes, podemos destacar:

Enfloração (enfleurage) é utilizada para a obtenção de óleo de pétalas de flores que contém baixo teor de óleo e alto valor comercial. Essa técnica consiste em depositar as pétalas de flores em gordura, até o esgotamento das mesmas as quais são trocadas até a saturação da gordura. Após a saturação, a gordura é tratada com álcool o qual é destilado a baixa temperatura obtendo assim um produto puro, livre de resíduos, com alto valor comercial (Guenther 1960, Oliveira & Jose 2007).

Solventes orgânicos, utilizando o aparelho soxhlet, porém nesse método de extração são extraídos também outros compostos lipofílicos, pois a extração é feita com solventes apolares sendo os produtos obtidos de baixo valor comercial devido a presença de compostos não desejáveis.

Prensagem ou expressão é uma técnica empregada para a extração de óleos voláteis de pericarpos de frutos cítricos no qual jatos de água exercem uma ação abrasiva no pericarpo rompendo as células secretoras, após centrifugação o óleo se separa da fase aquosa (Simões & Spitzer 2003).

Fluído supercrítico, empregado industrialmente, é um método eficiente de extração de óleos voláteis, devido à qualidade do óleo obtido, livre de solvente, porém apresenta um custo elevado e outros compostos como esteróides, carotenóides e flavonóides também podem ser extraídos. Em uma câmara fechada, o CO₂ é submetido a um aumento de pressão e temperatura acima do seu ponto crítico, por isso é chamado de supercrítico, desta forma, ele atinge um estado intermediário entre o líquido e o gasoso podendo agir como solvente. Ao final da extração, a temperatura e pressão voltam ao estado crítico transformando o CO₂ em gás novamente e obtendo o óleo volátil livre de solventes (Maul *et al.* 1996, Carrilho *et al.* 2001).

Arraste a vapor e hidrodestilação são técnicas que possuem o mesmo princípio, arrastar o óleo volátil através de vapor, sendo que a diferença está na maneira em que o material vegetal é preparado. No arraste a vapor, o material vegetal não fica em contato com a água, em estado líquido, e geralmente é utilizado em escala industrial. Na hidrodestilação, o material vegetal fica em contato com a água, em estado líquido, e os óleos voláteis por serem imiscíveis em água e possuírem pressão de vapor mais elevado, são arrastados pela água. Essa técnica é a mais

empregada em laboratório utilizando-se o aparelho do tipo Clevenger (Santos *et al.* 2004, Pino *et al.* 2006, Kelen & Tepe 2008).

2.4 Funções dos óleos voláteis nos vegetais

Os óleos voláteis presentes nas plantas desempenham funções fisiológicas e ecológicas específicas. Componentes voláteis das flores como nerol, geraniol, linalol, isoeugenol, 1,8-cineol, são os principais responsáveis pela atração e orientação de polinizadores (Harborne 2001, Gershenzon & Dudareva 2007); compostos como 1,8-cineol, cânfora, isotujona e α -tujona agem como inibidores de germinação. Os compostos presentes nos óleos voláteis podem agir também na proteção contra predadores, como o β -ocimeno, epóxido de cariofileno e espatulenol que são repelentes de formiga cortadeira de folhas por impedirem o crescimento dos fungos utilizados na sua alimentação, o mentol e a mentona são inibidores do crescimento de larvas, e certos himenópteros que seqüestram α - e β -pinenos de *Pinus sylvestris* para protegerem as suas larvas do ataque de formigas (Kelsey *et al.* 1984, Harborne 1993). *Arabidopsis thaliana*, quando exposta ao monoterpeneo β -ocimeno, causa aumento na transcrição de genes de defesa ocasionando maior resistência contra seu predador, *Bothytis cinerea* (Maffei 2010).

Schiestl (2010) fez uma compilação de dados referente aos voláteis e sua relação evolutiva com insetos e chegou à conclusão de que os monoterpeneos exercem principalmente um papel de defesa enquanto que os aromáticos (benzaldeídos, eugenol, fenilacetaldeído) exercem mais atração aos polinizadores.

2.5 Fatores de variabilidade dos óleos voláteis

A composição dos óleos voláteis em plantas, apesar de ser determinada geneticamente, pode sofrer alterações em decorrência do ambiente em que vivem sendo essas alterações chamadas de fatores de variabilidade. A existência de quimiotipos, ou “raças químicas”, é frequente em plantas com óleos voláteis. O tomilho (*Thymus vulgaris*) na Europa, por exemplo, apresenta sete quimiotipos diferentes, sendo encontrados seis quimiotipos na França que apresentam como

constituintes majoritários timol, carvacrol, geraniol, linalol, α -terpineol, trans-4-tuianol e cis-8-mircenol e um na Espanha, rico em cineol (Thompson *et al.* 2003, Kaloustian *et al.* 2005). Andrade *et al.* (2008) relatam a presença de sete quimiotipos diferentes em *Piper marginatum* da floresta amazônica. *Lippia alba* coletada no Pará apresentou três quimiotipos diferentes, o quimiotipo I rico em 1,8-cineol, limoneno, carvona e sabineno, enquanto que o quimiotipo II é rico em limoneno, carvona e mirceno e o quimiotipo III, rico em germacreno-D, geranial, neral e β -cariofileno (Zoghbi *et al.* 1998).

A fase fisiológica de uma planta também pode alterar a composição química de óleos voláteis como em coentro (*Coriandrum sativum*), onde o teor de linalol é 50% maior nos frutos maduros em relação aos frutos verdes (Bruneton 2001). Em guaçatonga (*Casearia sylvestris*), recomenda-se a coleta das folhas no período que antecede a floração, por apresentar maior teor de óleo volátil (Castellani *et al.* 2006). Mirjana *et al.* (2004) verificaram que *Satureja cuneifolia* apresenta alterações na proporção dos componentes do óleo, carvacrol, limoneno e α -pineno nas diferentes fases de desenvolvimento. Em *Balsamita major*, o conteúdo total de óleos atinge valores máximos no período que antecede o pico de floração, sem que variações significativas na proporção dos componentes do óleo tenham sido encontradas (Bylaitè *et al.* 2000).

Além da presença de quimiotipos e da interferência do ciclo vegetativo, fatores ambientais tais como, concentração de CO₂ atmosférico, temperatura, irradiância, fotoperíodo, regime de ventos e micronutrientes presentes no solo, também são capazes de influenciar a composição química de óleos voláteis presentes nas plantas (Bruneton 2001). Vurro *et al.* (2009) observaram aumento no teor de timol e carvacrol e diminuição de mono e sesquiterpenos em plantas de tomilhos cultivadas sob elevada concentração de CO₂ atmosférico. Silva *et al.* (1999) observaram um aumento no teor de eugenol em folhas de *Ocimum gratissimum* no período entre 11h e 14h, sugerindo a influência da luz solar na produção de eugenol desta espécie. Sayuri *et al.* (2010) observaram variação sazonal da rota biossintética de sesquiterpenos oxigenados em *Baccharis microdonta*, durante o período de um ano.

3. A família Asteraceae – objeto de estudo

Considerada uma das maiores famílias de Angiospermas, Asteraceae é distribuída em 1535 gêneros e 23.000 espécies, apresentando distribuição cosmopolita com representantes em todos os continentes, exceto no Antártico. Possuem hábito variável desde pequenas ervas e arbustos até árvores contudo, o porte herbáceo e arbustivo são os mais frequentes (Bremer 1994).

Segundo Di Stasi *et al.* (2002), dentre as espécies vegetais de interesse terapêutico, a família Asteraceae pode ser considerada uma das mais importantes, dado o grande número de plantas pertencentes a ela que são usadas popularmente como medicamentos. Nesse contexto, devem ser ressaltadas algumas espécies de interesse medicinal, tais como *Vernonia polyanthes*, empregada como diurética e nos casos de bronquite, *Achyrocline satureioides* empregada para problemas gástricos e cólicas, *Calendula officinalis* antiinflamatória e cicatrizante, *Achillea millefolium* analgésica, dentre outras.

Muitas são produtoras de óleos voláteis como *Baccharis* (Carreira 2007, Lago *et al.* 2008), *Lichnophora* (Curado *et al.* 2006, Reis *et al.* 2010), *Artemisia* (Perez-Alonso *et al.* 2003, Chericoni *et al.* 2004, Verma *et al.* 2010, 2011), e *Matricaria recutita* (Baghalian *et al.* 2011).

3.1 As espécies do presente estudo

Dentre as inúmeras espécies de Asteraceae para o presente trabalho foram selecionadas duas: *Sphagneticola trilobata* por ocorrer em dois diferentes biomas do Estado de São Paulo e ser de fácil cultivo, e *Porophyllum ruderale* por possuir duas subespécies muito semelhantes mas com ocorrência e odor distinto.

Em estudos de levantamento florístico, *S. trilobata* e *P. ruderale* ocorrem nos mais variados biomas brasileiros, como Mata Atlântica (Moraes & Monteiro 2006, Souza 2007, Ferreira *et al.* 2009, Pastore *et al.* 2012), Cerrado (Mantovani & Martins 1993, Almeida *et al.* 2005, Ritter *et al.* 2010) e Amazônia (Silva 2008), sendo chamadas, também, de espécies invasoras por serem de fácil

multiplicação e se adaptar as diferentes condições do ambiente.

Sphagneticola trilobata Pruski é uma erva perene, estolonífera, com ramos cilíndricos e vináceos. Apresenta indumento com tricomas tectores e/ou glandular. As folhas são sésseis, 3-lobadas, com lâmina ovada a elíptica membranácea. Apresenta capítulos solitários com as flores do raio e disco amarelas (Souza 2007). Com ampla distribuição ocorre desde o México e Antilhas até o Sul da Argentina e naturalizada ao leste da Austrália, Malásia e Ilhas do Pacífico (Pruski 1996).

No Brasil com ocorrência em todos os Estados, é conhecida popularmente como vedélia e tem como sinomímias *Wedelia trilobada*, *Wedelia paludosa* (Mondin & Bringel Jr 2013). Na medicina popular é muito utilizada contra gripes, resfriados, dores de cabeça, febre, infecções e patologias respiratória (Agra *et al.* 2008, Maldini *et al.* 2009, Meena *et al.* 2011). Estudos químicos com extratos vegetais identificaram flavonóides, ácidos caurenóicos e luteolina com atividade hipoglicemiante e analgésica (Bohlmann *et al.* 1981, Block *et al.* 1998, Bresciani *et al.* 2004). Carvalho *et al.* (2001) isolaram de extratos de flores, dois ácidos caurenóicos, estigmasterol, glicosídeos de estigmasterol, sitosterol e ésteres derivados do ácido oleanólico. A composição química dos óleos voláteis (Figura 6) é predominantemente de monoterpenos (Craveiro *et al.* 1993, Silva *et al.* 2012).

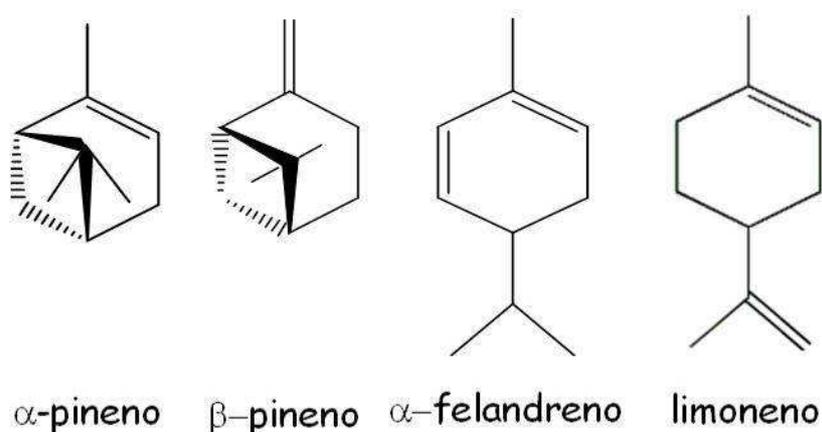


Figura 6. Estruturas químicas dos monoterpenos identificados no óleo volátil de *S. trilobata*.

Johnson (1969) revisando o gênero *Porophyllum* tribo Heleniae descreveu 27 espécies, entre elas *Porophyllum ruderale* Cass. O gênero tem como característica, capítulo discóides, pápus com cerdas escabras e folhas bem desenvolvidas. De ampla distribuição ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos, ao sul do Peru, norte da Argentina e sul do Brasil. Especula-se que o centro de distribuição do gênero ocorreu no México no período Mioceno (25 a 5 milhões de anos atrás).

Porophyllum ruderale Cass é uma erva anual, de ramos angulosos, glabros. Folhas simples, alternas, lâmina ovada com ápice arredondado e margens crenadas com glândulas translúcidas. Apresenta capítulos discóides, pedunculados, com brácteas involucrais, seriadas com glândulas translúcidas. Flores vermelhas, monoclinas. Cipselas negras, cilíndricas, 8,0 – 9,0 mm comp. Com pápus de 8,5 a 9,0 mm com cerdas creme, livres. Esta espécie possui duas subespécies: *P. ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *macrocephalum* (DC.) R.R. Johnson e *P. ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *runderale* que de acordo com Johnson (1969) a subespécie *macrocephalum* apresenta cipsela pubescentes maiores que 10 mm (Figura 7A). Para a subespécie *runderale*, as cipselas são mais curtas e com pápus maiores que as cipselas (Figura 7B). Outra característica atribuída as subespécies foi observada durante o trabalho. A partir do terceiro par de folhas de plântulas, a subespécie *macrocephalum* apresenta glândulas de óleos na margem e lâmina foliar, essa característica se mantém até o início da fase de frutificação quando o tamanho das folhas é reduzido e as glândulas de óleo estão presentes somente nas margens foliar. Na subespécie *runderale*, do primeiro ao último par de folhas, as glândulas estão localizadas apenas nas margens da folha.

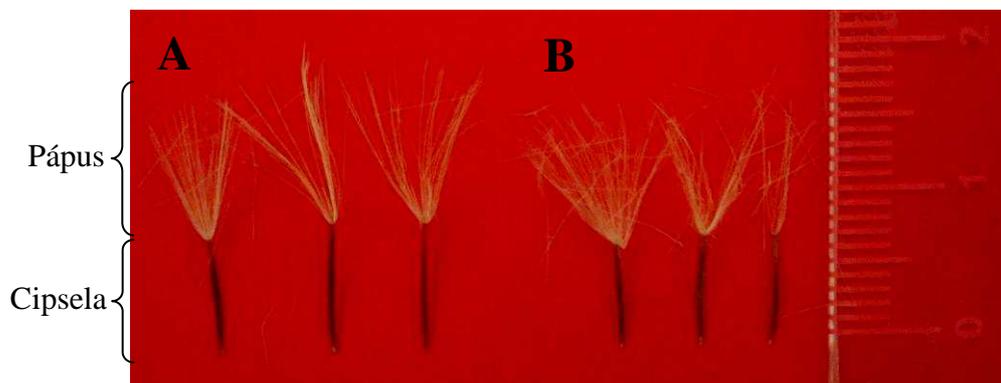


Figura 7. Frutos do tipo cipsela de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. **A:** *macrocephalum*; **B:** *runderale*

P. ruderales, conhecida popularmente como arnica é utilizada externamente no tratamento de ferimentos, escoriações, traumatismos e contusões (Lorenzi & Matos 2008). A composição química dos óleos voláteis foi estudada por diversos autores sendo constituída principalmente de monoterpenos sabineno, limoneno e β -felandreno (Loayza *et al.* 1999, Bezerra *et al.* 2002, Fonseca *et al.* 2006).

3.2 Locais de estudo

Para o desenvolvimento do presente estudo foram selecionadas duas áreas, no Estado de São Paulo, administradas pelo Instituto de Botânica: a Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu [MGÇ], em Mogi-Guaçu, área de Cerrado e a Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba [PARN], em Santo André, área de Mata Atlântica. Além destas localidades, *S. trilobata* e *P. ruderales* foram cultivados no Instituto de Botânica [IBt] área que compreende o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, um remanescente de Mata Atlântica na cidade de São Paulo.

O bioma de Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando cerca de 21% do território nacional, ficando atrás apenas da Amazônia (60%). O clima é tropical com duas estações bem definidas: seca no inverno e chuvosa no verão (Ab'Sáber 2009). Segundo Coutinho (1978) o Cerrado apresenta três fisionomias distintas: a campestre (campo limpo), a savânica (campo sujo, campo cerrado e cerrado propriamente dito) e a florestal (cerradão). Os solos são profundos, porosos, consistindo de uma mistura de areia e argila, com baixa retenção de água e pobre em nutrientes (Godoy & Felipe 1992).

Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu está localizada no Distrito de Martinho Prado Junior, Mogi-Guaçu (22°18'S e 47°11'W) é composta por duas áreas: gleba "A", coberta por vegetação de Cerrado, e a gleba "B", coberta por mata ciliar (De Vuono *et al.* 1982). Compreende uma área de ca. 340 ha com temperatura anual de 27°C e precipitação média anual de 1177 mm (Mantovani 1987).

O Bioma Mata Atlântica é constituído por matas tropicais pluviais que vão desde as planícies litorâneas até altitudes próximas a 2000 m no qual se estende desde o Rio Grande do

Norte até o Rio Grande do Sul. É uma floresta tropical ombrófila, densa, sempre verde (Coutinho 2009). Inicialmente, a Mata Atlântica cobria cerca de 15% do território brasileiro, aproximadamente 1.300.000 Km², mas devido a exploração desordenada por várias décadas, atualmente restam menos de 7% (Capobianco 2001). Em São Paulo, restam menos de 12% de cobertura florestal (INPE & Fundação SOS Mata Atlântica 2006).

Em 1909, Hermann von Irenge, então diretor do Museu Paulista, adquire com reservas próprias uma área de mata primitiva na qual foi chamada de “Estação Biológica do Alto da Serra” local preservado até hoje e mantido pelo Instituto de Botânica (Lopes & Kirizawa 2009). Hoje o local é a Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, uma unidade de Conservação de Mata Atlântica. Clima tropical de altitude, mesotérmico superúmido. A temperatura anual com baixa amplitude térmica variando entre 15 e 22°C, e precipitação de 3300 mm. Não há período de seca, é mais chuvoso no verão e menos chuvoso no inverno (Gutjahr & Tavares 2009).

O Instituto de Botânica está inserido ao Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Um remanescente de Mata Atlântica em meio a uma área intensamente urbanizada. Está localizado na parte sudeste do município de São Paulo, fazendo divisa com o município de Diadema. O PEFI apresenta uma área total de 526,38 ha, com temperatura média anual de 19°C e precipitação de 1540 mm (Fernandes *et al.* 2002).

A precipitação é um dado que chama bastante atenção entre os locais estudados. Em Paranapiacaba a precipitação chega a ser três vezes mais que em Mogi-Guaçu e duas vezes mais que o Instituto de Botânica. Já a temperatura máxima em Mogi-Guaçu é bem superior que as demais áreas.

Tendo em vista as diferentes características dos ambientes, a influência de fatores ambientais na composição química das plantas e o potencial econômico dos óleos voláteis, o objetivo geral deste estudo foi analisar o rendimento e composição química dos óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* e duas subespécies de *Porophyllum ruderale*.

O trabalho foi dividido em capítulos, abordando vários aspectos que influenciam a

composição do óleo volátil. Os Capítulos de 2 a 4 abordam a variação entre populações e atividade antifúngica, variação diuturna e influência da atmosfera enriquecida com CO₂ na composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata*. No Capítulo 5, é estudada a variação da composição química das subespécies de *P. ruderale* durante o ciclo de desenvolvimento em dois locais de cultivo.

Literatura citada

- Ab'Sáber, A.N.** 2009. Ecosystemas do Brasil. Metal Livros. São Paulo.
- Afshar, A.** 2011. A brief report about the concepts of hand disorders in the *Canon of Medicine* of Avicenna. *The Journal of Hand Surgery* 36:1509-1514.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., França, P.F. & Barbosa-Filho, J.M.** 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 472-508.
- Aharoni, A., Maarten, A.J., Kim, T.Y., Ri, M.R, Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. & Bouwmeester, J.H.** 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews* 5: 49–58.
- Almeida, A.M., Fonseca, C.R., Prado, P.I., Almeida-Neto, M., Diniz, S., Kubota, U., Braun, M.R., Raimundo, R.L.G., Anjos, L.A., Mendonça, T.G., Futada, S.M. & Lewinsohn, T.M.** 2005. Diversidade e ocorrência de Asteraceae em cerrados de São Paulo. *Biota Neotropica* 5:1-17.
- Altıntaş, A.** 2010. Rose, Rose water historical, therapeutics and culture perspectives. Maestro. Istanbul.
- Andrade, E.H.A., Carreira, L.M.M., Silva, M.H.L., Silva, J.D., Bastos, C.N., Sousa, J.C., Guimarães, E.F. & Maia, J.G.S.** 2008. Variability in essential oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry & Biodiversity* 5: 197-208.
- Anvisa** 2007. Resolução RDC 2 de 15 de janeiro de 2007.
- Ashcar, R.** 2007. A história do perfume da antiguidade até 1900. *Com Ciência – Revista eletrônica de jornalismo científico*. Disponível em <http://www.comciencia.br/comciencia/handler.php?section=8&edicao=28&id=329>. Acesso em: 06/07/2011.
- Baghalian, K., Abdoshaha, S.H., Khalighi-Sigaroodi, F. & Paknejad, F.** 2011. Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 201-207.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M.** 2008. Biological effects of essential oils – A review Food and Chemical Toxicology 46:446-475.
- Bezerra, M.Z.B., Andrade-Neto, M. & Freitas, R.M.** 2002. The Essential Oil of *Porophyllum ruderale* Cass (Asteraceae). The Journal of Essential Oil Research 14:14-15.
- Block, L.C., Santos, A.R.S., Souza, M.M., Scheidt, C., Yunes, R.A., Santos, M.A., Monache, F.D. & Cechinel-Filho, V.** 1998. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. Journal of Ethnopharmacology 61:85-89.
- Bohlmann, F., Ziesche, J., King, R.M. & Robinson, H.** 1981. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an *ent*-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia*. Phytochemistry 20:751-756.
- Bouvier, F., Rahier, A. & Camara, B.** 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. Progress in Lipid Research 44: 357-429.
- Bowsher, C., Steer, M., Tobin, A., Cornelius, D.P., Rayburn, M. & Mantauk B.B.** 2008. Plant Biochemistry Garland Science. New York.
- Bremer, K.** 1994. Asteraceae – Cladistic and classification. Timber press. Portland.
- Bresciani, L.F., Yunes, R.A., Burger, C., Oliveira, L.E., Bóf, K.L. & Cechinel-Filho V.** 2004. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). Z. Naturforsch C 59: 229-232.
- Bruneton, J.** 2001. Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales. 2. ed. Editora Acribia. Zaragoza.
- Bryan, C.P.** 1930. The Papyrus Ebers. Translated from the Germain Version. The Garden City Press. London.
- Bueno, M.R.** 2009. História das ervas mágicas e medicinais. Madras. São Paulo.
- Bylaitè, E., Venskutonis, R., Roozen, J. & Posthumus, M.A.** 2000. Composition of essential oil of costmary [*Balsamita major* (L.) Desf.] at different growth phases. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 2409-2414.

- Capobianco, J.P.R.** 2001. Dossiê Mata Atlântica. Ipsis. Brasília.
- Carreira, R.C.** 2007. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica. São Paulo.
- Carrilho, E., Tavares, M.C.H. & Lanças, F.M.** 2001. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. *Química Nova* 24: 509-515.
- Carvalho, G.J.A., Cravalho, M.G., Ferreira, D.T., Faria, T.J. & Braz-Filho R.** 2001. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa* *Química Nova* 24: 24-26.
- Carvalho, J.C.T., Gosmann, G. & Schenckel E.P.** 2003. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. *In: Simões, C.M.O., Schenckel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C. P., Mentz, L.A. & Petrovick, (orgs). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis: Ed. UFSC.*
- Carvalho, M.G., Alves, C.C.F., Werle, A.A. & Braz-Filho R.** 2006. Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 497-500.
- Castel, C., Fernandez, X., Filippi, J.J. & Brun J.P.** 2009. Perfumes in Mediterranean antiquity. *Flavour and Fragrance Journal* 24: 326-334.
- Castellani, D.C., Casali, V.W.D., Souza, A.L., Cecon, P.R., Cardoso, C.A. & Marques V.B.** 2006. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8: 104-107.
- Chericoni, S., Flamini, G., Campeol, E., Cioni, P.L. & Morelli, I.** 2004. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochemical Systematics and Ecology* 32:423-429.
- Coutinho, D.F., Agra, M.F., Basílio, I.J.L.D. & Barbosa-Filho J.M.** 2006. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae – Lauroideae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 537-544.
- Coutinho, L.M.** 1978. O conceito de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 1:17-23.

- Coutinho, L.M.** 2009. O conceito de Mata Atlântica *In*. Lopes M.I.M.S., Kirizawa M., Melo M.M.R.F. (orgs.) Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Cowen, L.D. & Helfand, H.W.** 1988. Pharmacy: An illustrated history. Harryn Abrams Incorporated.
- Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., Mahado, M.I.L. Krush, A. & Silva M.G.C.** 1993. Volatile Constituents of two *Wedelia* species. *Journal of Essential Oil Research* 5: 439-441.
- Curado, MA., Oliveira, C.B.A., Jesus, J.G., Santos, S.C., Seraphin, J.C. & Ferri P.H.** 2006. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides* *Phytochemistry* 67:2363–2369.
- De Vuono, Y.S., Barbosa, L.M. & Batista E.A.** 1982. A Reserva Biológica de Moji-Guaçu. *Silvicultura em São Paulo* 16a: 548-558.
- Dewick, P.M.** 2009. Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons.
- Di Stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Santos, C.M. & Guimarães E.M.** 2002. Asterales medicinais. *In*: Di Stasi L.C.; Hiruma-Lima C.A. (Eds) Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica Editora UNESP. São Paulo.
- Dias, J.P.S.** 2005. A farmácia e a história. Universidade de Lisboa. Portugal
- Dias, S.M., Silva, R.R.** 1996. Perfumes uma química inesquecível. *Química Nova na Escola* 4: 3-6
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon J.** 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* 135: 1893-1902.
- Farago P.V., Budel J.M., Duarte M.R., Nakashima T.** 2005. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15: 250-255.
- Fernandes, A.J., Reis, L.A.M. & Carvalho A.** 2002. Caracterização do Meio Físico. *In*: Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds.) Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. pp. 51-62.

- Ferreira, S.C., Carvalho-Okano, R.M. & Nakajima J.N.** 2009. A família Asteraceae em um fragmento florestal, Viçosa, Minas Gerais, Brasil *Rodriguésia* 60: 903-942.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. & Scheffer J.J.C.** 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 213–226.
- Fonseca, M.C.M., Barbosa, L.C.A., Nascimento, E.A. & Casali V.W.D.** 2006. Essential oil from leaves and flowers of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research* 18: 345-347.
- Gallo, M.A.** 2008. History and scope of toxicology *In: Klaassen C.D. (eds.) Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons.* Mc Graw Hill. New York.
- Gershebzon, J. & Dudareva, N.** 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3: 408-414.
- Godoy, S.M.A. & Felipe, G.M.** 1992. Crescimento inicial em *Qualea grandiflora*, uma árvore dos cerrados. *Revista Brasileira de Botânica* 15(1): 23-30.
- Gottlieb, O.R.** 1990. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry* 29: 1715-1724.
- Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C. & Borin, M.R.M.B.** 1996. Biodiversidade um enfoque químico-biológico. Editora UFRJ. Rio de Janeiro.
- Guenther, E.** 1960. The essential oils. vol.1. D. Van Nostrand Company. New Jersey.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. Clima *In: Lopes M.I.M.S., Kirizawa M., Melo M.M.R.F. (orgs.) Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba.* Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Harborne, J.B.** 1993. Introduction to ecological biochemistry. 4ed. Academic Press. London
- Harborne, J.B.** 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Products Reports* 18: 361-379.
- Harder U. & Oelkers E.** 1993. New perfume compositions containing novel fragrance ingredients. *In: Hopp R. & Mori K. (eds.). Recent developments in flavour and fragrance chemistry.* VCH. Germany.

- Haslam, E.** 2001. Plant Secondary Metabolism. Encuclopedia of Life Sciences John Wiley & Sons.
- Higby, G.J.** 2000. Evolution of Pharmacy. *In.* Remington J.P. Tehe science and practice of pharmacy. Lippincott. Philadelphia.
- Hughes, G.H.** 1956. The cosmetic arts in ancient Egypt. Journal of the Society of Comestic Chemists 10: 159-176.
- Hulse, J.H.** 2004. Biotechnologies: past history, present state and future prospects. Trends in Food Science & Technology 15: 3-18.
- INPE & SOS Mata Atlântica.** 2006. Atlas dos Remanescentes Florestais do Domínio Mata Atlântica 2000-2005. São Paulo: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, e Fundação SOS Mata Atlântica.
- Johnson, R.R.** 1969. Monograph of the plant genus *Porophyllum* (Compositae: Helenieae). Science Bulletin 48:225-267.
- Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M.J. & Portugal H.** 2005. Southern french thyme oils: chromatographic study of chemotypes. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 2437-2444.
- Kelen, M. & Tepe, B.** 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. Bioresource Technology 99: 4096-4104.
- Kelsey, R.G., Reynolds, G.W. & Rodriguez E.** 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. *In:* Rodriguez E., Healey, P.L. & Mentha, I. (eds) Biology and chemistry of plant trichomes Plenum Press.
- Kremers, E. & Urdang G.** 1976. History of Pharmacy 4^a ed. Lippincott Philadelphia.
- Krief, S., Hladik, C.M., Haxaire, C.** 2005. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. Journal of Ethnopharmacology 101: 1-15.
- Lago, J.H.G., Romoff, P., Fávero, O.A., Souza, F.O., Soares, M.G., Baraldi, P.T. & Corrêa A.C.** 2008. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. Biochemical Systematics and Ecology 36: 737-740.

- Lietava, J.** 1992. Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave shanidar IV? *Journal of Ethnopharmacology* 35: 263-266.
- Loayza, I., Groot, W., Lorenzo, D., Delacassa, E., Mondello, L. & Dugo G.** 1999. Composition of the essential oil of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal* 14: 393-398.
- Lopes, M.I.M.S. & Kirizawa, M.** 2009. Reserva Biológica de Paranapiacaba, a antiga Estação Biológica do Alto da Serra: histórias e visitantes ilustres. *In.* Lopes M.I.M.S., Kirizawa M., Melo M.M.R.F. (orgs.) Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Lorenzi, H. & Matos, F.J.A.** 2008. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Instituto Plantarum. Nova Odessa.
- Maffei, M.E.** 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76: 612-631.
- Mahmoud, S.S. & Croteau, R.B.** 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in plant Science* 7:366-373.
- Majerowicz, N.** 2008. *In:* Kerbauy G.B. *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan.
- Maldini, M., Sosa S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balick, M.J., Pizza, C. & Loggi, R.D.** 2009. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 430–433.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** 1993. Florística do cerrado na Reserva Biológica de Moji Guaçu, SP. *Acta Botanica Brasilica* 7: 33-60.
- Mantovani, W.** 1987. Análise florística e fitossociológica do estrato herbáceo-subarbustivo do cerrado na Reserva Biológica de Moji Guaçu e em Itirapina, SP. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Maul, A.A., Wasicky, R. & Bacchi, E.M.** 1996. Extração por fluido supercrítico. Revista Brasileira de Farmacognosia 5: 185-200.
- Meena, A.K., Rao, M.M., Meena, R.P. & Panda P.** 2011. Pharmacological and Phytochemical Evidences for the Plants of *Wedelia* Genus– A Review Asian Journal of Pharmaceutical Research 1: 07-12.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L.** 1950. Anatomy of the Dicotyledons vol II. Oxford at the Clarendon Press.
- Mirjana, S., Nada, B. & Valerija D.** 2004. Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. Essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. European Food Research and Technology 218: 367-371.
- Mondin, C.A. & Bringel Jr., J.B.A.** 2013. *Sphagneticola* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB016304>).
- Moraes, M.D. & Monteiro R.** 2006. A família Asteraceae na planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo. Hoehnea 33: 41-78.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M.** 1999. The influence of natural products upon drug discovery. Natural Products Reports 17:215-234.
- Newton, P.N. & Nishida, T.** 1990. Possible Buccal Administration of Herbal Drugs by wild Chimpanzees *Pan troglodytes*. Animal Behavior 39: 798-801
- Oliveira, S.M.M. & Jose, V.L.A.** 2007. Processos de extração de óleos essenciais. Dossiê Técnico. Paraná. Instituto de Tecnologia do Paraná.
- Owen, S.M. & Peñuelas, J.** 2005. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. Trends in Plant Science 10: 420-426
- Pastore, M., Rodrigues, R.S., Simão-Bianchini, R. & Filgueiras T.S.** 2012. Plantas exóticas invasoras na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba Santo André – SP. Instituto de Botânica. Secretaria do Meio Ambiente.

- Perez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Pála-Paúl, J. & Sanz J.** 2003. *Artemisia pedemontana* gathered in Spain: chemotype camphor-1,8-cineole and chemotype davanone. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:77–84.
- Phillips, M.A. & Concepción M.R.** 2010. Terpenoids: lower *In: Encyclopedia of Life Sciences* John Wiley & Sons. Chichester.
- Pino, J.A., Marbot, R., Payo, A., Chão, D. & Herrera P.** 2006. Aromatic plants from western Cuba VII. Composition of the leaf oils of *Psidium wrightii* Krug et Urb., *Lantana involucrata* L., *Cinnamomum montanum* (Sw.) Berchtold et J. Persl. And *Caesalpinia violaceae* (Mill.) Standley. *Journal of Essential Oil Research* 18: 170-174.
- Pioreschi, P.** 2006. Paracelsus: a reevaluation *Annales Pharmaceutiques Françaises* 64:52-62.
- Pruski, J.F.** 1996. Compositae of the Guayana Highland---XI. *Tuberculocarpus* gen. nov. and some other Ecliptinae (Heliantheae) *Novon* 6:404-418.
- Pybus, D.** 2006. The history of aroma chemistry and perfume. *In: Pybus D. & Sell C. (eds.) The chemistry of fragrances.* RSC. Cambridge.
- Raman, R., & Kandula, S.** 2008. Zoopharmacognosy self-Medication in wild Animals. *Resonance* 13: 245-253.
- Reis, E.S., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Correa, R.M., Paula, J.R., Andrade, S.T. & Ferri P.** 2010. Seasonal Variation in Essential Oils of *Lychnophora pinaster* Mart. *Journal of Essential Oil Research* 22: 147-149.
- Ritter, L.M.O., Ribeiro, M.C. & Moro R.S.** 2010. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR Brasil – limite austral do bioma. *Biota Neotropica* 10:379 – 414.
- Sangwan Farooqi, A.H.A., Shabih, F., & Sangwan, R.S.** 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21.

- Santos, A.S., Alves, S.M., Figueiredo, F.J.C. & Neto, O.G.R.** 2004. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado técnico 99. Belém. Embrapa Amazônia Oriental.
- Sayuri, V.A., Romoff, P., Favero, O.A., Ferreira, M.J.P., Lago, J.H.G. & Buturi F.O.S.** 2010. Chemical Composition, Seasonal Variation, and Biosynthetic Considerations of Essential Oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity* 7: 2771-2782.
- Schiestl, F.P.** 2010. The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters* 13: 643-656.
- Silva, M.G.V., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L. & Alencar, J.W.** 1999. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 70: 32-34.
- Silva, G.A.R.** 2008. A subtribo *Ecliptinae* Less (Heliantheae – Asteraceae) na Amazônia brasileira. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia.
- Silva, C.J., Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J. Montanari, R.M., Francino, D., Meira, R.M.S.A. & Souza A.O.** 2012. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 482-489.
- Simões, C.M.O. & Spitzer V.** 2003. Óleos Voláteis. *In*: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C. P., Mentz L.A., Petrovick, (orgs). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Ed. UFSC.
- Souza, F.O.** 2007 Asteraceae no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânico.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed
- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B. & Ehlers B.** 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology* 29: 859-880.

Verma, R.S., Rahman, L., Verma, R.K., Chauhan, A., Singh, A. Chanotiya, C.S., Yadav, A., Singh, A.K., Kukreja, A.K. & Khanuja S.P.S. 2010. Journal of Essential Oil Research. 22: 340-343.

Verma, R.K., Chauhan, A., Verma, R.S. & Gupta A.K. 2011. Influence of planting date on growth, artemisinin yield, seed and oil yield of *Artemisia annua* L. under temperate climatic conditions. Industrial Crops and Products 34: 860-864.

Vurro, E., Bruni, R., Bianchi, A. & Toppi L.S. 2009. Elevated atmospheric CO₂ decreases oxidative stress and increases essential oil yield in leaves of *Thymus vulgaris* grown in a mini-FACE system Environmental and Experimental Botany 65: 99–106.

Wink M. 2010 Secondary Metabolites: Deterring Herbivores. *In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons.

Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L & Maia J.G.S. 1998. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. Flavour and Fragrance Journal 13: 47- 48.

**Composição química e atividade antifúngica dos óleos voláteis de
Sphagneticola trilobata (L.) Pruski em diferentes biomas, Mata
Atlântica e Cerrado, do Estado de São Paulo.**

Resumo

Sphagneticola trilobata (Asteraceae) popularmente conhecida como vedélia é muito utilizada na medicina popular. A origem geográfica, características do solo e diferenças climáticas influenciam quantitativamente e/ou qualitativamente a composição química de óleos voláteis. O presente trabalho analisou a composição química e atividade antifúngica dos óleos voláteis de *S. trilobata* coletada em dois biomas do Estado de São Paulo: duas populações de Mata Atlântica uma nativa (Paranapiacaba [PARN]) e outra cultivada (Instituto de Botânica [IBt]) e uma população de Cerrado (Mogi-Guaçu [MGÇ]), durante dois anos. Partes aéreas de folhas frescas foram hidrodestiladas em aparelho do tipo Clevenger durante quatro horas e o óleo foi analisado por CG/EM. A composição química dos óleos voláteis obtidos nas três localidades foi quantitativamente distinta. Os principais componentes foram α -pineno (8,2 – 30,0%), β -pineno (2,9 – 47,3%), α -felandreno (3,3 – 31,0%), limoneno (2,6 – 16,2%), β -cariofileno (1,3 – 14,4%) e germacreno D (2,6 – 12,0%). A atividade antifúngica foi determinada pelo método de bioautografia direta frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. As amostras dos óleos de PARN foram as mais ativas frente aos fungos testados.

Palavras-chave: atividade antifúngica, óleo essencial, variação sazonal, *Wedelia*.

Abstract

Sphagneticola trilobata (Asteraceae) commonly known as *vedélia*, is widely used in folk medicine. The geographical origin, soil characteristics and climate differences may influence quantitatively and/or qualitatively the chemical composition of essential oils. The present work analysed the composition and antifungal activity of the volatile oils from *S. trilobata* collected at two biomes from São Paulo state: two populations from Atlantic Rain Forest one native (Paranapiacaba [PARN]) and other cultivated (Instituto de Botânica [IBt]) and one from the Brazilian Cerrado (Mogi-Guaçu [MGÇ]), during two years. Fresh aerial parts were hydrodistilled in a Clevenger apparatus during four hours and the oil was analysed by GC/MS. The chemical composition of the volatile oils obtained from these three locations was quantitatively distinct. The main components were: α -pinene (8,2 – 30,0%), β -pinene (2,9 – 47,3%), α -phellandrene (3,3 – 31,0%), limonene (2,6 – 16,2%), β -cariofilene (1,3 – 14,4%) and germacrene D (2,6 – 12,0%). The antifungal activity was determined by the bioautography with the fungus *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. The sample oils from PARN were more active against the fungi tested.

Keywords: antifungal activity, essential oil, seasonal variation, *Wedelia*.

Introdução

Sphagneticola trilobata (L.) Pruski (Asteraceae) é uma planta herbácea com ampla distribuição, ocorrendo desde o México e Antilhas até o Sul da Argentina e naturalizada ao leste da Austrália, Malásia e Ilhas do Pacífico (Pruski 1996).

No Brasil, ocorre em todas as regiões, é conhecida popularmente como vedélia (Mondin & Bringel Jr 2010) e muito utilizada na medicina popular contra gripes, resfriados, dores de cabeça, febre, infecções e patologias respiratória (Agra *et al.* 2008, Maldini *et al.* 2009, Meena *et al.* 2011, Balekar *et al.* 2012). Diferentes compostos foram isolados a partir do extrato de folhas, ramos e raiz, como luteolina, ácidos caurenóicos, lactonas sesquiterpênicas do tipo eudesmano e tiofeno (Bohlmann *et al.* 1981, Ferreira 1994, Bresciani *et al.* 2000, Li *et al.* 2007, Govindappa *et al.* 2011, Meena *et al.* 2011). Além destes constituintes, estudos realizados por Craveiro *et al.* (1993), Li *et al.* (2012) e Silva *et al.* (2012) identificaram monoterpenos como componentes predominantes na composição química do óleo volátil.

A composição química dos óleos voláteis pode ser modulada quali-e / ou quantitativamente por fatores externos tais como o clima e qualidade do solo (Vuuren *et al.* 2007). A exposição a estes fatores exógenos durante um longo período pode alterar a expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de compostos voláteis, levando ao aparecimento de ecótipos ou quimiotipos na mesma espécie de planta (Barra 2009). Assim, o estudo da variabilidade química dentro dos óleos voláteis de *S. trilobata* é uma abordagem importante para a aplicação potencial comercial deste recurso natural. Neste sentido, este estudo teve como objetivo analisar a composição química e a atividade antifúngica de óleos voláteis de *S. trilobata* coletada em dois diferentes biomas do estado de São Paulo: duas populações da Mata Atlântica (Instituto de Botânica e Paranapiacaba) e uma de Cerrado (Mogi-Guaçu) durante dois anos.

Material e métodos

Material vegetal

Foram coletadas as partes aéreas de indivíduos de *Sphagneticola trilobata* provenientes de três localidades: Núcleo de Pesquisa de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, São Paulo, SP (23°38'S e 46°37'W) cujos indivíduos foram adquiridos no viveiro Meio Ambiente Viveiro Florestal e plantados em canteiro medindo ca. 3,40 x 0,75 m, tendo como substrato terra proveniente de Mata Atlântica (Figura 1B); Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (23°46'S e 46°18'W), ambos do bioma de Mata Atlântica (Figura 1C), e Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (22°18'S e 47°11'W) (Figura 1D). Exsicatas foram identificadas pela Dr. Inês Cordeiro e depositadas no Herbário Científico do Estado “Maria Eneyda P. K. Fidalgo” (SP) do Instituto de Botânica com o número do coletor: Raggi 25 (Instituto de Botânica), Raggi 17 (Paranapiacaba) e Nascimento 122 (Mogi-Guaçu).

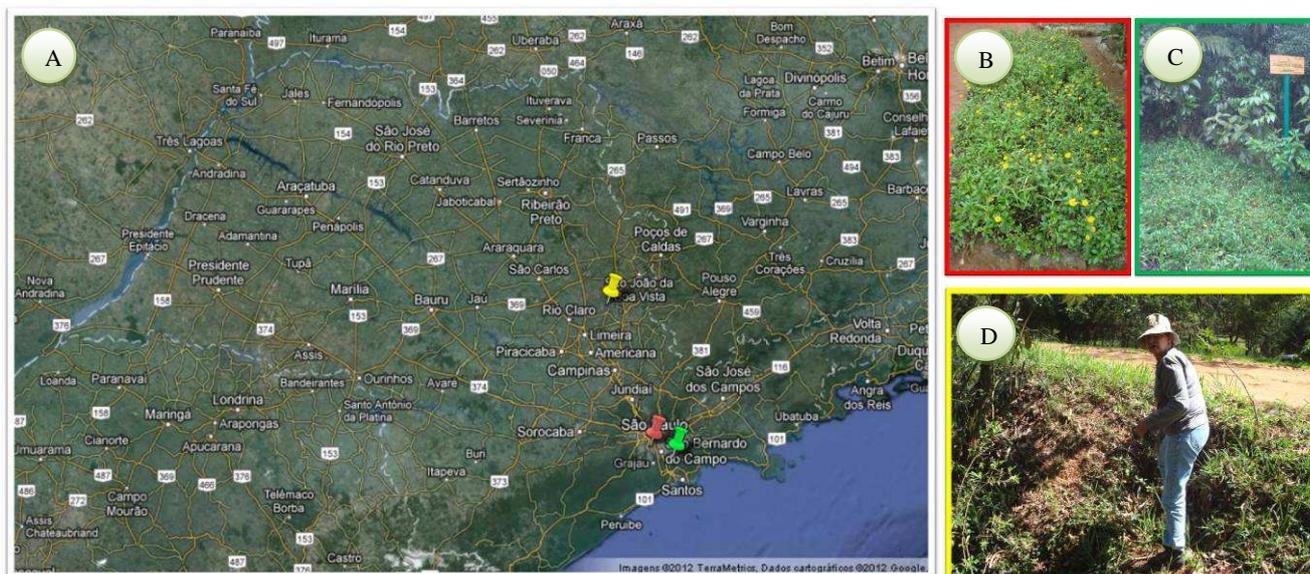


Figura 1. **A)** Mapa do Estado de São Paulo (Fonte: Google Maps) indicando os locais de coleta. Marcação em vermelho (Instituto de Botânica) e verde (Paranapiacaba) correspondem às coletas realizadas no bioma Mata Atlântica, marcação em amarelo corresponde ao ponto de coleta no bioma Cerrado (Mogi-Guaçu). **B-D)** Fotos dos locais de coleta. **B)** Instituto de Botânica; **C)** Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba; **D)** Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu.

Extração e identificação de óleos voláteis

As coletas foram realizadas por volta das 10:30 h, no ápice de cada estação do ano, durante os anos de 2009, 2010 e 2011, iniciando-se no inverno de 2009. O material fresco coletado, 600 g de partes aéreas, foi separado em três partes e congelado em freezer à -22 °C para posterior extração. A extração do óleo volátil foi realizada por hidrodestilação em processo contínuo com aparelho do tipo Clevenger, por 4 horas, em três repetições (Farmacopéia 2001). O óleo foi separado com pentano e secado com sulfato de sódio anidro. O pentano foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório à temperatura ambiente, em sala climatizada. O óleo obtido foi armazenado em frasco com tampa, em freezer a - 22 °C para posterior análise.

O rendimento de cada óleo foi calculado a partir da massa fresca de material vegetal. Os óleos voláteis extraídos foram diluídos em acetona 1:10 (v:v) e 1 µL de cada amostra diluída foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se cromatógrafo a gás Agilent (serie 6890) acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo (5973), com coluna capilar HP 5-MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, com 0,25 µm de espessura), operando a 70 eV. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C . A programação da temperatura do forno foi de 40 °C por 1 min, 40 a 240 °C a 3 °C min⁻¹ e 240 °C por 10 min com tempo total de análise de 77,6 min, utilizando hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). O índice de retenção (IR) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcenos (C₈ a C₃₀) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica. A identificação dos compostos foi feita por comparação entre os espectros de massas obtidos com aqueles registrados na base de dados da biblioteca Willey 275 e Adams (2007).

Atividade antifúngica frente a *Cladosporium sphaerospermum* Penzig e *C. cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries

A atividade antifúngica foi determinada através do método de bioautografia direta com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* (CCIBt 491) e *C. cladosporioides* (CCIBt 140) segundo Homans & Fuchs (1970). No ensaio inicial foram aplicados 10 µL correspondendo a 200 µg de cada amostra, em placas de sílica gel Merck 60_{F254} como suporte, para detectar a atividade do óleo. As placas foram borrifadas com uma suspensão de conídios ($> 2 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹) em solução de sais e glicose (6:1) e incubadas por 48h em câmara úmida a 25 °C. Para o controle positivo foi utilizado o antifúngico sintético Nistatina e timol (5 µg). A atividade antifúngica é detectada pelo aparecimento de manchas claras sobre o fundo escuro do crescimento micelial. Para as amostras que apresentaram forte atividade com 200 µg de óleo, foi determinado o limite de detecção utilizando 200, 100, 50, 25 e 10 µg de óleo. Todos os ensaios foram realizados em duas repetições.

Análise estatística

Foi utilizada análise de variância unidirecional (ANOVA) e aplicado o teste Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo dos teores dos óleos voláteis, os dados foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ onde x se refere ao cálculo da área em %.

Resultados e discussão

Os dados de temperatura, máxima e mínima, precipitação e umidade relativa do ar registrados no Instituto de Botânica (IBt), Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (PARN) e Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MGÇ), entre o período de agosto/2009 a agosto/2011 são mostrados na Figura 2.

As médias das temperaturas, máxima e mínima, de PARN e SP são em torno de 25°C e 18°C, respectivamente. Na região de Paranapiacaba a precipitação anual foi de 2400 mm, em SP 2050 mm e 1300 mm em MGÇ. No período de 1976 a 2000 a média anual da precipitação na área do Instituto de Botânica foi de 1540 mm e a temperatura variou entre 15°C e 22°C (Santos & Funari, 2002). Dados históricos de precipitação anual em Paranapiacaba no período de 1969 a 1998 registraram 4400 mm no ano mais chuvoso (1976) e 2794 mm no ano menos chuvoso (1984) segundo Gutjahr & Tavares (2009). É possível observar que em MGÇ há maior amplitude térmica quando comparado com as outras duas localidades, e duas estações bem definidas; uma quente e chuvosa e outra mais fria e seca (Figura 2. C), característica típica de área de cerrado (Mantovani & Martins 1993).

Na Figura 3 são mostrados os dados de rendimento (mg.g^{-1} massa fresca) dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas em três locais distintos. De acordo com os dados apresentados foi possível observar que as plantas mantidas em cultivo no Instituto de Botânica produziram maior quantidade de óleo volátil que variou significativamente entre as coletas ($0,28\text{mg.g}^{-1}$ de massa fresca no inverno do ano I a $2,44$ no verão do ano II). Essa variação pode ser em função da temperatura, pois foi observado que com o aumento da temperatura há aumento do óleo e sua diminuição ocasiona diminuição no rendimento, exceto para a coleta de outono do ano I (Figura 2. A e Figura 3). Em Paranapiacaba, embora os rendimentos não apresentassem diferença significativa, nos períodos de inverno a produção do óleo volátil também foi menor, $0,50$ a $0,55$ mg.g^{-1} MF dos anos I e II, respectivamente. Em MGÇ não houve aumento no rendimento dos óleos

voláteis em decorrência do aumento de temperatura mas, no inverno os menores rendimento foram obtidos.

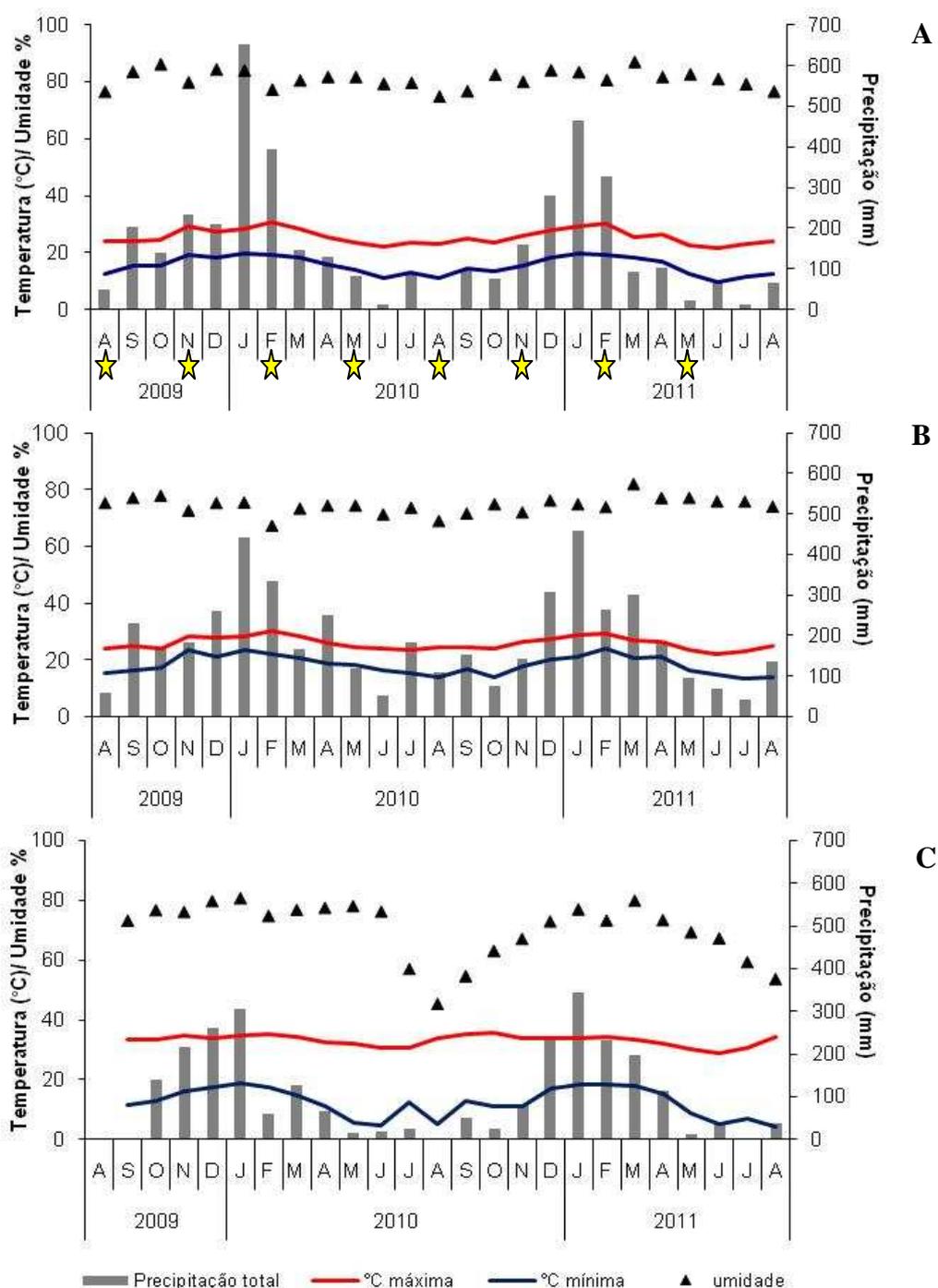


Figura 2. Média da temperatura máxima e mínima, umidade relativa do ar e precipitação total mensal dos locais de coleta: Instituto do Botânica (A); Paranapapiacaba (B) e Mogi-Guaçu (C). ★ mês de coleta. Fonte: Estação Meteorológica do IAG/USP (A); Somar (B); e Estação Meteorológica da International Paper (C).

Os rendimentos dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas em PARN e MGÇ foram mais constantes quando comparados com SP. Em PARN o menor rendimento obtido foi de $0,49 \text{ mg.g}^{-1}$ na primavera do ano II e o maior foi de $0,86 \text{ mg.g}^{-1}$ no outono do ano II. Em MGÇ os rendimentos variaram de $0,77 \text{ mg.g}^{-1}$ na coleta de inverno do ano I a $1,42 \text{ mg.g}^{-1}$ na primavera do ano II (Figura 3).

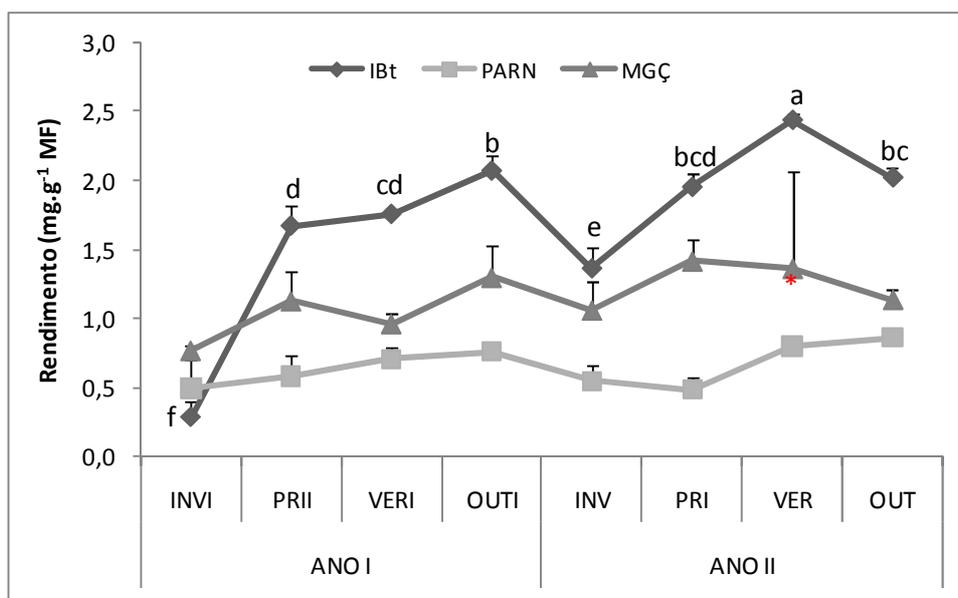


Figura 3. Rendimento médio (mg.g^{-1} de massa fresca) dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas em dois biomas: Mata Atlântica (IBt e PARN) e Cerrado (MGÇ). Letras iguais não diferem entre si ($p \leq 0,05$); as barras representam o desvio padrão. * parte de uma das amostras foi perdida durante o processo de secagem.

Em Minas Gerais, o cultivo de *S. trilobata* apresentou resultados diferentes dos demonstrados neste trabalho, onde o maior rendimento foi obtido no inverno e o menor no verão (Silva *et al.* 2012). Segundo Franz & Novak (2010) a formação dos óleos voláteis em plantas é altamente dependente das condições climáticas como comprimento do dia, irradiância, temperatura e disponibilidade de água. Figueiredo *et al.* (2008) relata que é óbvia a diminuição na produção de voláteis em plantas em meses com menor intensidade luminosa e temperatura (inverno) provavelmente isso pode estar relacionado à atividade fotossintética das plantas. Por outro lado

Carreira (2007) obteve maior rendimento de óleo volátil de *Baccharis trimera* no período de inverno em área de Cerrado (menor temperatura e precipitação). O rendimento dos óleos voláteis de manjerição *Ocimum basilicum*, *Salvia africana-caerulea* e *Tetradernia riparia* também foram maiores no inverno (Hussain *et al.* 2008, Kamatou *et al.* 2008, Gazim *et al.* 2010) portanto, não só intensidade luminosa e a temperatura influenciam o teor de óleos voláteis em plantas.

Os componentes dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletada em diferentes regiões (duas regiões de Mata Atlântica – SP e PARN – e uma de Cerrado – MGÇ) do estado de São Paulo são apresentados nas Tabelas 1 e 2 dos anos I e II, respectivamente, e as classes terpênicas são mostradas na Figura 4.

A composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletada no IBt é composta majoritariamente de monoterpenos, variando entre 85,6% (inverno ano II) a 92,6% (verão ano I), excetuando a primeira coleta de inverno do ano I que apresentou 44,4% desses componentes. Em contrapartida, o teor de sesquiterpenos no inverno I foi de 48,5% sendo 9,6% de sesquiterpenos oxigenados.

Em PARN o maior teor de monoterpenos foi encontrado na última coleta (outono ano II) perfazendo um total de 76,6% do total identificado, e o menor teor foi de 51,7% na coleta realizada na primavera do ano II. Os teores de sesquiterpenos variaram entre 22,2% (outono ano II) e 41% (inverno ano I). Em MGÇ também houve predominância de monoterpenos, porém em concentrações mais baixas que em SP e mais elevadas que PARN. O maior teor encontrado foi de 84,2% no verão ano II e o menor foi no verão anterior 59,4%. Silva *et al.* (2012) observaram a inversão das proporções de sesquiterpenos e monoterpenos ao longo do ano em *S. trilobata*. O teor de sesquiterpenos variou de 86,4% a 25,5%, já o conteúdo de monoterpenos variou de 22,9% a 72,3%.

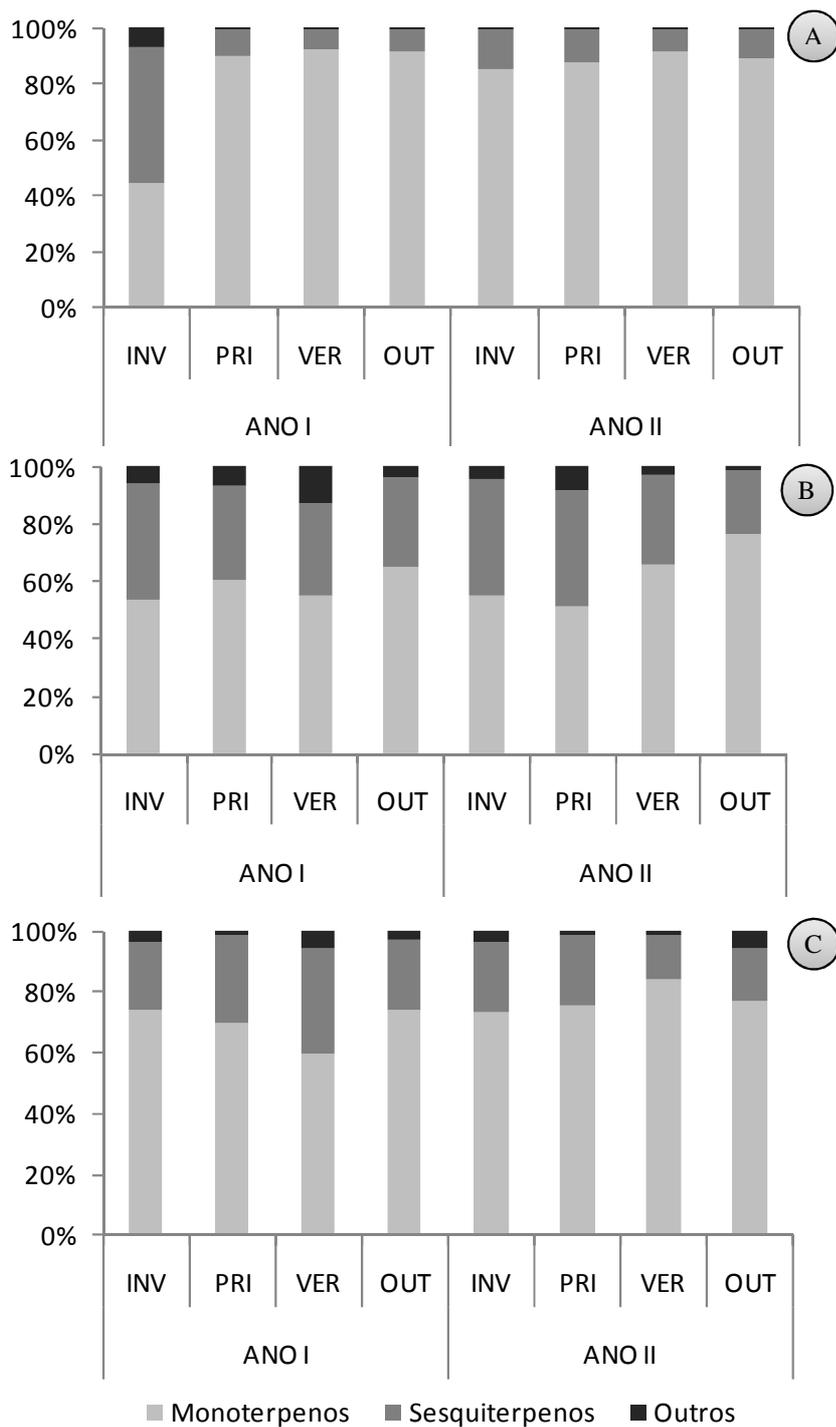


Figura 4. Classes terpênicas presentes nos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas no Instituto de Botânica (A) e Paranapiacaba (B), regiões de Mata Atlântica e no Cerrado em Mogi-Guaçu (C) durante dois anos consecutivos.

No total, 39 componentes foram identificados no óleo volátil de *S. trilobata*. Qualitativamente não foram encontradas grandes diferenças entre os locais de coleta, alguns componentes em menores proporções tiveram distribuição restrita como, a ausência do monoterpeno canfeno em MGÇ, do sabineno em PARN, Z e *E*- β -ocimeno em SP, a presença do acetato de bornila nas coletas de inverno e primavera dos dois anos em PARN, do sesquiterpeno dauca-5-8-dieno em PARN, e do α -farneseno em MGÇ, porem quantitativamente grandes diferenças foram encontradas.

Na composição química do óleo volátil de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas no Instituto de Botânica, o monoterpeno β -pineno foi o constituinte majoritário variando entre 20,3 % (inverno ano I) a 47,3% (verão e outono ano II). De acordo com a análise estatística, a coleta de inverno do ano I diferiu significativamente nos teores de quase todos os componentes do óleo. Os monoterpenos α -pineno, α -felandreno e limoneno apresentaram teores menores na primeira coleta aumentando nas demais. Já os teores dos sesquiterpenos β -cariofileno, germacreno-D e espatulenol na primeira coleta foram de 14,4%, 12% e 5,5% diminuindo para 1,3%, 2,6% e 0,9%, respectivamente, nas demais coletas.

Em Paranapiacaba, os componentes majoritários foram: α -pineno (18,7- 28,9%), β -pineno (15,3 – 21,8%), α -felandreno (3,9 – 14,1%), β -cariofileno (5 – 12,4%), e germacreno-D (4,2 – 9,3%).

Os componentes principais do óleo volátil de Mogi-Guaçu variaram entre os dois anos tendo no primeiro ano como compostos majoritários α -felandreno (16,4 – 24,7%), α -pineno (19,9 – 21,4%), limoneno (11 – 15,8%), β -cariofileno (5,2 – 8,3%) e germacreno-D (5,6 – 7,3%) e no segundo ano, α -pineno (23,4 – 30%), α -felandreno (12,3 – 31,9%) e limoneno (14,1 – 16,5%).

A presença de monoterpenos como constituintes majoritários também foi observada em outras espécies de *Wedelia*, antigo gênero da planta estudada. *Wedelia chinensis* tem como constituinte majoritário o monoterpeno α -pineno (Garg *et al.* 2005), em *Wedelia glauca* 94% do

óleo era composto de monoterpenos tendo como compostos majoritários limoneno, sabineno e α -pineno (Bailac *et al.* 2005). Nirmal *et al.* (2005) identificaram α -pineno (78,64%), limoneno (2,97%) e germacreno D (3,91%) nos óleos voláteis de *W. trilobata* coletadas na Índia. Li *et al.* (2012) identificaram como componentes principais α -felandreno (28,84%), germacreno-D (15,79%), limoneno (14,22%), 1,5,5-trimetil-6-metileno-ciclohexano (10,11%) e β -cariofileno (9,0%) em óleos voláteis de partes aéreas de *W. trilobata* coletadas na China, região na qual *S. trilobata* é considerada forte invasora e competidora com espécies locais de interesse medicinal, *Wedelia chinensi* (Song *et al.* 2009, Song *et al.* 2010 a,b) e *W. calendulacea* (Wu *et al.* 2013).

No Brasil, o óleo volátil de plantas coletadas no nordeste apresentou como constituintes majoritários os monoterpenos α -pineno, α -felandreno e limoneno (Craveiro *et al.* 1993). Já na região sudeste, em Minas Gerais, os componentes majoritários foram germacreno-D, α -felandreno, α -pineno, β -cariofileno, biciclogermacreno, limoneno e α -humuleno (Silva *et al.* 2012).

De uma maneira geral, a composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* estudada no presente trabalho é semelhante à de outros relatos desta mesma espécie, porém a variação quantitativa dos componentes é bem evidente. É sabido que fatores como o clima, sazonalidade, variação geográfica além da própria genética da planta, são capazes de influenciar no teor e na constituição química dos óleos voláteis. As alterações encontradas no presente trabalho podem estar associadas a esses fatores.

Os resultados da bioautografia frente os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* são expressos em atividade fraca (quando há pouca alteração no desenvolvimento do fungo), média (quando há inibição parcial do crescimento do fungo) e forte (inibição total do crescimento do fungo).

As variações na composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas em diferentes regiões também foi observada na atividade antifúngica frente à *Cladosporium sphaerospermum* (Figura 5) e *C. cladosporioides*.

Os óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletada no IBt apresentaram média atividade inibitória dos fungos no inverno e verão do ano I. No verão ano I, a amostra SP3 apresentou fraca atividade diferindo das demais. Ao analisar a composição química das amostras SP1, SP2 e SP3, foi observado que, a concentração de *o*-ocimeno na amostra 3 é inferior às das outras (7,86 %, 2,95 e 1,67%) e nas demais coletas a média desse componente ficou em torno de 1,5%.

Os óleos voláteis mais ativos foram os oriundos da coleta de Paranapiacaba (Figura 5), todos apresentaram forte atividade frente aos fungos testados, exceto outono ano II que apresentou fraca atividade. Na amostra PARN 3 de primavera ano I não houve crescimento por erro experimental. Para Mogi-Guaçu, as amostras de primavera e verão ano I e II, e outono ano II apresentaram forte atividade antifúngica, as demais apresentam média e fraca (inverno I) atividade. Os resultados foram similares para os dois microrganismos testados.

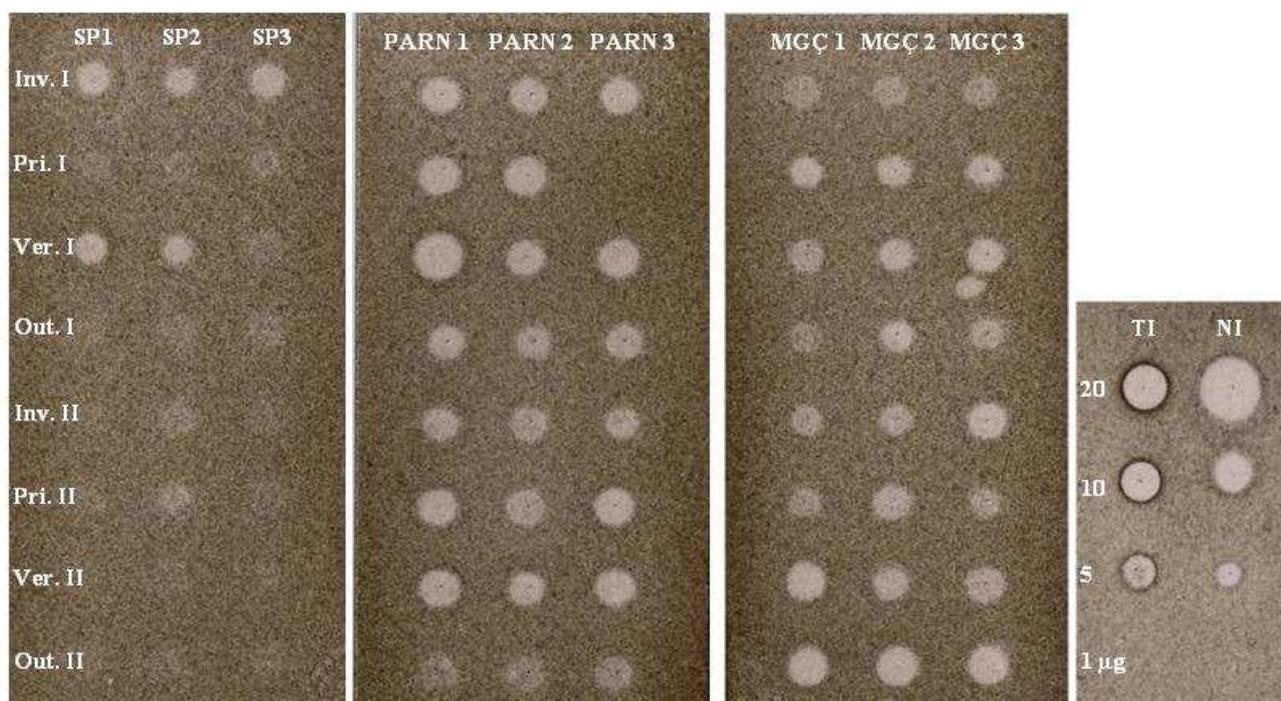


Figura 5. Bioautografia com o fungo *C. sphaerospermum* dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletada em três regiões distintas, SP (Instituto de Botânica); PARN (Paranapiacaba); MGÇ (Mogi-Guaçu) durante o período de dois anos. Legendas: SP1 – 3; PARN 1-3; MGÇ 1-3 = repetição das amostras; Inv. = inverno; Pri. = primavera; Ver. = verão; Out. = outono; I = primeiro ano; II = segundo ano. Controles positivos: TI = timol; NI = nistatina com 20, 10, 5 e 1 µg em 10 µL.

Para as amostras que apresentaram forte atividade antifúngica foi determinado o limite de detecção (Figura 6). Os óleos voláteis testados foram PARN: inverno I, verão I e II e para MGÇ foram: primavera I, verão I e II e outono II. O limite de detecção para as amostras de PARN foi de 50 µg e MGÇ foi de 25µg.

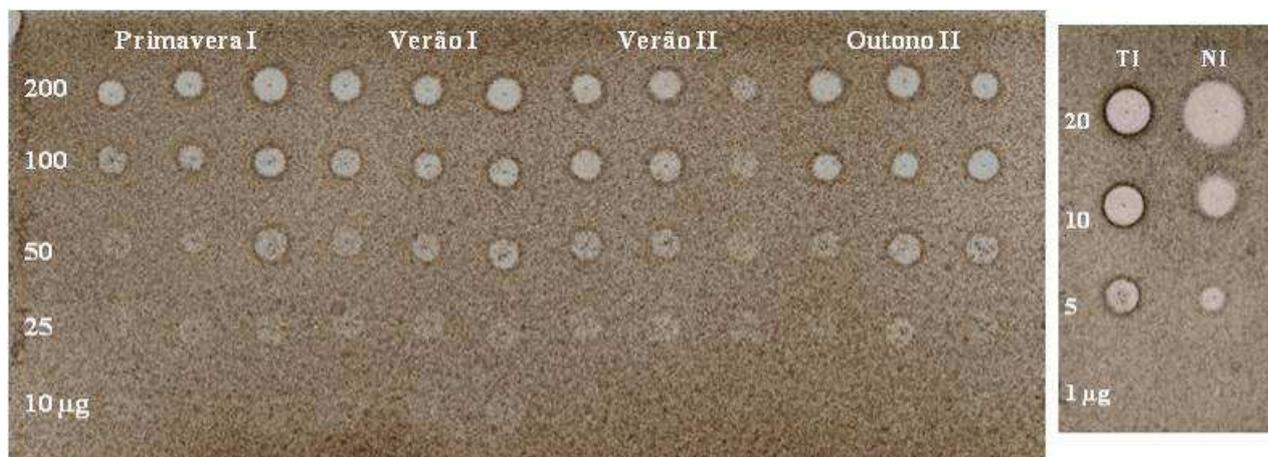


Figura 6. Limite de detecção frente ao fungo *C. sphaerospermum* das amostras mais ativas de óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletada em MGÇ. Controles positivos: TI = timol; NI = nistatina com 20, 10, 5 e 1µg em 10 µL.

O óleo volátil de *Seseli annuum* (Apiaceae), tendo como constituintes majoritários germacreno-D, sabineno, β-ocimeno e limoneno apresentou forte atividade contra quinze fungos testados, incluindo *C. cladosporioides* (Milosavljević *et al.* 2007).

Segundo Lang & Buchbauer (2012) não há correlação de classes químicas com as atividades frente a fungos e leveduras. No entanto, segundo estes mesmos autores, os monoterpenos α-pineno e p-ocimeno apresentaram elevado efeito contra fungos fitopatogênicos.

Os fungos *Cladosporium* são saprofíticos do solo e de vegetais em decomposição, os esporos são dispersos pelo ar podendo causar alergias (Meng *et al.* 2012). *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* são causadores de feohifomicoses subcutânea (Gugnani *et al.* 2000, Vieira *et al.* 2001, Qiu-Xia *et al.* 2007, Sang *et al.* 2011) e doenças do trato respiratório (Yano *et al.* 2003).

De acordo com os dados apresentados, foi possível observar que a proporção entre monoterpenos e sesquiterpenos influenciou na atividade biológica uma vez que os óleos voláteis com maior equilíbrio entre essas classes terpênicas apresentaram maior atividade biológica, conforme observado para os óleos voláteis de partes aéreas coletadas em Paranapiacaba, Mogi-Guaçu e também na primeira coleta de SP.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a dinâmica do rendimento e composição química dos óleos voláteis é diferente entre plantas nativas e cultivadas; há alteração sazonal e regional dos óleos voláteis de *S. trilobata*; e os óleos voláteis de plantas nativas apresentam maior atividade antifúngica contra os fungos testados.

Tabela 1. Composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* Pruski coletadas em dois biomas do Estado de São Paulo: Mata Atlântica (Instituto de Botânica e Paranapiacaba) e Cerrado (Mogi-Guaçu), durante as estações entre os anos de 2009 e 2010 (Ano I).

Composto	I.R.	Área %												
		Instituto de Botânica				Paranapiacaba				Mogi-Guaçu				
		Inverno	Primavera	verão	outono	inverno	primavera	verão	outono	inverno	primavera	verão	outono	
pentanona	822	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0
α-pineno	932	8,2 ± 0,0	15,4 ± 0,1	15,2 ± 0,9	15,7 ± 0,2	18,7 ± 0,3	22,6 ± 0,3	22,5 ± 0,8	24,5 ± 2,0	19,9 ± 0,1	20,6 ± 0,2	20,6 ± 2,0	21,4 ± 1,0	
canfeno	948	-	-	-	-	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1	-	-	-	-	
sabineno	971	-	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,0	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,0	-	-	
β-pineno	977	20,3 ± 0,0	45,2 ± 0,7	47,3 ± 1,0	47,3 ± 0,3	15,3 ± 0,2	19,0 ± 0,2	19,1 ± 0,6	20,1 ± 1,0	2,9 ± 0,0	3,2 ± 0,0	3,1 ± 0,3	3,3 ± 0,4	
octen-3-ol	980	-	-	-	-	0,7 ± 0,0	-	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	-	-	-	-	
mirceno	988	0,8 ± 0,0	2,3 ± 0,0	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,3	
α-felandreno	1003	4,4 ± 0,0	15,1 ± 0,2	12,8 ± 5,0	15,4 ± 0,5	7,9 ± 0,2	3,9 ± 0,2	-	8,7 ± 0,4	24,7 ± 0,2	22,7 ± 0,2	16,4 ± 4,0	22,9 ± 4,0	
o-cimeno	1023	4,2 ± 0,0	1,8 ± 0,1	4,2 ± 3,0	2,0 ± 0,2	3,7 ± 0,0	7,1 ± 0,1	7,8 ± 0,6	4,1 ± 0,5	7,3 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0,7	6,9 ± 2,0	
limoneno	1028	6,5 ± 0,0	8,9 ± 0,1	9,3 ± 1,0	8,1 ± 0,3	2,8 ± 0,0	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,4	3,1 ± 0,2	15,8 ± 0,2	13,9 ± 0,2	11,0 ± 2,0	16,2 ± 0,5	
Z-β-ocimeno	1036	-	-	-	-	2,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	-	2,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,0	
E-β-ocimeno	1046	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,3 ± 0,5	0,8 ± 0,1	
n.i.	1243	0,71 ± 0,0	-	-	-	-	0,9 ± 0,0	1,5 ± 0,8	-	0,7 ± 0,0	-	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,6	
acetato de bornila	1278	-	-	-	-	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	
n.i.	1285	-	-	-	-	-	-	1,3 ± 0,5	-	-	-	-	-	
n.i.	1313	0,75 ± 0,0	-	-	-	-	0,9 ± 0,0	1,5 ± 0,7	-	0,6 ± 0,0	-	0,8 ± 0,1	-	
n.i.	1323	0,77 ± 0,0	-	-	-	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,3	-	0,6 ± 0,1	-	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,2	
β-elemeno	1382	0,94 ± 0,0	-	-	-	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,0	3,5 ± 0,1	4,7 ± 1,0	1,7 ± 1,3	
β-cariofileno	1410	14,4 ± 0,0	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	11,7 ± 0,2	9,0 ± 0,1	8,4 ± 0,5	7,1 ± 0,9	5,7 ± 0,0	7,5 ± 0,1	8,3 ± 2,0	5,2 ± 1,5	
n.i.	1415	-	-	-	-	-	-	0,8 ± 0,1	-	-	-	-	-	
α-humuleno	1441	9,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,3 ± 0,1	7,0 ± 0,1	6,4 ± 0,1	6,0 ± 0,8	5,5 ± 0,6	3,3 ± 0,0	3,3 ± 0,0	4,1 ± 0,1	3,3 ± 0,8	

Continua...

Composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* em diferentes biomas

dauca-5-8-dieno	1455	-	-	-	-	1,1 ± 0,0	-	-	0,9 ± 0,1	-	-	-	-
germacreno D	1464	12,0 ± 0,2	3,9 ± 0,1	2,6 ± 1,0	2,8 ± 0,3	9,3 ± 0,1	6,3 ± 0,1	4,2 ± 2,3	7,5 ± 0,7	7,3 ± 0,0	5,6 ± 0,1	5,6 ± 1,0	6,6 ± 1,1
biciclosesquifelandreno	1471	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,1	-
biciclogermacreno	1475	1,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0	-	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	-	2,2 ± 0,1	2,7 ± 0,0	3,9 ± 0,1	3,8 ± 0,7	2,8 ± 1,1
α-farneseno	1484	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4 ± 0,0	1,7 ± 0,7	-
δ-cadineno	1493	0,77 ± 0,0	-	-	-	0,6 ± 0,0	-	-	-	-	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,2	-
espatulenol	1560	5,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,1	5,0 ± 0,0	5,9 ± 0,0	7,2 ± 0,5	4,5 ± 0,6	2,7 ± 0,0	2,4 ± 0,0	4,0 ± 0,6	3,1 ± 0,5
óxido de cariofileno	1565	1,98 ± 0,0	-	-	-	1,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0	3,6 ± 0,3	1,4 ± 0,1	-	-	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
epóxido de humuleno	1597	1,09 ± 0,0	-	-	-	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,5 ± 0,7	0,7 ± 0,1	-	-	-	-
n.i.	1627	2,04 ± 0,0	-	-	-	1,3 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,8 ± 0,5	0,9 ± 0,1	-	-	0,6 ± 0,1	-
α-cadinol	1644	1,02 ± 0,0	-	-	-	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1	-	-	-	-
n.i.	1750	-	-	-	-	-	-	1,2 ± 0,2	-	-	-	-	-
ácido hexadecanóico	1956	0,64 ± 0,1	-	-	-	-	-	1,1 ± 0,1	-	-	-	-	-
n.i.	1975	-	-	-	-	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0	-	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	-	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,0
n.i.	2100	0,76 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abienol	2117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,4	-
n.i.	2153	-	-	-	-	0,9 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-
ácido caur-16-en-18-oico	2176	0,83 ± 0,1	-	-	-	0,7 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-
Total Identificado %		95,0	100,0	100,0	100,0	96,5	94,3	90,8	98,3	97,3	100,0	96,2	97,6
Monoterpenos		44,4	89,8	92,6	91,9	53,4	60,6	54,9	65,1	73,8	69,6	59,4	73,8
hidrocarbonetos		44,4	89,8	92,6	91,9	52,6	60,0	54,9	65,1	73,8	69,6	59,4	73,8
oxigenados		-	-	-	-	0,8	0,6	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos		48,5	9,5	6,7	7,3	41,0	32,9	32,7	31,5	22,9	28,9	34,8	23,2
hidrocarbonetos		38,9	8,7	5,6	6,4	32,7	23,3	19,6	24,0	20,2	26,5	30,2	19,5
oxigenados		9,6	0,8	1,1	0,9	8,3	9,6	13,1	7,5	2,7	2,4	4,6	3,7
Outros		7,1	0,7	0,7	0,7	5,6	6,4	12,4	3,4	3,3	1,5	5,7	3,1
Rendimento (mg.g ⁻¹ MF)		0,28	1,67	1,76	2,07	0,50	0,58	0,71	0,76	0,77	1,13	0,96	1,30

Tabela 2. Composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* Pruski coletadas em dois biomas do Estado de São Paulo: Mata Atlântica (Instituto de Botânica e Paranapiacaba) e Cerrado (Mogi-Guaçu), durante as estações entre os anos de 2010 e 2011 (Ano II). I.R. = Índice de Retenção; n.i. = composto não identificado.

Composto	I.R.	Área %											
		Instituto de Botânica				Paranapiacaba				Mogi-Guaçu			
		Inverno	primavera	verão	outono	inverno	primavera	verão	outono	inverno	primavera	verão	outono
pentanona	822	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,0
α-pineno	932	15,9 ± 0,8	16,4 ± 0,3	15,6 ± 0,3	15,7 ± 0,1	20,7 ± 2,0	20,4 ± 3,0	24,0 ± 0,7	28,9 ± 1,0	23,4 ± 1,0	24,0 ± 1,0	25,5 ± 1,0	30,0 ± 0,0
canfeno	948	-	0,6 ± 0,1	-	-	0,8 ± 0,1	-	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	-	-	-	-
sabineno	971	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	-	-	-	-	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	-
β-pineno	977	41,5 ± 2,0	38,5 ± 1,0	44,88 ± 2,0	45,0 ± 0,6	16,9 ± 1,0	15,8 ± 2,0	19,1 ± 0,4	21,8 ± 1,0	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,5 ± 0,1
octen-3-ol	980	-	-	-	-	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	-	0,7 ± 0,1	-	-	-
mirreno	988	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,4 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,0	2,1 ± 0,0	1,9 ± 0,0
α-felandreno	1003	14,8 ± 0,7	16,5 ± 0,6	17,6 ± 0,2	16,0 ± 0,4	6,5 ± 1,0	3,3 ± 2,0	10,9 ± 0,3	14,1 ± 1,0	22,6 ± 3,0	25,1 ± 1,0	31,9 ± 0,8	12,3 ± 2,0
o-cimeno	1023	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	3,7 ± 0,3	6,3 ± 2,0	3,2 ± 0,3	2,7 ± 0,7	6,0 ± 0,4	4,9 ± 0,3	3,6 ± 0,1	12,9 ± 0,2
limoneno	1028	9,1 ± 0,8	11,6 ± 0,9	9,2 ± 1,1	8,8 ± 0,6	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,3	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,0	14,5 ± 1,0	14,1 ± 0,4	15,5 ± 0,3	16,5 ± 0,2
Z-β-ocimeno	1036	-	-	-	-	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0,8	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0	-
E-β-ocimeno	1046	-	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,0	-
n.i.	1243	-	-	-	-	-	1,2 ± 0,7	-	-	0,9 ± 0,1	-	-	2,8 ± 0,1
acetato de bornila	1278	-	-	-	-	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	-	-	-	-	-	-
n.i.	1283	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8 ± 0,1
n.i.	1313	-	-	-	-	-	0,8 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
n.i.	1323	-	-	-	-	-	1,1 ± 0,2	-	-	0,7 ± 0,1	-	-	1,0 ± 0,1
β-elemeno	1382	-	-	-	-	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0	-	2,1 ± 1,0	2,4 ± 0,5	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,4
β-cariofileno	1410	3,0 ± 0,8	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	2,1 ± 0,0	12,4 ± 1,2	11,8 ± 2,0	6,5 ± 0,3	5,0 ± 0,6	5,6 ± 2,0	5,5 ± 0,5	2,4 ± 0,3	4,8 ± 0,7
α-humuleno	1441	2,5 ± 0,5	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,9 ± 0,0	7,0 ± 0,6	7,8 ± 1,3	5,3 ± 0,1	3,8 ± 0,4	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,1
Dauca-5-8-dieno	1455	-	-	-	-	0,9 ± 0,1	-	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	-	-	-	-
germacreno D	1464	5,3 ± 1,0	3,9 ± 0,6	2,6 ± 0,0	3,9 ± 0,3	8,9 ± 0,2	7,2 ± 3,3	8,8 ± 0,3	7,0 ± 0,8	5,0 ± 0,6	5,3 ± 0,3	5,6 ± 0,6	3,8 ± 0,2
biciclogermacrene	1475	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,0	2,5 ± 0,1	-	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,4	2,8 ± 0,4	3,4 ± 0,5	2,6 ± 0,2	1,1 ± 0,0
α-farneseno	1484	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	-	-
δ-cadineno	1489	-	-	-	-	-	-	0,7 ± 0,0	-	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2	-	-
espatulenol	1560	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1	4,9 ± 1,0	7,2 ± 0,8	2,6 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,6 ± 0,5	2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	3,0 ± 0,4

Continua...

Composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* em diferentes biomas

óxido de cariofileno	1565	-	-	-	-	1,6 ± 0,4	2,7 ± 1,0	-	-	0,5 ± 0,0	-	-	-
epóxido de Humuleno	1597	-	-	-	-	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,5	-	-	-	-	-	-
n.i.	1627	-	-	-	-	1,1 ± 0,5	2,3 ± 0,6	-	-	-	-	-	-
α-cadinol	1644	-	-	-	-	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,0	-	-	-	-	-
shyobunol	1681	-	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,1	-	-	-	0,9 ± 0,0	-	-	-	-	-
n.i.	1750	-	-	-	-	-	-	-	0,7 ± 0,0	-	-	-	-
n.i.	1975	-	-	-	-	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,0	-	-	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1	-
abienol	2117	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,0	-	-	-
Total Identificado %		100,0	100,0	100,0	100,0	97,8	93,3	99,0	99,3	98,4	99,3	99,4	94,4
Monoterpenos		85,6	88,0	91,8	89,2	55,4	51,7	66,1	76,6	73,7	75,9	84,2	77,1
hidrocarbonetos		85,6	88,0	91,8	89,2	54,6	51,0	66,1	76,6	73,7	75,9	84,2	77,1
oxigenados		-	-	-	-	0,7	0,7	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos		13,7	11,3	7,6	10,2	40,4	40,1	31,4	22,2	22,8	22,8	14,6	16,8
hidrocarbonetos		12,8	9,8	6,3	9,6	32,4	27,7	27,3	20,9	19,7	20,9	13,5	13,8
oxigenados		0,9	1,5	1,3	0,6	8,0	12,4	4,1	1,3	3,1	2,0	1,2	3,0
Outros		0,7	0,6	0,6	0,6	4,2	8,2	2,4	1,2	3,5	1,3	1,2	6,1
Rendimento (mg.g ⁻¹ MF)		1,36	1,95	2,44	2,02	0,55	0,49	0,80	0,86	1,06	1,42	1,36	1,14

Literatura citada

- Adams, R.P.** 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Allured. Illinois.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., França, P.F. & Barbosa-Filho J.M.** 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil , Revista Brasileira de Farmacognosia 18: 472-508.
- Bailac, P.N., Dellacasa, A.D., Ponzi, M.I. & Firpo N.H.** 2005. Essential Oil Composition of *Wedelia glauca* (Ort.) Hoffman ex Hicken from Argentina. Journal of Essential Oil Research 17: 401-402.
- Balekar, N., Katkam, N.G., Nakpheng, T., Jehtae, K. & Srichana T.** 2012. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. Journal of Ethnopharmacology 141:817–824.
- Barra, A.** 2009. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. Natural Products Communication 4: 1147-54.
- Bohlmann, F., Ziesche, J., King, R.M. & Robinson H.** 1981. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an ent-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia*. Phytochemistry 20:751-756.
- Bresciani, L.F., Cechinel-Filho V. & Yunes R.A.** 2000. Comparative study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography. Natural Products Letters 14: 247-254.
- Carreira, R.C.** 2007 *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica. São Paulo.
- Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., Mahado, M.I.L. Krush, A. & Silva, M.G.C.** 1993. Volatile Constituents of two *Wedelia* species. Journal of Essential Oil Research. 5: 439-441.
- Farmacopéia Brasileira** 2001. 4ed. Parte II Fascículo 2. In. Diário Oficial, Suplemento n.1.

- Ferreira, D.T., Levorato, A.R., Faria, T.J., Carvalho, M.G. & Braz-Filho R.** 1994. Eudesmanolide lactones from *Wedelia paludosa*. *Natural Products Letters* 4:1-7.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. & Scheffer J.J.C.** 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 213–226.
- Franz, C. & Novak, J.** 2010. Sources of Essential Oils *In*: Baser, K.H.C. Buchbauer, G (Eds.). *Handbok of Essential oils, Science, technology and applications*. CRC Press. Florida.
- Garg, S.N., Gupta, D. & Jain S.P.** 2005. Volatile Constituents of the Aerial Parts of *Wedelia chinensis* Merrill. from the North Indian Plains. *Journal of Essential Oil Research* 17: 364-365.
- Gazim, Z.C., Amorim, A.C.L., Hovell, A.M.C., Rezende, C.M., Nascimento, I.A., Ferreira, G.A. & Cortez D.A.G.** 2010. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules* 15: 5509-5524.
- Govindappa, M., Sravya, S.N., Poojashri, M. N., Sadananda, T.S., Chandrappa, C.P., Santoyo, G., Sharanappa, P. & Kumar N.V.A.** 2011. Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 5718-5729.
- Gugnani, H.C., Sood, N., Singh, B. & Makkar R.** 2000. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides* *Mycoses* 43: 85–87.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. *Clima In*. Lopes M.I.M.S., Kirizawa M., Melo M.M.R.F. (orgs.) *Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba*. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxi substances. *Journal of Chromatography* 51: 327-329.

- Hussain, A.L., Sherazi, S.T.H. & Przybylski R.** 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry 108: 986-995.
- Kamatou, G.P.P., Van Zyl, R.L., Van Vuuren, S.F. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. & Viljoen A.M.** 2008. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. South African Journal of Botany 74: 230–237.
- Lang, G., & Buchbauer, G.** 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. Flavour and Fragrance Journal 27:13–39.
- Li, X., Dong, M., Liu, Y., Shi, Q.W. & Kiyota, H.** 2007. Structures and biological properties of the chemical constituents from the genus *Wedelia*. Chemistry & Biodiversity 4: 823-836.
- Li, D., Liang, Z., Guo, M., Zhou, J., Yang, X & Xu, J.** 2012. Study on the chemical composition and extraction technology optimization of essential oil from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. African Journal of Biotechnology 11: 4513-4517.
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balick, M.J., Pizza, C. & Loggi, R.D.** 2009. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. Journal of Ethnopharmacology 122: 430–433.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** 1993. Florística do cerrado na Reserva Biológica de Moji Guaçu, SP. Acta Botanica Brasilica 7: 33-60.
- Meena, A.K., Rao, M.M., Meena, R.P. & Panda P.** 2011. Pharmacological and Phytochemical Evidences for the Plants of *Wedelia* Genus– A Review Asian Journal of Pharmaceutical Research 1: 07-12.
- Meng, J., Barnes, C.S. & Rosenwasser L.J.** 2012. Identity of the fungal species present in the homes of asthmatic children. Clinical & Experimental Allergy 42: 1448–1458.

- Milosavljević, S., Tešević, V., Vučković, I., Jadranin, M., Vajs, V., Soković, M., Janačković, P. & Jovanović, A.** 2007. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia Fitoterapia 78: 319–322.
- Mondin, C.A. & Bringel Jr., J.B.A.** 2013. *Sphagneticola* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2013/FB016304>).
- Nirmal, S. A., Chavan, M. J., Tambe, V. D., Jadhav, R. S., Ghogare, P. B., Bhalke, R. D. & Girme, A. S.** 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Wedelia trilobata* leaves. Indian Journal of Natural Products 21: 33-35.
- Pruski, J.F.** 1996. Compositae of the Guayana Highland--XI. Tuberculocarpus gen. nov. and some other Ecliptinae (Heliantheae) Novon 6:404-418.
- Qiu-Xia, C., Xing, C.L., Ming, H.W., Qiang, S.J., Wen, L. & Fang, L.S.** 2007. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium sphaerospermum* Mycoses 51: 79–80.
- Sang, H., Zheng, X.E., Zhou, W.Q., He, W., Lv, G.X., Shen, Y.N., Kongl, Q.T. & Liu W.D.** 2011. A case of subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium* Mycoses. 55: 195-197.
- Santos, P.M. & Funari, F.L.** 2002. Clima Local In: Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds.) Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. pp. 29-48.
- Silva, C.J., Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J. Montanari, R.M., Francino, D., Meira, R.M.S.A. & Souza A.O.** 2012. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. Brazilian Journal of Pharmacognosy 22: 482-489.
- Song, L., Wu, J., Li, C., Li, F., Peng, S. & Chen B.** 2009. Different responses of invasive and native species to elevated CO₂ concentration. Acta Oecologica 35:128–135.
- Song, L.Y., Li, C. & Peng S.** 2010a. Elevated CO₂ increases energy-use efficiency of invasive *Wedelia trilobata* over its indigenous congener. Biological Invasions. 12:1221-1230.

- Song, L., Chow, W.S., Sun, L., Li, C. & Peng S.** 2010b. Acclimation of photosystem II to high temperature in two *Wedelia* species from different geographical origins: implications for biological invasions upon global warming. *Journal of Experimental Botany*. 61: 4087–4096.
- Vieira, M.R., Milheiro, A. & Pacheco, F.A.** 2001. Phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides*. *Medical Mycology* 39: 135–137.
- Vuuren, S.F.V, Viljoen, A.M. Özek, T., Demirci, B. & Başer K.H.C.** 2007. Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect there of on the antimicrobial activity. *South African Journal of Botany* 73: 441–448.
- Wu, W., Zhou, R.C., Ni, G.Y., Shen, H. & Ge X.J.** 2013. Is a new invasive herb emerging? Molecular confirmation and preliminary evaluation of natural hybridization between the invasive *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae) and its native congener *S. calendulacea* in South China. *Biological Invasions* 15: 75-88.
- Yano, S., Koyabashi, K. & Kato, K.** 2003. Intrabronchial lesion due to *Cladosporium phaeospermum* in a healthy, non-asthmatic woman. *Mycoses* 46: 330–332.

Variações diurnas dos óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

Resumo

Sphagneticola trilobata (Asteraceae), é uma erva estolonífera perene de ampla distribuição, conhecida popularmente como vedélia. Fatores ambientais como luz e temperatura podem alterar a produção e composição de óleos voláteis. O objetivo deste trabalho foi analisar as variações diuturnas, no rendimento e na composição química, dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* cultivadas no Instituto de Botânica - São Paulo. As coletas foram realizadas em fevereiro/2011 (verão) e agosto/2011 (inverno) a cada quatro horas durante o período de 24h. Partes aéreas frescas foram hidrodestiladas em aparelho do tipo Clevenger por quatro horas e os óleos obtidos foram analisados por CG/EM. Maiores rendimentos foram obtidos nas coletas de inverno 1,6 mg.g⁻¹ em média. Os principais componentes foram: α -pineno (8,4 – 15,3%), β -pineno (24,2 – 38,1%), α -felandreno (10,7 – 15,3%), limoneno (9,2 – 12,1%) e germacreno D (11,8 – 5,3%). As maiores diferenças no teor e composição química dos óleos voláteis foram relacionadas à sazonalidade.

Palavras chave: ciclo diuturno, óleo essencial, *Wedelia*

Abstract

Sphagneticola trilobata (Asteraceae) is a stoloniferous perennial herb and wide distribution, popularly known as vedélia. Environmental factors such as light and temperature can alter the production and the composition of volatile oils. The objective of this study was to analyze the diuturnal variations, yield and chemical composition of the essential oils of the aerial parts of *S. trilobata* grown in Instituto de Botânica - São Paulo. Samples were collected in february/2011 (summer) and august/2011 (winter) every four hours during the 24 h. Fresh aerial parts were hydrodistilled in a Clevenger apparatus during four hours and the oil was analysed by GC/MS. Higher yields were obtained in the collections of winter 1.6 mg.g⁻¹ average. The main components were α -pinene (8.4 - 15.3%), β -pinene (24.2 - 38.1%), α -phellandrene (10.7 - 15.3%), limonene (9.2 - 12.1%) and germacrene D (11.8 - 5.3%). The major differences in the yield and chemical composition were due to seasonality.

Keywords: diuturnal cycle, essential oil, *Wedelia*

Introdução

As plantas se comunicam com o ambiente através da liberação de compostos voláteis, dentre eles os terpenos. A riqueza destes metabólitos pode ser explicada, em parte, pelo simples fato das plantas não se locomoverem necessitando assim de defesas químicas contra ações do meio ambiente e de animais (Gottlieb 1990, Harborne 1993, Peñuelas *et al.* 1995, Carvalho *et al.* 2006).

Os óleos voláteis presentes nas plantas desempenham funções fisiológicas e ecológicas específicas. As flores emitem voláteis específicos para espécies específicas de polinizadores, sendo responsáveis pela atração e orientação destes, já voláteis emitidos pelas partes vegetativas da planta, principalmente os liberados após herbivoria, parecem proteger as plantas atraindo os inimigos dos herbívoros (Harborne 2001, Pichersky & Gershenzon 2002, Gershenzon & Dudareva 2007). Compostos voláteis como 1,8-cineol, cânfora, isotujona e α -tujona agem como inibidores de germinação, β -ocimeno, epóxido de cariofileno e espatulenol são repelentes de formiga cortadeira de folhas (Kelsey *et al.* 1984, Harborne 1993).

A composição dos óleos voláteis em plantas, apesar de determinada geneticamente, pode sofrer alterações em decorrência do ambiente em que vivem como a existência de quimiotipos (Bruneton 2001, Thompson *et al.* 2003, Kaloustian *et al.* 2005) e fatores ambientais tais como, luz, temperatura, nutrientes no solo (Bruneton 2001, Ramezani *et al.* 2009). Silva *et al.* (1999) observaram um aumento no teor de eugenol em folhas de *Ocimum gratissimum* no período entre 11h e 14h, sugerindo a influência da luz solar na produção de eugenol nessa espécie. Em *Mentha piperita*, os compostos majoritários pulegona, mentona, mentofurano e mentol, variam de acordo com o comprimento do dia e a temperatura. Dias longos com altas temperaturas (dia/noite) favorecem a produção de mentofurona, enquanto que em dias longos e noites frias, o composto majoritário é o mentol (Burbott & Loomis 1967).

Variações diuturnas também podem alterar a composição química de óleos voláteis. Em *Virola surinamensis* em coleta realizada às 12h foi obtido maior teor do fenilpropanóide elemicina (Lopes *et al.* 1997). O teor e composição química dos óleos voláteis de folhas de *Cistus monspeliensis* variaram em função da sazonalidade e horário de coleta (Angelopoulou *et al.* 2002). Kaya *et al.* (2012) verificaram em *Lavandula stoechas*, que tanto a variação diuturna quanto a variabilidade ontogenética influenciam na composição química dos óleos voláteis. No entanto, não foram observadas variações diuturnas no rendimento e concentração de safrol nos óleos voláteis de folhas de *Piper divaricatum* (Barbosa *et al.* 2012).

Sphagneticola trilobata (L.) Pruski, é uma erva estolonífera, perene, com ampla distribuição, conhecida popularmente como vedélia. utilizada na medicina popular como expectorante e anticonvulsivo (Pruski 1996, Carvalho *et al.* 2001). Estudos químicos com extratos vegetais identificaram a presença de ácidos caurenóicos e luteonina com atividade hipoglicemiante e analgésica (Bohlmann *et al.* 1981, Block *et al.* 1998, Bresciani *et al.* 2004). Carvalho *et al.* (2001) isolaram de extratos de flores, dois ácidos caurenóicos, estigmasterol, glicosídeos de estigmasterol, sitosterol e ésteres derivados do ácido oleanóico. A composição química já foi estudada por Craveiro *et al.* (1993) e Silva *et al.* (2012) mas nenhum trabalho foi encontrado a respeito da variação diuturna no rendimento e composição dos óleos voláteis de *S. trilobata* (L.) Pruski.

Material e métodos

Material vegetal

Partes aéreas de indivíduos de *Sphagneticola trilobata*, cultivadas em canteiro medindo ca. 3,40 x 0,75 m, no núcleo de Pesquisa de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, São Paulo, SP (IBt) foram coletadas a cada quatro horas, das 8 h de 02/02/2011 às 8 h de 03/02/2011 para a coleta de verão e das 7 h de 04/08/2011 às 7 h de 05/08/2011 para a coleta de inverno. Os horários de coleta são diferentes devido ao fato do Brasil adotar desde 1985 o horário brasileiro de verão compreendendo os meses de outubro a fevereiro. Neste período, o relógio é adiantado em uma hora (Ministério de Minas e Energia 2012). A exsicata foi identificada pela Dr. Inês Cordeiro e depositadas no Herbário Científico do Estado “Maria Eneyda P. K. Fidalgo” (SP) do Instituto de Botânica com o número do coletor: Raggi 25

Extração e identificação de óleos voláteis

O material fresco coletado (partes aéreas) foi separado em três partes, com cerca de 100 g cada, e congelado em freezer à $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior extração. A extração do óleo volátil foi realizada por hidrodestilação em processo contínuo com aparelho do tipo Clevenger, por 4 horas, em três repetições. O óleo foi separado com pentano e secado com sulfato de sódio anidro. O pentano foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório sob temperatura ambiente em sala climatizada. O óleo obtido foi armazenado em frasco com tampa, em freezer a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

O rendimento de cada óleo foi calculado a partir da massa fresca de material vegetal. Os óleos voláteis extraídos foram diluídos em acetona 1:10 (v:v) e 1 μL de cada amostra diluída foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se cromatógrafo a gás Agilent (serie 6890) acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo (5973), com

coluna capilar HP 5-MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, com 0,25 µm de espessura), operando a 70 eV. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C . A programação da temperatura do forno foi de 40 °C por 1 min, 40 a 240 °C a 3 °C min⁻¹ e 240 °C por 10 min com tempo total de análise de 77,6 min, utilizando hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). O índice de retenção (IR) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcenos (C₈ a C₃₀) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica. A identificação dos compostos foi feita por comparação entre os espectros de massas obtidos com aqueles registrados na base de dados da biblioteca Willey 275 e Adams (2007).

Análise estatística

Foi utilizada análise de variância unidirecional (ANOVA) e aplicado o teste Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo dos teores dos óleos voláteis, os dados foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ onde x se refere ao cálculo da área em %.

Resultados e discussão

No presente capítulo, foi analisado as variações do teor e composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* cultivadas no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo em intervalos de quatro horas, durante vinte e quatro horas, em duas estações do ano: verão (dias 02 e 03/02/2011) e inverno (dias 04 e 05/08/2011), para averiguar se há variações diuturnas para esta espécie.

Na Figura 1. são mostrados os rendimentos dos óleos voláteis (mg.g^{-1} de massa fresca) de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas a cada quatro horas nas estações de verão e inverno/2011.

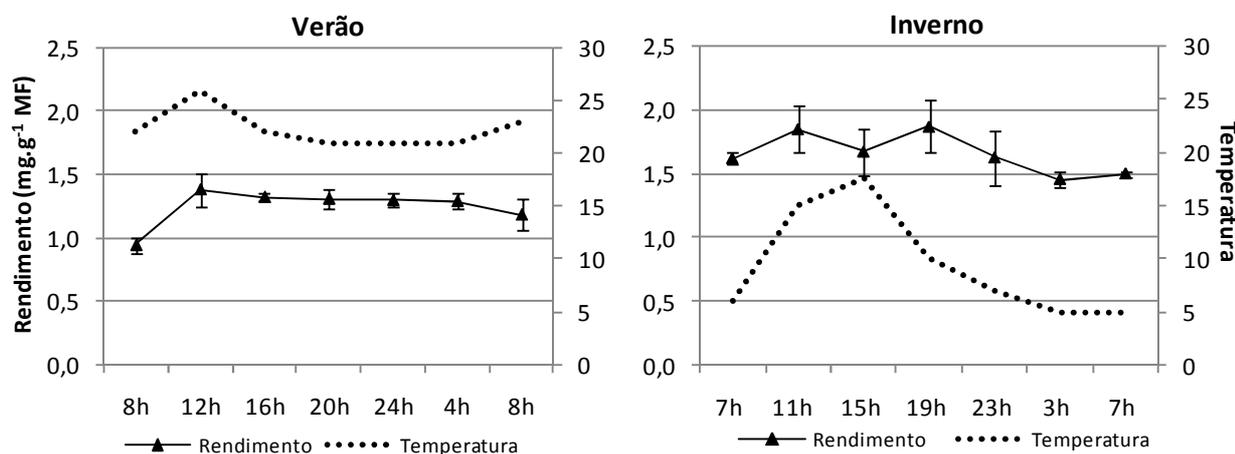


Figura 1. Rendimento (mg.g^{-1} MF) dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas no Instituto de Botânica a cada quatro horas na estação de verão e inverno/2011 e variação da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) durante o período. Barras: desvio padrão dos rendimentos $n=3$.

O rendimento dos óleos voláteis da coleta realizada no verão variou entre $0,9$ a $1,4 \text{ mg.g}^{-1}$ MF, 8h e 12h respectivamente, no inverno a variação foi de $1,5$ a $1,9 \text{ mg.g}^{-1}$ MF (Tabela 1). Apesar dos valores não se diferenciarem estatisticamente ($p \leq 0,05$), é importante observar que às 12h foram obtidos os maiores valores de rendimento, tanto no verão ($1,4 \text{ mg.g}^{-1}$ MF) como no inverno ($1,9 \text{ mg.g}^{-1}$ MF). Em estudo realizado com *Rosmarinus officinalis* (alecrim) foi verificado maior teor de óleo

volátil às 12h em comparação com coletas realizadas às 6 e 18h (Ramezani *et al.* 2009) sugerindo que em temperaturas mais elevadas a formação dos óleos voláteis tende a aumentar (Gobbo-Neto & Lopes 2007).

Levando-se em consideração a média dos rendimentos, o valor obtido para o óleo da coleta realizada em agosto foi significativamente maior do que o da coleta realizada em fevereiro, dado este também observado por Carneiro *et al.* (2010) na extração de óleos voláteis de *Plectranthus amboinicus*. Reis *et al.* (2010) também observaram que no clima quente e úmido, típico de verão, há uma diminuição nos teores de óleos voláteis de *Lychnophora pinaster* (arnica da serra). Por outro lado, embora a espécie seja a mesma e o canteiro localizado bem próximo, nos dados registrados no capítulo 1 o rendimento dos óleos voláteis de partes aéreas de *Sphagneticola trilobata* (IBt) no verão (2,44 mg.g⁻¹ MF) foram superiores aos obtidos no inverno (1,36 mg.g⁻¹ MF). Espécies arbóreas de *Mystaceae* como *Campomanesia guaviroba* e *Myrcia splendens*, ocorrentes no Instituto de Botânica, não apresentaram variações diuturna quanto ao teor e rendimento dos óleos voláteis (Souza 2009).

A Tabela 1. mostra a composição química do óleo volátil de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas a cada quatro horas no Instituto de Botânica. Os hidrocarbonetos monoterpênicos contribuíram com a maior porcentagem dos constituintes (55,9 a 83,5%). Os óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* coletadas às 8h no verão apresentaram maior quantidade de sesquiterpenos (40,2%), sendo esta a coleta em que os constituintes majoritários foram estatisticamente diferentes das demais coletas, exceto para o monoterpeneo limoneno. No inverno houve diferença na proporção de α -pineno entre as coletas das 7 e 3h e do sesquiterpeneo biciclogermacreno entre as coletas das 7 e 19h. Os componentes majoritários foram α -pineno (8,4 - 15,3%), β -pineno (24,2 - 38,1%), α -felandreno (10,7 - 14,5%), limoneno (9,2 - 12,1), β -cariofileno (2,8 - 6,2%), α -humuleno (2,5 - 6,6), germacreno D (4,8 - 11,8%) e biciclogermacreno (2,1 - 5,9%). Alguns componentes como nerolidol, α -cadinol, ácido caur-

16-en-18-oico e o tetracosano apareceram apenas na primeira coleta (8h) de verão. A variação dos mono- e sesquiterpenos majoritários ao longo do dia é mostrada nas Figuras 2 e 3. As marcações com * representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) entre as duas estações em que foram realizadas as coletas, verão e inverno. A fim de facilitar a visualização da figura, os horários das coletas de inverno foram omitidos.

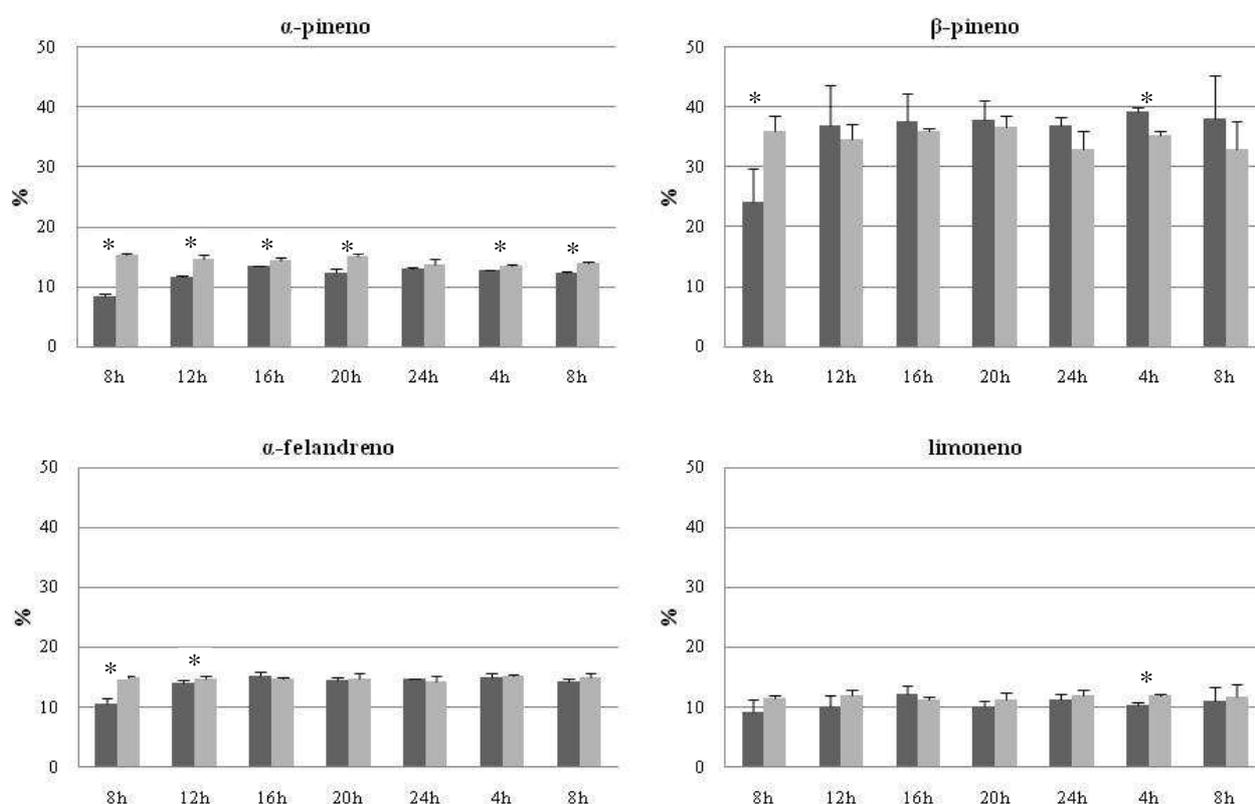


Figura 2. Porcentagem dos hidrocarbonetos monoterpênicos majoritários nos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* cultivada no Instituto de Botânica, coletadas a cada quatro horas no verão (■) e no inverno (□). Barras correspondem ao desvio padrão. * $p \leq 0,05$.

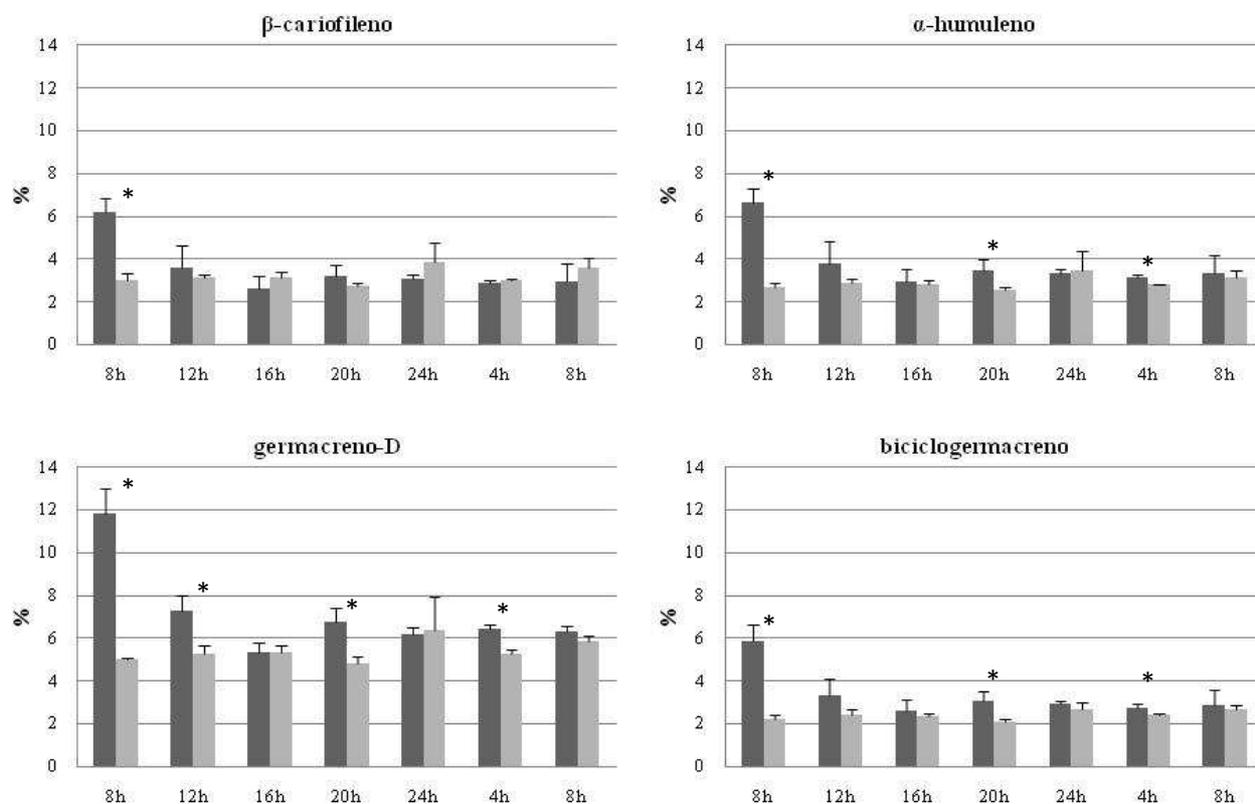


Figura 3. Porcentagem de sesquiterpenos majoritários nos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* cultivada no Instituto de Botânica, coletadas a cada quatro horas no verão (■) e no inverno (□). Barras correspondem ao desvio padrão. * $p \leq 0,05$.

Na comparação entre as coletas realizadas no verão e inverno, o teor do monoterpene α -pineno foi diferente em todos os horários exceto para a coleta realizada às 24h (23h no inverno). Para β -pineno a diferença foi significativa no horário das 8h do primeiro dia e às 4h da manhã, o monoterpene α -felandreno apresentou diferenças estatísticas entre as estações no horário das 8h e 12h e o teor de limoneno foi diferente apenas na coleta realizada às 4h. A concentração deste monoterpene em *Lippia alba* quimiotipo citral/limoneno não foi influenciada pela época seca e chuvosa no Ceará, porém o teor

do óleo foi influenciado por estas condições (Nagao *et al.* 2005). Em *Ocimum gratissimum* o teor de eugenol foi maior em coleta realizada entre as 11 e 14h (Silva *et al.* 1999).

Quanto aos sesquiterpenos, as coletas realizadas às 8, 20 e 4h foram estatisticamente diferentes entre as estações de verão e inverno para os sesquiterpenos majoritários, exceto β -cariofileno que não variou na coleta realizada as 20 e 4h. Em *Plectanthus amboinicius* o conteúdo de β -cariofileno no óleo volátil de folhas foi maior na coleta realizada às 7h nos meses de menor precipitação e quando a precipitação foi maior, o horário das 16h garantiu maior rendimento (Carneiro 2010).

As condições do clima podem favorecer a biossíntese de determinados terpenos em uma espécie em função da atividade enzimática. A temperatura ótima de reação da terpeno-sintetase está entre 30 e 37°C. Portanto, sendo a temperatura uma variável da sazonalidade e um fator importante para a atividade enzimática, o aumento do teor e de certos compostos terpênicos presentes no óleo volátil em temperaturas mais elevadas pode ser justificado (Barros *et al.* 2009). É interessante notar que em todas as coletas sob cultivo, o teor de sesquiterpenos é sempre maior na primeira coleta quando comparado com as demais, este fato foi observado nos dados obtidos nos capítulos 2 e 4 e no trabalho realizado por Silva *et al.* (2012). O teor de sesquiterpenos em *S. trilobata* crescendo naturalmente é em torno de 30%, dados observados no capítulo 2.

Os resultados revelam que as maiores variações no teor e composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* foram encontradas em relação à sazonalidade, porem pequenas variações ao longo do dia foram observadas nas duas estações, verão e inverno.

Tabela.1 Teor e composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* cultivadas no Instituto de Botânica coletadas a cada quatro horas, das 8h de 02/02/2011 às 08h de 03/02/2011 e das 7h de 04/08/2011 às 7h de 05/08/2011. I.R. – índice de retenção. n.i. – composto não identificado.

Composto	Concentração Relativa %														
	I.R.	Verão						Inverno							
		8h	12h	16h	20h	24h	4h	8h	7h	11h	15h	19h	23h	3h	7h
Pentanona	822	0,5 ± 0,4	0,68 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	
α-pineno	932	8,4 ± 0,6	11,6 ± 0,3	13,4 ± 0,2	12,3 ± 0,6	12,9 ± 0,2	12,8 ± 0,1	12,4 ± 0,2	15,3 ± 0,2	14,6 ± 0,9	14,5 ± 0,4	15,0 ± 0,7	13,7 ± 1,0	13,5 ± 0,3	13,9 ± 0,2
Canfeno	948	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Sabineno	972	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0
β-pineno	977	24,2 ± 5,6	36,9 ± 6,7	37,5 ± 4,8	37,9 ± 3,3	37,0 ± 1,3	39,2 ± 0,8	38,1 ± 7,1	36,0 ± 2,6	34,5 ± 2,7	35,9 ± 0,5	36,8 ± 1,9	32,9 ± 3,1	35,3 ± 0,6	33,1 ± 4,6
Mirceno	988	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,3 ± 0,1
α-felandreno	1004	10,7 ± 0,8	14,2 ± 0,3	15,3 ± 0,7	14,5 ± 0,5	14,7 ± 0,2	14,9 ± 0,7	14,2 ± 0,5	15,0 ± 0,3	14,8 ± 0,3	14,8 ± 0,2	14,9 ± 0,8	14,3 ± 0,9	15,2 ± 0,2	15,0 ± 0,6
o-cimeno	1023	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Limoneno	1028	9,2 ± 2,0	10,0 ± 1,8	12,1 ± 1,5	10,2 ± 0,9	11,4 ± 0,7	10,3 ± 0,5	11,1 ± 2,4	11,5 ± 0,6	11,9 ± 1,0	11,3 ± 0,5	11,3 ± 1,1	12,0 ± 1,0	12,0 ± 0,3	11,9 ± 1,9
Z-β-ocimeno	1036	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,5	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2
acetato de bornila	1278	0,6 ± 0,5	-	0,2 ± 0,3	-	-	-	0,2 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2
β-elemeno	1382	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,4	-	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,3	-	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
β-cariofileno	1409	6,2 ± 0,7	3,6 ± 1,0	2,6 ± 0,6	3,2 ± 0,5	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,9	3,0 ± 0,3	3,1 ± 0,2	3,2 ± 0,2	2,8 ± 0,1	3,9 ± 0,9	3,0 ± 0,1	3,6 ± 0,4
α-humuleno	1441	6,6 ± 0,6	3,8 ± 0,9	3,0 ± 0,6	3,5 ± 0,5	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,8	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,1	3,5 ± 0,9	2,8 ± 0,0	3,2 ± 0,3
dauca-5,8-dieno	1455	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,2 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1
germacreno D	1464	11,8 ± 1,2	7,3 ± 0,7	5,3 ± 0,5	6,8 ± 0,6	6,2 ± 0,4	6,4 ± 0,2	6,3 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,4	5,3 ± 0,3	4,8 ± 0,3	6,4 ± 1,6	5,3 ± 0,2	5,9 ± 0,3
biciclogermacrene	1475	5,9 ± 0,7	3,3 ± 0,8	2,6 ± 0,5	3,1 ± 0,4	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,7	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,7 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2
δ-cadineno	1493	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,3	-	-	-	-	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
(Z) nerolidol	1544	0,4 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espatuleno	1560	2,2 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,4
α-cadinol	1644	0,7 ± 0,1	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	-	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Shyobunol	1682	3,2 ± 0,8	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,2
n.i.	1975	0,5 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopimarol	2140	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	-	0,4 ± 0,4	-	0,2 ± 0,3	-	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
ácido caur-16-en-18-oico	2176	1,4 ± 1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracosano	2200	0,3 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

Variações diuturnas dos óleos voláteis de *S. trilobata* (L.) Pruski

Total Identificado (%)	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Monoterpenos	55,9	76,6	83,1	78,7	80,3	81,0	80,3	82,9	81,6	82,1	83,5	78,2	81,8	79,6
hidrocarbonetos														
oxigenados	0,6	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
Sesquiterpenos	40,2	22,1	16,2	20,2	19,0	18,2	19,0	16,3	17,6	17,1	15,7	20,8	17,3	19,5
hidrocarbonetos														
oxigenados	6,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,2	2,8	2,1	2,6	2,1	2,3	2,7	2,6	2,8
Outros	3,9	1,3	0,7	1,0	0,6	0,8	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	1,1	0,9	0,9
Rendimento mg.g ⁻¹ MF	0,9	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,6	1,9	1,7	1,9	1,6	1,5	1,5

Literatura citada

- Adams, R.P.** 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Allured. Illinois.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C. & Perdetzoglou, D.** 2002. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 189–203.
- Barbosa, Q.P.S., Câmara, C.A.G., Ramos, C.S., Nascimento, D.C.O., Lima-Filho, J.V. & Guimarães E.F.** 2012. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: A new source of safrole. *Química Nova* 35:1806-1808.
- Barros, F.M.C., Zambarda, E.O., Heinzmann, B.M. & Mallmann, C.A.** 2009. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Química Nova* 32: 861-867.
- Block, L.C., Santos, A.R.S., Souza, M.M., Scheidt, C., Yunes, R.A., Santos, M.A., Monache, F.D. & Cechinel-Filho, V.** 1998. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. *Journal of Ethnopharmacology* 61:85-89.
- Bohlmann, F., Ziesche, J., King, R.M. & Robinson, H.** 1981. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an ent-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia*. *Phytochemistry* 20:751-756.
- Bresciani, L.F., Yunes, R.A., Burger, C., Oliveira, L.E., Bóf, K.L. & Cechinel-Filho, V.** 2004. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Z. Naturforsch C* 59: 229-232.
- Bruneton, J.** 2001. *Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales*. 2. ed. Editora Acribia. Zaragoza

- Burbott, A.J. & Loomis, W.D.** 1967. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiology* 42: 20-28.
- Carneiro, F.B., Junior, I.D., Lopes, P.Q. & Macêdo, R.O.** 2010. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20: 600-606.
- Carvalho, G.J.A., Carvalho, M.G., Ferreira, D.T., Faria, T.J. & Braz-Filho, R.** 2001. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. *Química Nova* 24: 24-26.
- Carvalho, M.G., Alves, C.C.F., Werle, A.A. & Braz-Filho R.** 2006. Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 497-500.
- Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., Machado, M.I.L. Krush, A. & Silva M.G.C.** 1993. Volatile Constituents of two *Wedelia* species. *Journal of Essential Oil Research* 5: 439-441.
- Gershenzon, J. & Dudareva, N.** 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3: 408-414.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 30: 374-381.
- Gottlieb, O.R.** 1990. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry* 29: 1715-1724.
- Harborne, J.B.** 1993. Introduction to ecological biochemistry. 4ed. Academic Press. London.
- Harborne, J.B.** 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Products Reports* 18: 361-379.
- Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M.J. & Portugal, H.** 2005. Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2437-2444.
- Kaya, D.A., Inan, M. Giray, E.S. & Kirici S.** 2012. Diurnal, Ontogenetic and Morphogenetic Variability of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* in East Mediterranean Region. *Revista de Chimie* 63:749-753.

- Kelsey, R.G., Reynolds, G.W. & Rodriguez E.** 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. *In*: Rodriguez E., Healey, P.L. & Mentha, I. (eds) Biology and chemistry of plant trichomes Plenum Press.
- Lopes, N.P., Kato, M.J., Andrade, H.A., Maia, J.G.S. & Yoshida M.** 1997. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. *Phytochemistry* 46: 689-693.
- Ministério de Minas e Energia** 2012. Disponível em <http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/horarioverao/hdvoquee.html>. Acesso em: 12/dez/2012.
- Nagao, E.O., Innecco, R., Mattos, S.H. & Marco C.A.** 2005. Influência do período de secagem nas estações seca e chuvosa no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., nas condições do Ceará. *Revista Ciência Agronômica* 36: 53 – 59.
- Peñuelas, J., Llusiá, J. & Estiarte, M.** 1995. Terpenoids: a plant language. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 289.
- Pichersky E. & Gershenzon J.** 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5:237–243.
- Pruski, J.F.** 1996. Compositae of the Guayana Highland--XI. *Tuberculocarpus* gen. nov. and some other Ecliptinae (Heliantheae) *Novon* 6: 404-418.
- Ramezani, S., Ramezani, F., Rasouli, F., Ghasemi, M. & Fotokian, M.H.** 2009. Diurnal variation of the essential oil of four medicinal plants species in central region of Iran. *Research Journal of Biological Sciences* 4: 103-106.
- Reis, E.S., Pinto, J.E.B., Bertolucci, S.K.V., Correa, R.M., Paula, J.R., Andrade, S.T. & Ferri P.H.** 2010. Seasonal Variation in Essential Oils of *Lychnophora pinaster* Mart. *Journal of Essential oil Research* 22: 147-149.

- Sayuri, V.A., Romoff, P., Favero, O.A., Ferreira, M.J.P., Lago, J.H.G. & Buturi F.O.S.** 2010. Chemical Composition, Seasonal Variation, and Biosynthetic Considerations of Essential Oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*. 7: 2771-2782.
- Silva, C.J., Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J. Montanari, R.M., Francino, D., Meira, R.M.S.A. & Souza A.O.** 2012. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 482-489.
- Silva, M.G.V. Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L. & Alencar, J.W.** 1999. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 70: 32-34.
- Souza, A.** 2009. Variabilidade dos óleos voláteis de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B. & Ehlers, B.** 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology* 29: 859-880.

**Composição química dos óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski
cultivada sob elevada concentração atmosférica de CO₂**

Ludmila Raggi

Vanessa Fátima de Oliveira

Andrea Nunes Vaz Pedroso

Paulo Roberto H. Moreno

Maria Cláudia Marx Young

Resumo

Plantas de *Sphagneticola trilobata* cultivadas em diferentes concentrações de CO₂ atmosférico (380 e 760 ppm) foram avaliadas quanto aos parâmetros fisiológicos (assimilação fotossintética, condutância estomática e transpiração) e ao rendimento e composição química dos óleos voláteis. As plantas foram cultivadas durante três meses em câmaras de topo aberto (OTC "open-top chambers"). Foram realizadas coletas no tempo 0 (plantas que não foram introduzidas nas OTCs), aos 45 e 90 dias após o cultivo no interior das OTCs. Partes aéreas frescas foram hidrodestiladas em aparelho do tipo Clevenger por quatro horas e os óleos foram analisados por CG/EM. Não foram observadas alterações nos parâmetros fisiológicos em relação às diferentes concentrações de [CO₂] atmosférico, mesmo com aumento na quantidade de estômatos nas plantas tratadas sob elevada [CO₂] aos 90 dias. O rendimento dos óleos voláteis variou durante o tempo de exposição nas OTCs (3,4 – 6,6 mg.g⁻¹ massa seca). Os componentes majoritários foram: β-pineno (36,9 – 49,4%), α-felandreno (16,7 – 20,4%) e α-pineno (9,8 – 12,4%) e germacreno-D (10 – 2,9%). As diferenças na composição química e no rendimento dos óleos voláteis parecem ser decorrentes do tempo de exposição das plantas nas OTCs.

Palavras chave: Asteraceae, fotossíntese, óleo essencial, Wedelia,

Abstract

Sphagneticola trilobata plants grown in different concentrations of atmospheric CO₂ (380 and 760ppm) were evaluated for physiological parameters (photosynthetic assimilation, stomatal conductance and transpiration) and the yield and chemical composition of volatile oils. Plants were grown for three months in open-top chambers (OTCs). Plants were collected at time 0 (plants that have not been introduced in OTCs) at 45 and 90 days after cultivation inside the OTCs. Fresh aerial parts were hydrodistilled in a Clevenger apparatus during four hours and the oil was analysed by GC/MS. There was no change in physiological parameters in relation to different concentrations of [CO₂] atmospheric, even with an increase in the number of stomata in plants treated under elevated [CO₂] at 90 days. The yield of volatile oils varied during the exposure time in the OTCs (3.4 to 6.6 mg.g⁻¹ dry weight). The major components were: β-pinene (36.9 to 49.4%), α-phellandrene (16.7 - 20.4%) and α-pinene (9.8 to 12.4%) and germacrene-D (10 - 2.9%). Differences in yield and chemical composition of volatile oils seem to be the result of exposure time of plants in OTCs.

Keywords: Asteraceae, photosynthesis, essential oil, Wedelia

Introdução

O planeta Terra, calcula-se através da datação de isótopos radioativos, existe a cerca de 4,55 bilhões de anos (Manhes *et al.* 1980, Dalrymple 2001, Zhang 2002) e sua atmosfera era muito diferente do que temos hoje, com proporções inversas principalmente das concentrações de dióxido de carbono [CO₂] e oxigênio (O₂) além da presença de outros gases (Boucot & Gray 2001). Acredita-se que o surgimento das embriófitas no período Ordoviciano da era Paleozóica, ca. 470 milhões de anos atrás (Judd *et al.* 2009, Davies & Gibling 2010, Rubinstein *et al.* 2010, Lenton *et al.* 2012), seja o principal motivo pela inversão da concentração dos gases CO₂ e O₂ chegando às proporções que temos hoje (Berner 1997 e 2003, Chaloner, 2003, Igamberdiev & Lea 2006).

A disponibilidade de grande parte do O₂ na atmosfera é um produto resultante da conversão da energia proveniente do sol em energia química (moléculas orgânicas) através da atividade fotossintética das plantas, algas e algumas bactérias (Taiz & Zeiger 2004, Majerowicz 2008). Dados do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (do inglês, IPCC) mostram que a [CO₂] atmosférico aumentou amplamente desde a era pré industrial, e com tendência a continuar aumentando nos próximos anos devido às ações antrópicas do homem ao meio ambiente (IPCC, 2007). A [CO₂] atmosférico global, medida em novembro de 2012 foi de 393,65 ppm (partes por milhão) de acordo com o Laboratório de Pesquisa do Sistema Terra (do inglês ERSI), órgão governamental dos Estados Unidos (ESRI, 2012). Apesar dos dados alarmantes do IPCC, alguns pesquisadores discordam desses dados visto que as ações antrópicas do homem são responsáveis por 3% da emissão do CO₂ global (Jaworowski 2007) e defendem que os valores encontrados hoje são decorrentes do ciclo natural do planeta (Jaworowski *et al.* 1992, Wagner *et al.* 2002, Molion 2008).

Diante desse cenário futuro, as respostas das plantas para o aumento das concentrações atmosféricas de CO₂ são processos altamente importantes para a compreensão do ciclo global do

carbono (Körner *et al.* 2007). Sendo o CO₂ um fator limitante para a fotossíntese, o aumento desse gás na atmosfera geralmente tem efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas aumentando a quantidade de carboidratos não estruturais como amido, frutanos e açúcares solúveis e a alocação de carbono em vários órgãos (Poorter *et al.* 1997; Peñuelas & Estiarte 1998; Yan *et al.* 2010, Oliveira *et al.* 2013). Em relação aos componentes do metabolismo secundário, mais especificamente os terpenos, são contraditórias as respostas ao aumento de CO₂. Vurro *et al.* (2009) relatam o aumento na produção de óleo volátil em tomilho cultivado em elevada [CO₂] apresentando aumento nos componentes fenólicos (timol e carvacrol) e diminuição nos mono e sesquiterpenos. O aumento na produção de terpenos também foi observado por Peñuelas & Llusà (1997), mas a emissão desses voláteis não sofreu interferência sob elevada [CO₂]. Em 13 trabalhos revisados por Peñuelas & Staudt (2009) ca. de ¼ dos trabalhos apresentaram aumento nos teores de mono – sesquiterpenos em condições elevadas de CO₂, os demais apresentaram diminuição ou indiferença ao tratamento.

No intuito de complementar as informações a respeito das relações entre as diferentes concentrações de CO₂ atmosférico e a produção de óleos voláteis, este trabalho tem como objetivo avaliar o rendimento e a composição química dos óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* Pruski (Asteraceae) cultivadas em diferentes [CO₂] atmosférico (380 e 760ppm) e os parâmetros fisiológicos como assimilação fotossintética, condutância estomática e transpiração.

Material e Métodos

Material vegetal

O material vegetal utilizado foi obtido a partir de multiplicação vegetativa por estacas de uma única muda de *Sphagneticola trilobata* mantida no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica. Após o enraizamento, as estacas foram transplantadas para vasos de 2 L (três estacas por vaso) contendo substrato (Tropstrato HT) e vermiculita na proporção 2:1. Em agosto/2011 as plantas foram desbastadas até o segundo nó e em outubro/2011 foram transplantadas para vasos de 3,5 L contendo o mesmo substrato já citado. Esses vasos foram mantidos em Casa de Vegetação até o início da exposição a concentração elevada de CO₂ atmosférico.

Em novembro de 2011 os vasos foram transferidos para as câmaras de topo aberto (OTC "open-top chambers") de 1,5 m de diâmetro e 2 m de altura, com sistema de circulação de ar (Figura 1) e instaladas no interior da Casa de Vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica (Aidar *et al.* 2002). Foram utilizados quarenta e dois vasos separados em três lotes: lote inicial contendo 6 vasos; lote 380 ppm CO₂ (simulando as condições atuais) contendo 18 vasos e lote 760 ppm CO₂ (simulando o dobro da concentração atual de CO₂) contendo 18 vasos. Com exceção do lote inicial, uma parte das plantas foi mantida sob atmosfera ambiente de 380 ppm CO₂ (lote 380 ppm CO₂) e a outra submetida à atmosfera de 760 ppm CO₂ (lote 760 ppm CO₂), através de injeção de gás a partir de um cilindro de CO₂ comprimido acoplado ao sistema. O monitoramento do microclima e da concentração de CO₂ no interior das OTCs era automatizado. Os dados de temperatura (T °C), umidade relativa (UR) do ar (modelo 107L em abrigo 41303-5A, Campbell Sci.), e controle da concentração de [CO₂], utilizando um analisador de gases no infravermelho – IRGA (modelo WMA-4, PPSsystem) foram coletados a cada 15 minutos e armazenados em um Datalogger (modelo CR1000, Cambell Sci.). As plantas foram regadas diariamente e quinzenalmente foram adicionados 50 mL por

vaso de solução de Hoagland (Hoagland & Arnon 1938). As coletas foram realizadas no tempo 0 (plantas que não foram introduzidas nas OTCs), aos 45 e 90 dias após o cultivo no interior das OTCs sendo utilizados nove vasos para cada coleta, exceto no tempo 0 no qual foram utilizados seis vasos.

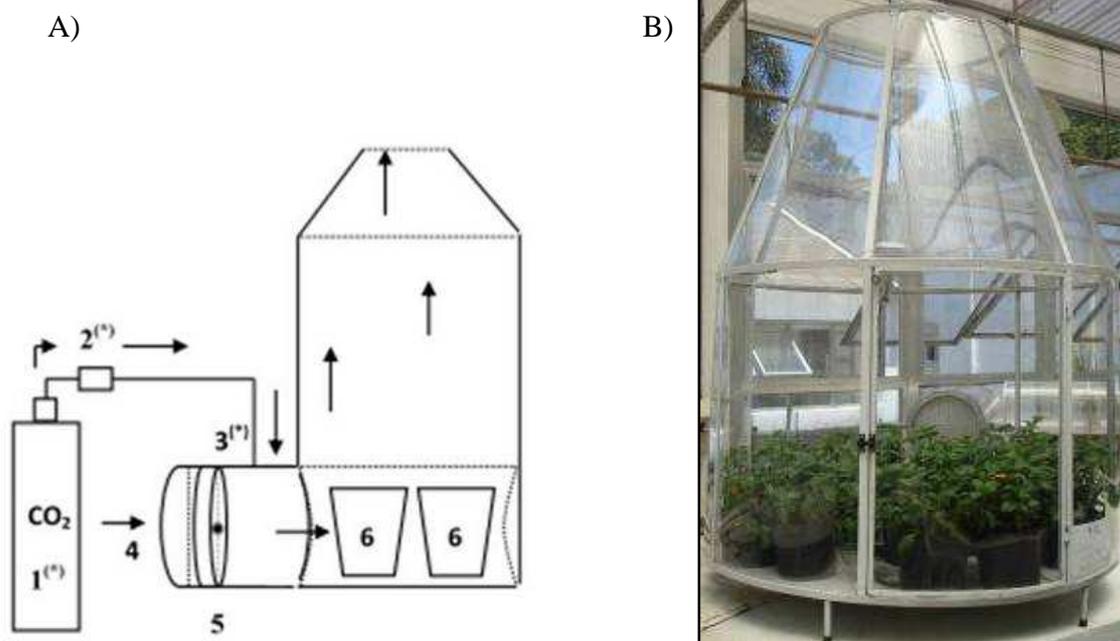


Figura 1. A) Esquema da câmara de topo aberto (OTC): 1 - Cilindro de gás de CO_2 , 2- Válvula de regulação, 3- Mangueira de gás, 4- Entrada para ar, 5- Ventilador, 6- Vasos. (*) Itens presentes somente na câmara de atmosfera enriquecida de CO_2 . As setas indicam a direção do fluxo de gás ou de ar atmosférico. B) Câmara instalada na Casa de Vegetação do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica contendo plantas de *Sphagneticola trilobata* mantidas sob atmosfera ambiente e elevada concentração atmosférica de CO_2 .

Trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram realizadas na quarta folha de cada planta, a partir do ápice, utilizando-se um analisador de gases no infravermelho (IRGA; modelo Li 6400XT), com controle de luz, temperatura e concentração de CO_2 . Os dados foram obtidos a partir de medidas instantâneas de taxas de assimilação líquida de CO_2 (**A**), condutância estomática (***g_s***) e transpiração (**E**) sob a densidade

de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo de 450 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ determinada a partir de curvas de resposta à luz realizadas previamente com a espécie. As medidas foram realizadas por volta das 09h do dia anterior à coleta, e a concentração de CO₂ dentro da câmara foi de 380 ppm ou 760 ppm, de acordo com o tratamento da planta em análise.

Conteúdo de água

O conteúdo de água da parte aérea foi determinado a partir da fórmula:

$$\text{TU}(\%) = \frac{\text{MF} - \text{MS}}{\text{MF}} \times 100$$

MF = massa fresca da amostra

MS = massa seca da amostra após secagem em estufa a 60°C

Densidade estomática

Foram selecionados fragmentos com cerca de 4 cm² da região mediana das folhas do segundo nó, dos dois ambientes estudados (380 ppm e 760 ppm CO₂), os quais foram diafanizados de acordo com Strittmatter (1973, modificado). Para cada ambiente foram utilizadas seis folhas. As amostras foram fervidas por quatro minutos, sendo metade do tempo em álcool 95% e o restante em solução de hidróxido de sódio a 5% e álcool 95% (1:1). Em seguida, os fragmentos foram colocados em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 20%. O material foi corado em solução aquosa de azul de astra (1%) e safranina (1%), na proporção 9:1, desidratado em série etílica e montado em resina sintética *Permout* (Kraus & Arduin 1997).

Extração e identificação de óleos voláteis

O material fresco coletado (partes aéreas) foi separado em três partes e congelado em freezer à -22°C para posterior extração. A extração do óleo volátil foi realizada por hidrodestilação em processo

continuo com aparelho do tipo Clevenger, por 4 horas, em três repetições. O óleo foi separado com pentano e secado com sulfato de sódio anidro. O pentano foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório sob temperatura ambiente em sala climatizada.

O óleo obtido foi armazenado em frasco com tampa, em freezer a - 22°C para posterior análise. O rendimento de cada óleo foi calculado a partir da massa seca (Santos *et al.* 2004, Pino *et al.* 2006, Kelen & Tepe 2008). Amostras dos óleos voláteis extraídos foram diluídos em acetona 1:10 (v:v) e 1 µL de cada amostra diluída foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se cromatógrafo a gás Agilent (serie 6890) acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo (5973), com coluna capilar HP 5-MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, com 0,25 µm de espessura), operando a 70 eV. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C. A programação da temperatura do forno foi de 40 °C por 1 min, 40 a 240 °C a 3 °C min⁻¹ e 240 °C por 10 min com tempo total de análise de 77,6 min, utilizando hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). O índice de retenção (IR) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcenos (C₈ a C₃₀) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica. A identificação dos compostos foi feita por comparação entre os espectros de massas obtidos com aqueles registrados na base de dados da biblioteca Willey 275 e Adams (2007).

O índice de retenção (IR) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcenos (C₈ a C₃₀) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica. A identificação dos compostos foi feita por comparação entre os espectros de massas com aqueles registrados na base de dados da biblioteca Willey 275 e Adams (2007).

Análise estatística

Foi utilizada análise de variância unidirecional (ANOVA) e aplicado o teste Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo dos teores dos óleos voláteis, os dados foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ onde x se refere ao cálculo da área em %.

Resultados e Discussão

Na figura 2 são mostrados os dados de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) durante o experimento. A temperatura média na casa de vegetação foi de 24 °C com máxima de 42°C e mínima de 12°C. A umidade relativa do ar média foi de 76%.

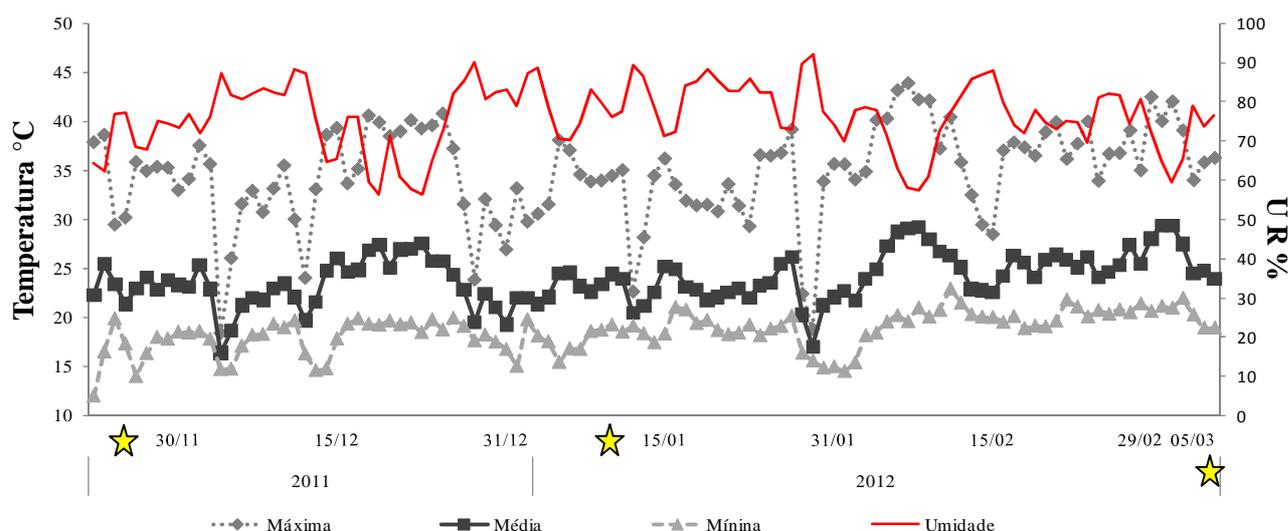


Figura 2. Medidas das médias diárias de temperatura máxima, média e mínima e umidade relativa do ar no interior das OTC's durante o período estudado. ★ Data das coletas.

Na Figura 3 estão apresentados os dados de assimilação fotossintética (3A), condutância estomática (3B), transpiração (3C) e eficiência do uso da água (3D). Conforme observado, a assimilação fotossintética não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, ao longo do experimento sob condições normais (380) e elevadas (760) de CO₂ atmosférico. O aumento do CO₂ atmosférico geralmente ocasiona aumento na assimilação fotossintética (Pooter & Navas 1993, Saralabai *et al.* 1999, Song *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2013) e consequente aumento em biomassa. Em estudo realizado por Song *et al.* (2009, 2010) com *Wedelia trilobata*, sinônimo de *S. trilobata*, sob altas concentrações de CO₂, foi observado aumento na assimilação fotossintética e incremento de biomassa alocado para as hastes, porém tais resultados não corroboram com os encontrados no presente estudo. Segundo

Hättenschwiler & Körner (2003), plantas invasoras respondem melhor ao incremento de CO₂ resposta essa obtida com *S. trilobata* na China (Song *et al.* 2009, 2010) e segundo esses mesmos autores, mesmo sendo cultivada em altas temperaturas ocasionando danos no fotossistema II ainda assim, ela se desenvolve melhor quando comparada com *Wedelia chinensis* (Song *et al.* 2010).

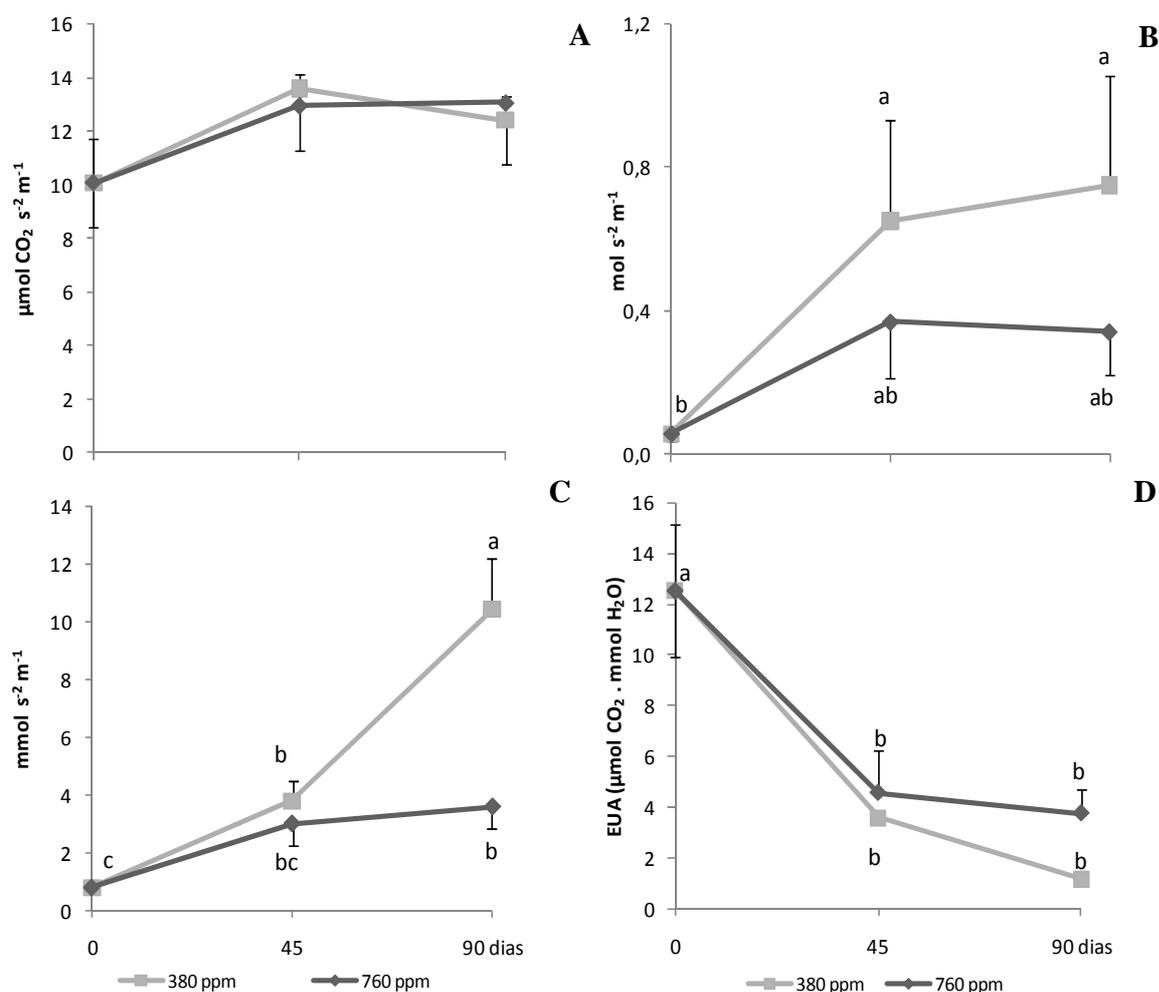


Figura 3. Assimilação fotossintética (A), condutância estomática (B), transpiração (C) e eficiência do uso da água EUA (D) de folhas de *S. trilobata* mantidas em diferentes concentrações de CO₂ (≈ 380 e 760 ppm) aos 0, 45 e 90 dias após exposição ao CO₂. Letras iguais não diferem entre si p ≤ 0,05. As barras correspondem ao desvio padrão da média (n=3).

Segundo Körner *et al.* (2007), não há relação direta entre o estímulo das taxas fotossintéticas em elevada [CO₂] e crescimento ou produtividade. As plantas irão apresentar maior crescimento estrutural se houver disponibilidade de nutrientes e condições adequadas de umidade no solo.

A condutância estomática foi significativamente diferente entre a primeira coleta (0 dia ou T0) e as coletas realizadas aos 45 e 90 dias sob condições normais, mas não diferiu entre as condições de elevada concentração de [CO₂] atmosférico. Apesar dos dados não mostrarem alterações na assimilação fotossintética a transpiração, aos 90 dias, em plantas tratadas sob elevada [CO₂] atmosférico foi mais eficiente quando comparada com plantas tratadas sob concentrações normais de CO₂. A eficiência do uso da água (EUA) não diferiu estatisticamente entre as diferentes [CO₂] aos 45 e 90 dias após a exposição.

S. trilobata apresenta estômatos em ambas superfícies foliares, sendo que são mais frequentes na superfície abaxial, portanto é uma folha anfiestomática. As plantas submetidas em ≈ 760 ppm de CO₂ apresentaram maior densidade estomática (26 estômatos/100 mm²) quando comparada com as plantas tratadas sob ≈ 380 ppm de CO₂ (16 estômatos/100 mm²) (Figura 4). Geralmente em plantas tratadas sob elevada [CO₂] a taxa de assimilação fotossintética é maior e a densidade estomática diminui em relação as plantas tratadas sob condições normais de CO₂ atmosférico (Driscoll *et al.* 2006). A densidade estomática fósseis é utilizada para prever alterações na concentração de CO₂ atmosférico em regra, quanto menor a concentração de CO₂, maior a densidade estomática (Wagner *et al.* 2004).

Porém esses dados não corroboram com o presente estudo, visto que houve aumento da quantidade de estômatos em plantas cultivadas sob elevadas concentrações de CO₂ atmosférico sem haver aumento na assimilação fotossintética. Embora não tenha diferença estatística da condutância estomática entre as plantas sob 380 ppm e 760 ppm, é importante ressaltar que há uma tendência de aumento da condutância em plantas sob 380 ppm CO₂, mesmo tendo apresentado menor número de estômatos.

Esse resultado reflete no maior valor encontrado na concentração interna (CI) de CO₂ em plantas tratadas sob elevada [CO₂]. Mesmo não havendo diferenças estatísticas na assimilação fotossintética, condutância estomática e eficiência do uso da água, a CI de CO₂ de plantas tratadas sob elevada [CO₂] foi o dobro em relação àquelas tratadas sob condições atmosféricas normais (≈380 ppm). Mesmo havendo maior número de estômatos nas plantas tratadas sob alta [CO₂] atmosférico, a assimilação fotossintética não aumentou. Esse evento pode ter ocorrido devido a uma limitação da difusão física do CO₂ da cavidade sub_estomática para os cloroplastos (Niinemets *et al.* 2011) uma vez que há maior número de estômatos nas plantas tratadas sob altas [CO₂] atmosférico.

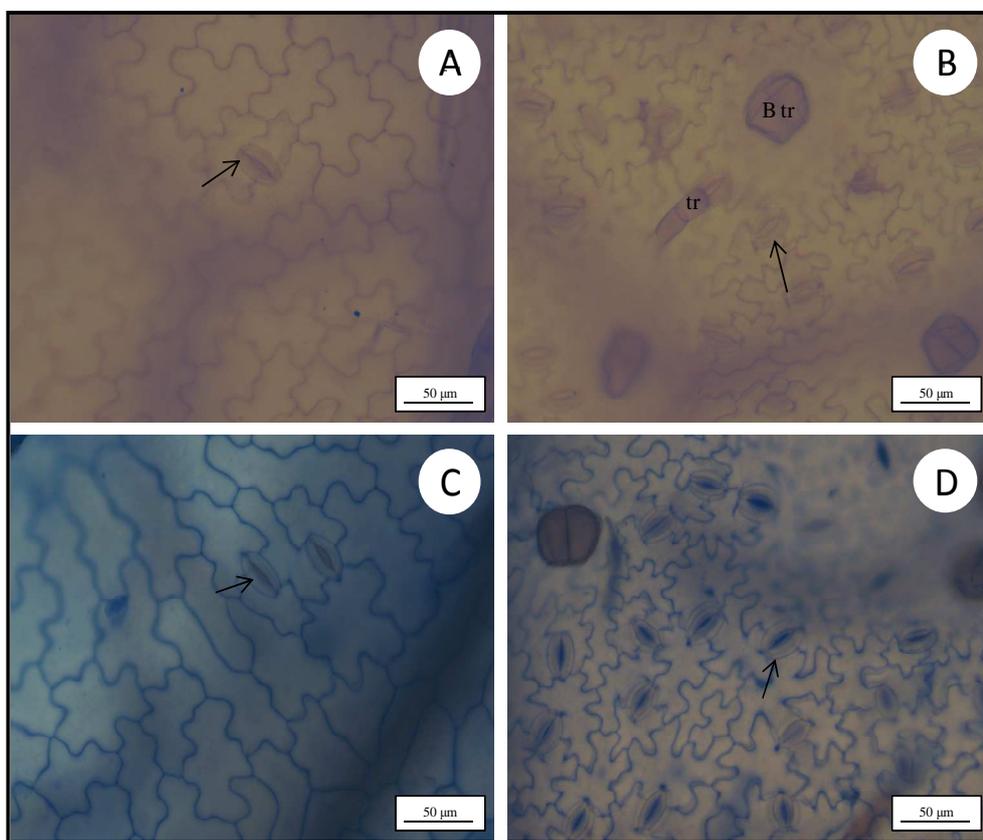


Figura 4. Fotomicrografias de secções paradérmicas de *S. trilobata*, cultivadas sob diferentes condições de CO₂ atmosférico. A e C: superfície adaxial. B e D: superfície abaxial. A-B ≈ 380 ppm CO₂; C-D ≈ 760 ppm CO₂. As setas indicam os estômatos; tr = tricomas; B tr = base dos tricomas.

O rendimento dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* cultivadas sob atmosfera de ≈ 380 e 760 ppm de CO₂, é mostrado na figura 5.

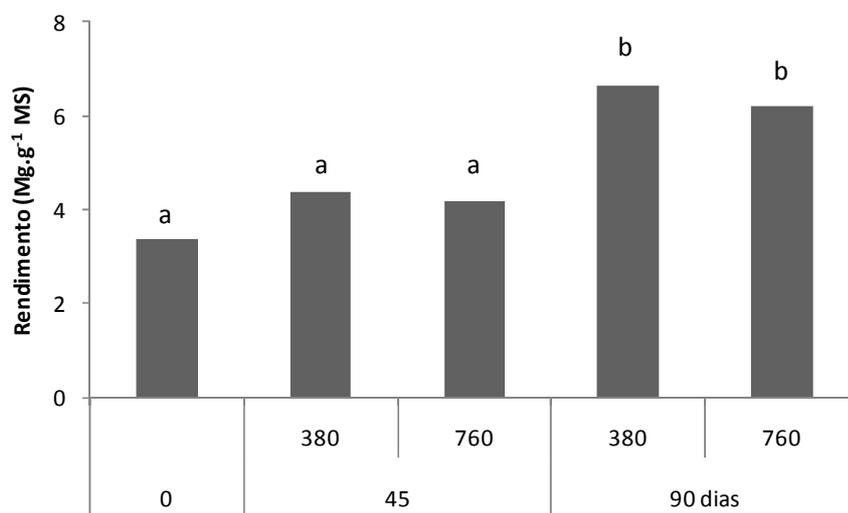


Figura 5. Rendimento (mg.g⁻¹ MS) dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* submetidas às diferentes concentrações de CO₂ atmosférico (≈ 380 e 760 ppm) aos 0, 45 e 90 dias de exposição. Letras iguais não diferem entre si ($p \leq 0,05$) $n=3$.

Na primeira coleta (Tabela 1), o rendimento do óleo volátil foi de $3,4 \text{ mg.g}^{-1}$ massa seca. Aos 45 dias o rendimento dos óleos voláteis de plantas expostas as atmosferas de ≈ 380 e 760 ppm de CO₂ foi de $4,3$ e $4,1 \text{ mg.g}^{-1}$ massa seca, respectivamente, e aos 90 dias foi de $6,6$ sob atmosfera de ≈ 380 ppm e $6,2$ para plantas tratadas sob elevada [CO₂] ≈ 760 ppm. De acordo com a análise estatística apresentada, as médias de 0 e 45 dias após exposição nas duas condições (≈ 380 e 760 ppm de CO₂) não diferiram estatisticamente entre si, porém foram significativamente diferentes em relação ao rendimento dos óleos voláteis na coleta realizada aos 90 dias. De acordo com essa mesma análise é possível observar que, o tempo de exposição dentro das OTCs e não a elevada [CO₂] influenciou no rendimento dos óleos voláteis. Vale salientar que as plantas eram regadas diariamente (ou duas vezes ao dia em dias muito

quentes) e a cada quinze dias era adicionado solução nutritiva a fim de evitar deficiência nutricional e assim influenciar nos resultados.

Plantas submetidas a condições elevadas de CO₂ e diferentes doses nutricionais, apresentaram respostas positivas em relação à biomassa e concentração de fenólicos e terpenóides em atmosfera enriquecida de CO₂ e alta disponibilidade nutricional (Peñuelas *et al.* 1997).

A idade da planta também pode afetar na quantidade e qualidade dos terpenos voláteis como observado por Peñuelas & Llusía (1997). No presente estudo, aos 90 dias de exposição, tanto o rendimento quanto a quantidade de monoterpenos foram superiores às demais coletas.

A Figura 6 apresenta a porcentagem das classes terpênicas na composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* submetidas às diferentes [CO₂] atmosférico.

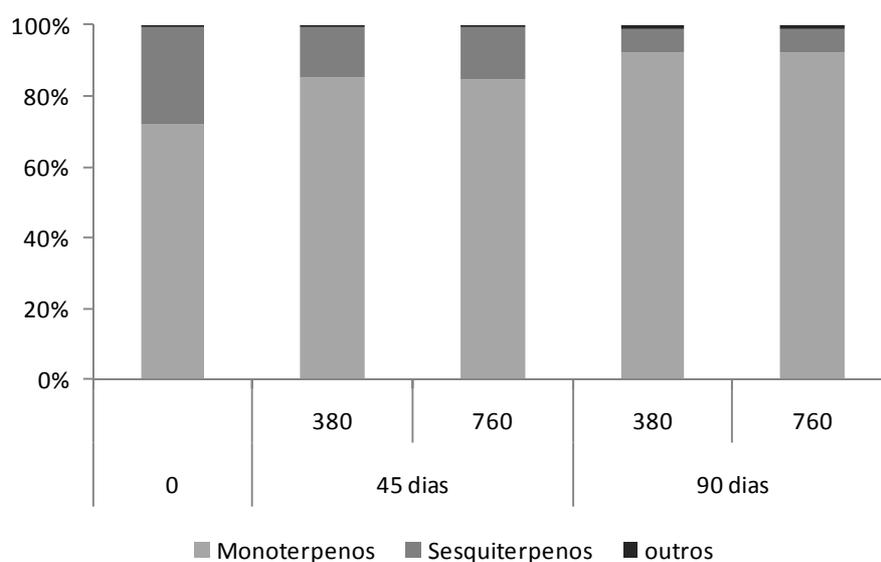


Figura 6. Porcentagem das classes de compostos terpênicos nos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* submetidas às diferentes concentrações de CO₂ atmosférico (≈ 380 e 760 ppm) aos 0, 45 e 90 dias de exposição.

Assim como ocorreu no rendimento, as principais classes terpênicas não sofreram variações em decorrência da [CO₂] atmosférico. Na coleta inicial a porcentagem de sesquiterpenos (27,1%) foi maior que nas demais coletas 14,3 e 14,6% aos 45 dias após exposição \approx 380 e 760ppm de CO₂ respectivamente, e 6,8% (\approx 380 ppm) e 6,9% (\approx 760ppm) aos 90 dias de exposição.

A composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *S. trilobata* é apresentada na Tabela 1.

Os compostos monoterpênicos majoritários foram β -pineno (36,9 – 49,4%), α -felandreno (16,7 – 20,4%) e α -pineno (9,8 – 12,4%), quanto aos sesquiterpenos, os compostos que apresentaram maior concentração foram o germacreno-D (10 – 2,9%) e β -cariofileno (6,6 – 1,6%).

Todos os componentes analisados apresentaram diferenças significativas em relação ao tempo de exposição ao CO₂. O componente α -pineno não diferiu estatisticamente entre a coleta inicial e 380 ppm aos 45 dias, mas diferiu entre as demais coletas. Na coleta inicial os monoterpênicos sabineno e β -pineno apresentaram menores valores, diferindo estatisticamente das demais coletas. O monoterpênicos mirceno foi significativamente diferente nas três coletas realizadas, independente da [CO₂]. As concentrações dos componentes α -felandreno e limoneno nas coletas, inicial e 45 dias (380 e 760 ppm), não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes em relação às coletas aos 90 dias. Os sesquiterpenos β -cariofileno, α -humuleno, germacreno-D e biciclogermacreno diferiram significativamente entre os períodos coletados (0, 45 e 90 dias). Outros sesquiterpenos como α -farneseno, δ -cadineno e espatulenol foram encontrados apenas na coleta inicial.

O balanço na proporção de sesqui – monoterpênicos nas coletas iniciais às finais também foi observado por Silva *et al.* (2012) em *S. trilobata* no qual as coletas iniciais apresentaram maior quantidade de sesquiterpenos quando comparadas com as coletas finais. Vuorinen *et al.* (2005) estudando a emissão de compostos orgânicos voláteis em *Betula pendula* em diferentes concentrações de CO₂ atmosférico e O₂, também observaram maior emissão de sesquiterpenos no primeiro mês de

experimento. Após dois meses de exposição, os monoterpenos foram os componentes majoritários da emissão.

Os terpenos desenvolvem um importante papel ecológico no reino vegetal sendo responsáveis pela comunicação química entre as plantas e o ambiente tais como atração de polinizadores e repelentes de insetos sendo sua produção induzida por fatores internos (genética e bioquímica) e externos (ecológicos). Os monoterpenos possuem também a capacidade de remover um importante poluente atmosférico, o ozônio (Fares *et al.*2008).

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que em *Sphagneticola trilobata* o elevado CO₂ não promoveu alterações significativas nos parâmetros fisiológicos analisados. Em relação à composição química dos óleos voláteis, não houve diferenças qualitativas e quantitativas na espécie estudada sob alto CO₂. Esse resultado possivelmente está relacionado à taxa de assimilação líquida praticamente inalterada mesmo sob elevada [CO₂]: não havendo assimilação do C excedente disponível na atmosfera, a produção de óleos voláteis manteve-se igual à observada nas plantas sob [CO₂] ambiente. Portanto, as diferenças observadas no rendimento e composição química dos óleos voláteis (mono- e sesquiterpenos) se devem à idade das plantas.

Tabela 1. Composição química do óleo volátil da parte aérea de *Sphagneticola trilobata* Pruski submetidas às diferentes concentrações de CO₂ atmosférico (\approx 380 e 760 ppm) coletada antes do início da exposição (0) e aos 45 e 90 dias após a exposição.

Composto	Índice de Retenção _{Calc.}	Índice de Retenção _{Lit.}	Concentração Relativa %									
			0	45 dias				90 dias				
				380 ppm		760 ppm		380 ppm		760 ppm		
pentanona	822	839	-	-	-	0,7	\pm 0,02	0,7	\pm 0,02			
α -pineno	934	939	9,8	\pm 0,86	10,9	\pm 0,16	11,2	\pm 0,63	12,2	\pm 0,04	12,4	\pm 0,19
sabineno	974	969	0,7	\pm 0,05	0,8	\pm 0,01	0,8	\pm 0,03	0,8	\pm 0,02	0,8	\pm 0,02
β -pineno	979	979	36,6	\pm 1,66	48,6	\pm 0,96	47,6	\pm 1,10	49,9	\pm 1,01	49,4	\pm 1,12
1-octen-3-ol	982	979	-		0,7	\pm 0,09	0,7	\pm 0,01	0,4	\pm 0,06	0,3	\pm 0,11
mirreno	990	990	1,5	\pm 0,02	1,8	\pm 0,01	1,8	\pm 0,01	2,2	\pm 0,03	2,1	\pm 0,04
α -felandreno	1006	1002	16,7	\pm 1,26	17,1	\pm 0,75	17,6	\pm 0,81	20,2	\pm 0,65	20,4	\pm 0,82
o-cimeno	1024	1024	1,8	\pm 0,20	1,0	\pm 0,15	0,9	\pm 0,11	0,9	\pm 0,07	1,1	\pm 0,15
limoneno	1029	1029	4,5	\pm 0,26	4,3	\pm 0,11	4,3	\pm 0,07	5,1	\pm 0,15	5,2	\pm 0,21
trans- β -ocimeno	1047	1050	0,6	\pm 0,03	0,5	\pm 0,04	0,5	\pm 0,03	0,4	\pm 0,03	0,4	\pm 0,02
α -terpineol	1188	1188	-		-		-		0,3	\pm 0,06	0,4	\pm 0,05
β -elemeno	1384	1390	0,5	\pm 0,02	-		-		-		-	
β -cariofileno	1411	1419	6,6	\pm 0,37	3,4	\pm 0,07	3,5	\pm 0,46	1,6	\pm 0,09	1,6	\pm 0,07
α -humuleno	1443	1454	3,8	\pm 0,29	2,3	\pm 0,04	2,3	\pm 0,29	1,3	\pm 0,05	1,3	\pm 0,05
dauca-5,8-dieno	1457	1472	1,2	\pm 0,07	0,7	\pm 0,04	0,7	\pm 0,09	-		-	
germacreno D	1466	1485	10,0	\pm 0,43	5,8	\pm 0,12	5,9	\pm 0,86	2,9	\pm 0,15	2,9	\pm 0,18
biciclogermacreno	1477	1500	3,4	\pm 0,15	2,2	\pm 0,07	2,2	\pm 0,29	1,1	\pm 0,06	1,1	\pm 0,05
α -farneseno	1486	1505	0,4	\pm 0,03	-		-		-		-	
δ -cadineno	1495	1523	0,5	\pm 0,04	-		-		-		-	
espatulenol	1562	1578	0,6	\pm 0,07	-		-		-		-	
n.i.	2141		0,7	\pm 0,16	-		-		-		-	
Total Identificado %			99,3		100,0		100,0		100,0		100,0	
Rendimento (mg.g ⁻¹ MS)			3,4		4,3		4,2		6,6		6,2	

Legenda: Calc. = calculado; Lit. = literatura; n.i. = não identificado; média e desvio padrão da média.

Literatura citada

- Adams, R.P.** 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Allured. Illinois.
- Aidar, M.P.M., Martinez, C.A., Costa, A.C., Costa, P.M.F., Dietrich, S.M.C. & Buckeridge, M.S.** 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota Neotropica* 2, BN01602012002. Available at <http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/pt/abstract?article+BN01602012002>.
- Berner, R.A.** 1993. The rise of plants and their effect on weathering and atmospheric CO₂. *Science* 276: 544-545.
- Berner, R.A.** 2003. The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature* 426: 323-326.
- Boucot, A.J. & Gray, J.** 2001. A critique of Phanerozoic climatic models involving changes in the CO₂ content of the atmosphere. *Earth-Science Reviews* 56: 1–159.
- Chaloner, W.G.** 2003. The role of carbon dioxide in plant evolution: *In*: Rothschild L.J. & Lister A.M. (Eds.). *Evolution on Planet Earth: The impact of the physical environment*. Academic Press Londres
- Dalrymple, G.B.** 2001. The age of the Earth in the twentieth century: a problem (mostly) solved *Geological Society*.190;205-221.
- Davies, N.S. & Gibling, M.R.** 2010. Cambrian to Devonian evolution of alluvial systems: The sedimentological impact of the earliest land plants. *Earth-Science Reviews* 98:171–200.
- Driscoll, S.P. Prins, A., Olmos, E., Kunert, J.K. & Foyer, C.H.** 2006. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. *Journal Experimental Botany* 57: 381–390.
- ESRL - Earth System Research Laboratory.**2012 Disponível em < <http://www.esrl.noaa.gov/>>. Acesso em dezembro de 2012.

- Fares, S., Loreto, F., Kleist, E. & Wildt J.** 2008. Plant Biology Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biology* 10: 44–54.
- Hättenschwiler S. & Körner C.** 2003. Does elevated CO₂ facilitate naturalization of the non-indigenous *Prunus laurocerasus* in Swiss temperate forests? *Functional Ecology* 17: 778-785.
- Hoagland, D.R. & Arnon D.I.** 1938. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station. Circ. N 347.
- Igamberdiev, A.U. & Lea, P.J.** 2006. Land plants equilibrate O₂ and CO₂ concentrations in the atmosphere. *Photosynthesis Research* 87: 177-194.
- IPCC** 2007. Climate change 2007: mitigation. *In*: Metz B., Davidson O.R., Bosch P.R., Dave R., Meyer L.A. (Eds.). Contribution of working group III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Jaworowski, Z., Segalstad, T.V. & Ono N.** 1992. Do glaciers tell a true atmospheric CO₂ story? *The Science of the Total Environment*, 114: 227-284.
- Jaworowski, Z.** 2007. “CO₂: The Greatest Scientific Sandal of Our Time” *EIR Science*. March: 38-53.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue M.J.** 2009. Sistemática Vegetal um enfoque filogenético. Artmed São Paulo.
- Kelen, M. & Tepe, B.** 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99: 4096-4104.
- Körner, C., Morgan, J. & Norby R.** 2007. CO₂ fertilization: when, where how much? *In*: Canadell JG, Pataki D, Pitelka L (eds.). *Terrestrial ecosystems in a changing world series: Global Change*, Springer.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro.

- Lenton, T.M., Croch, M., Johnson, M., Pires, N. & Dolan L.** 2012. First plants cooled the Ordovician Nature Geoscience 5:86-89.
- Majerowicz, N.** 2008. *In:* Kerbauy G.B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan
- Manhes, G., Alliégre, C.J., Dupré, B. & Hamelin B.** 1980. Lead isotope study of basic-ultrabasic layered complexes: speculations about the age of the Earth and primitive mantle characteristics. Earth and Planetary Science Letters 47: 370-382.
- Molion, L.C.B.** 2008. Considerações sobre o aquecimento global antropogênico. Informe Agropecuário 29: 7-18.
- Niinemets, U., Flexas, J. & Peñuelas J.** 2011. Evergreens favored by higher responsiveness to increased CO₂. Trends in Ecology and Evolution 26: 136-142.
- Oliveira, V.F., Silva, E.A., Zaidan, L.B.P. & Carvalho M.A.M.** 2013. Effects of elevated CO₂ concentration and water deficit on fructan metabolism in *Viguiera discolor* Baker. Plant Biology 15: 471-482.
- Peñuelas, J. & Estiarte, M.** 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? Trends in Ecology and Evolution 13:20-24
- Peñuelas, J. & Staudt, M.** 2009. Induced biogenic volatile organic compounds from plants BVOCs and global change. Trends in Plant Science 15: 133-144.
- Peñuelas, J., Estiarte, M. Llusíá, J.** 1997. Carbon-based secondary compounds at elevated CO₂ Photosynthetica 33: 313-316.
- Peñuelas, J., Llusíá, J.** 1997. Effects of carbon dioxide, water supply, and seasonality on terpene content and emission by *Rosmarinus officinalis*. Journal of Chemical Ecology. 23: 979-993.
- Pino, J.A., Marbot, R., Payo, A., Chao, D. & Herrera P.** 2006. Aromatic plants from western Cuba VII. Composition of the leaf oils of *Psidium wrightii* Krug et Urb., *Lantana involucrate* L.,

Cinnamomum montanum (Sw.) Berchtold et J. Persl. And *Caesalpinia violaceae* (Mill.) Standley.

Journal of Essential oil Research 18: 170-174.

Poorter, H., Berkel, Y.V., Baxter, R., Hertog, J.D., Dijkstra, P., Giferod, R.M., Griffin, K.L., Roumet, C. Roy, J. & Wong, S.C. 1997. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C3 species. *Plant, Cell and Environment* 20: 472-482.

Poorter, H. & Navas, M.L. 2003. Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist* 157: 175–198.

Rubinstein, C.V, Gerrienne, P., Puente, G.S., Astini, R.A. & Steemans P. 2010. Early Middle Ordovician evidence for land plants in Argentina (eastern Gondwana) *New Phytologist* 188: 365–369.

Santos, A.S., Alves, S.M., Figueiredo, F.J.C. & Neto O.G.R. 2004. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado técnico 99. Belém. Embrapa Amazônia Oriental.

Saralabai, V.C., Vivekanandan, M. & Suresh Babu R. 1997. Plant responses to high CO₂ concentration in the atmosphere. *Photosynthetica* 33: 7-37.

Silva, C.J., Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J. Montanari, R.M., Francino, D., Meira, R.M.S.A. & Souza A.O. 2012. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 482-489.

Song, L., Wu, J., Li, C., Li, F., Peng, S. & Chen B. 2009. Different responses of invasive and native species to elevated CO₂ concentration. *Acta Oecologica* 35:128–135.

Song, L.Y., Li, C. & Peng S. 2010. Elevated CO₂ increases energy-use efficiency of invasive *Wedelia trilobata* over its indigenous congener. *Biological Invasions*. 12:1221-1230.

Strittmatter, C.G.D. 1973. Nueva tecnica de diafanizacion. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15: 126-29.

- Taiz L. & Zeiger, E.** 2004. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed
- Vuorinen, T., Nerga, A., Vapaavuorib, E. & Holopainen, J.K.** 2005. Emission of volatile organic compounds from two silver birch (*Betula pendula* Roth) clones grown under ambient and elevated CO₂ and different O₃ concentrations. Atmospheric Environment 39: 1185–1197.
- Vurro, E., Bruni, R., Bianchi, A. & Toppi L.S.** 2009. Elevated atmospheric CO₂ decreases oxidative stress and increases essential oil yield in leaves of *Thymus vulgaris* grown in a mini-FACE system Environmental and Experimental Botany 65: 99–106.
- Wagner, F., Aaby, B. & Visscher H.** 2002. Rapid atmospheric CO₂ changes associated with the 8,200-years-B.P. cooling event. PNAS 99: 2011–2014.
- Wagner, F., Kouwenberg, L.L.R., van Hoof, T.B. & Visscher H.** 2004. Reproducibility of Holocene atmospheric CO₂ records based on stomatal frequency. Quaternary Science Reviews 23 1947–1954.
- Yan, K., Liu, Z., Chen, W., Zhang, G., He, X., Xu, S. & Wang L.** 2010. Elevated CO₂ ameliorated oxidative stress induced by elevated O₃ in *Quercus mongolica*. Acta Physiologiae Plantarum 32: 375-385.
- Zhang, Y.** 2002. The age and accretion of the Earth. Earth-Science Reviews 59: 235–263.

***Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *macrocephalum* (DC.) R. R.**

Johnson e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *runderale*:

**composição química dos óleos voláteis durante o ciclo de
desenvolvimento.**

Resumo

Porophyllum ruderale é uma Asteraceae popularmente conhecida como arnica ou couve-cravinho. É utilizada na medicina popular como cicatrizante, antiinflamatória e antimicrobiana. Em São Paulo ocorrem duas subespécies: *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* e *Porophyllum ruderale* subsp. *ruderale*. Diante disso, o presente trabalho visa comparar a composição química dos óleos voláteis das duas subespécies ao longo do ciclo de desenvolvimento destas em dois locais de cultivo: Instituto de Botânica/SP (IBt) e Mogi-Guaçu/SP (MGÇ). Partes aéreas foram submetidas por hidrodestilação aparelho do tipo Clevenger, durante quatro horas. Os óleos voláteis obtidos foram analisados por CG-EM. Houve variação no rendimento e diferenças quantitativas foram encontradas nos óleos voláteis das subespécies estudadas. Os compostos majoritários foram limoneno (29,9 – 83,5%) e mirceno (21,83 – 20,60%) para a subespécie *macrocephalum* e E- β -ocimeno (25,5 – 57,7%), limoneno (14,7 – 25,2) e β -pineno (5,4 – 12,9%) para a subespécie *ruderale*. Mesmo sendo cultivados em ambientes diferentes os compostos majoritários foram mantidos para as duas subespécies. Estes mesmos compostos foram diferentes quando comparados entre as duas subespécies. A variação tanto quantitativa como qualitativa na composição dos óleos voláteis pode alterar a resposta destes compostos nas atividades biológicas, sendo de suma importância a correta identificação do material vegetal para fins medicinais.

Palavras chave: arnica, Asteraceae, óleos essenciais, variações fenológicas

Abstract

Porophyllum ruderale Asteraceae is commonly known as arnica or couve-cravinho. Used in folk medicine as a wound healing, anti-inflammatory and antimicrobial. Two subspecies occur in São Paulo: *Porophyllum ruderale* subs. *macrocephalum* and *Porophyllum ruderale* subs *ruderale*. Thus, the present study aims to compare the chemical composition of volatile oils from two subspecies during the development cycle of these two cultivation sites: Instituto de Botânica / SP (IBt) and Mogi-Guaçu/SP (MGC). Aerial parts were submitted by hydrodistillation Clevenger type apparatus for four hours. The volatile oils were analyzed by GC-MS. There was variation in the yield and quantitative differences were found in the volatile oils of the subspecies studied. The major compounds were limonene (29.9 to 83.5%) and myrcene (21.83 to 20.60%) for the subspecies *macrocephalum* and E- β -ocimene (25.5 to 57.7%), limonene (14.7 to 25.2) and β -pinene (5.4 - 12.9%) for subspecies *ruderale*. Even being grown in different environments the major compounds were kept for the two subspecies. These same compounds were different when compared between the two subspecies The quantitative and qualitative variation of volatile oils composition can alter the response of these compounds in biological activities, which is extremely important to correctly identify the plant material for medicinal use.

Keywords: arnica, Asteraceae, essential oil, phenological variations.

Introdução

O gênero *Porophyllum* (Asteraceae) é nativo do Hemisfério Ocidental, com ocorrência no sul de Nevada, Califórnia, Texas, Arizona, sul do Peru, norte da Argentina e sul do Brasil (Johnson, 1969). *Porophyllum ruderale* é conhecida na medicina popular como arnica, couve-cravinho, erva-de-veado muito utilizada pelos povos do Brasil, Paraguai, Peru, Bolívia, (Schmeda-Hirschmann & Bordas 1990, Albuquerque *et al.* 2007, Bussmann *et al.* 2010, Odone *et al.* 2012, Hajdu & Hohmann 2012), sendo empregada como cicatrizante, hemostático, antiinflamatória, antimicrobiana e no tratamento de escoriações, traumatismo e contusões (Souza *et al.* 2003, Goleniowski *et al.* 2006, Lorenzi & Matos 2008, Lima *et al.* 2011) e como condimento (Picó & Nuez 2000).

Johnson (1969) separou a espécie *macrocephallum* incorporando-a como uma subespécie de *Porophyllum ruderale* ficando então com duas subespécies *macrocephalum* e *ruderale* as quais ocorrem naturalmente no Brasil. *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *macrocephalum* (DC.) R.R. Johnson e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *ruderale* são ervas anuais com presença de glândulas de óleo nas folhas conferindo um aroma característico sendo a posição destas glândulas na lâmina foliar da planta ainda jovem utilizada como auxílio na identificação das subespécies (Figura 1) Devido ao aroma característico e às propriedades medicinais, existem muitos estudos sobre a composição químicas dos óleos voláteis de *P. ruderale* na América do Sul (Loayza *et al.* 1999, Bezerra *et al.* 2002, Fonseca *et al.* 2006, Rondón *et al.* 2008). Nos trabalhos encontrados, não há relatos a respeito das subespécies utilizadas, assim, o presente trabalho tem como objetivo comparar a composição química dos óleos voláteis das subespécies *macrocephalum* e *ruderale* durante o ciclo de desenvolvimento contribuindo assim com maiores informações a respeito da espécie.

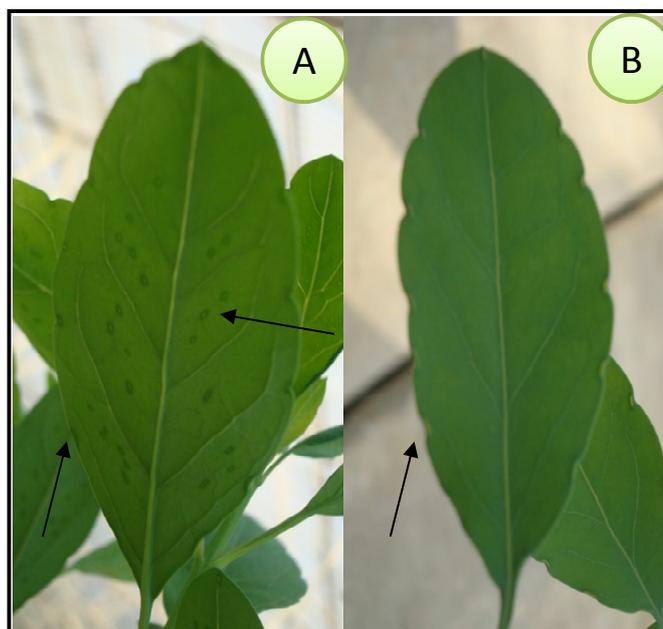


Figura 1. Detalhe da posição das glândulas de óleo volátil nas folhas de *Porophyllum ruderale*. **A:** *P. ruderale* subsp. *macrocephalum*, disposição das glândulas de óleo nas margens e região central da lâmina foliar; **B:** *P. ruderale* subsp. *ruderale*, disposição das glândulas de óleo somente na região marginal da lâmina.

Material e métodos

Material vegetal

Partes aéreas de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subsp. *macrocephalum* (DC.) R. R. Johnson e *Porophyllum ruderale* subsp. *ruderale* (Jacq.) Cass cultivados na Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MGÇ) e no núcleo de Pesquisa de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, São Paulo, SP (IBt). Exsicatas foram identificadas pela Dra. Inês Cordeiro e Dr. Benoît Francis Patrice Loeuille e depositadas no Herbário Científico do Estado “Maria Eneyda P. K. Fidalgo” (SP) do Instituto de Botânica com o número do coletor: Raggi 21 (*macrocephalum*) e Raggi 22 (*ruderale*).

Condições de cultivo

Para a subespécie *ruderale*, sementes oriundas de matrizes cultivadas no Instituto de Botânica em 2009 foram semeadas em tubetes de polietileno de 50 mL, contendo três sementes por tubete, em 31/maio/2010 (Mendonça *et al.* 2003) e mantidos no núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica, com irrigação diária. A germinação ocorreu por volta de 08/06/2010 e cerca de 45 dias após a germinação, as mudas foram transferidas para vasos de dois litros contendo quatro mudas por vaso. Até esta etapa, o substrato utilizado foi Tropstrato HT. Em 30/09/2010, quando as mudas alcançaram ca. 35 cm de comprimento foram transferidas para os canteiros. Para cada localidade, Instituto de Botânica e Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, foram plantadas 200 mudas em espaçamento 0,30 x 0,30 cm. A coleta inicial se deu no momento do transplante para os canteiros, a segunda coleta 40 dias após e as demais, a cada 30 dias.

Para a subespécie *macrocephalum*, foram utilizadas sementes de matrizes mantidas no núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica oriundas de Mogi-Guaçu. A semeadura foi realizada em vaso de dois litros contendo Tropstrato HT como substrato e quatro sementes por vaso. Em 15/12/2010, 20

dias após a germinação, as mudas com ca.de 20 cm foram transplantadas para os canteiros. Para cada localidade, Instituto de Botânica e Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, foram plantadas 200 mudas em espaçamento 0,30 x 0,30 cm. A coleta inicial se deu no mesmo período do transplante e as demais, a cada 30 dias.

Medições

Para cada subespécie e cada localidade foram marcados vinte indivíduos nos quais eram realizadas as medições de altura e diâmetro do caule rente ao solo com auxílio de trena e paquímetro, respectivamente. Número de ramos, botões florais, flores e frutos foram contados a cada coleta.

Extração e identificação de óleos voláteis

O material fresco coletado (partes aéreas) foi separado em três partes e congelado em freezer a - 22°C para posterior extração. A extração do óleo volátil foi realizada por hidrodestilação em processo contínuo com aparelho do tipo Clevenger, por 4 horas, em três repetições (Farmacopéia 2001). O óleo foi separado com pentano e secado com sulfato de sódio anidro. O pentano foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório a temperatura ambiente em sala climatizada. O óleo obtido foi armazenado em frasco com tampa, em freezer a - 22 °C para posterior análise.

O rendimento de cada óleo foi calculado a partir da massa fresca de material vegetal (Sayuri *et al.* 2010). Os óleos voláteis extraídos foram diluídos em acetona 1:10 (v:v) e 1 µL de cada amostra diluída foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se cromatógrafo a gás Agilent (serie 6890) acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo (5973), com coluna capilar HP 5-MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, com 0,25 µm de espessura), operando a 70 eV. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C . A programação da temperatura do forno foi de 40 °C por 1 min, 40 a 240 °C a 3 °C min⁻¹ e 240 °C por 10 min com tempo total de análise de 77,6 min, utilizando hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). O

índice de retenção (IR) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcanos (C₈ a C₃₀) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica. A identificação dos compostos foi feita por comparação entre os espectros de massas obtidos com aqueles registrados na base de dados da biblioteca Willey 275 e Adams (2007).

Análise estatística

Foi utilizada análise de variância unidirecional (ANOVA) e aplicado o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Durante o desenvolvimento de uma planta, ocorre uma série de alterações fisiológicas importantes para a sobrevivência e adaptação do vegetal ao meio ambiente. Os diferentes estádios de desenvolvimento do organismo vegetal, isto é, germinação, juvenilidade, reprodução e morte, podem alterar a composição química de metabólitos secundários (Gobbo-Neto *et al.* 2007).

Porophyllum ruderale subsp. *macrocephalum* e *Porophyllum ruderale* subsp. *ruderale* foram cultivadas em dois locais distintos: Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Mogi-Guaçu – SP e no Instituto de Botânica, São Paulo – SP. Inicialmente os experimentos seriam conduzidos no mesmo período, mas a subespécie *macrocephalum* floresceu antes de ir para o canteiro necessitando assim de replantio, dessa forma, como será observado na Tabela 1, nem sempre o período de coleta coincidiu.

Uma característica importante para a distinção entre as subespécies é a posição das glândulas de óleo na lâmina foliar (Figura 1). Durante o cultivo foi notado que até o terceiro par de folhas ambas continham as glândulas de óleo posicionadas na região marginal da lâmina, a diferença da posição das glândulas de óleo ocorre a partir do aparecimento do quarto par de folhas. Segundo R.R. Johnson (1969), autor da subespécie *macrocephalum*, a superfície da lamina foliar pode apresentar ou não glândulas de óleo e, durante o experimento foi observado que após a ramificação e aparecimento de botões florais e flores, as folhas que surgem apresentam tamanho reduzido e não contêm glândulas na região laminar dificultando assim, a diferenciação entre as subespécies. No entanto, estas podem ser identificadas através de características taxonômicas das cipselas (Johnson 1969).

Os dados de temperatura máxima e mínima, precipitação total (mm), e umidade relativa do ar dos locais de coleta após o plantio em canteiros, são apresentados na Tabela 1 bem como a fase fenológica de cada subespécie.

O plantio em canteiro para a subespécie *ruderale* se deu aos 110 dias após a germinação (setembro/2010) quando estas apresentaram o tamanho médio de 35 cm (Figura 1C). Foi observado que a fase vegetativa de *P. ruderale* subsp. *ruderale* (ca. 150 dias) é mais longa quando comparada com a subespécie *macrocephalum* que aos 75 dias já apresentava botões florais e flores (Tabela 1). Por outro lado, ambas tiveram o estágio reprodutivo adiantado quando cultivadas em Mogi-Guaçu. As oscilações endógenas podem ser ajustadas em respostas as mudanças diárias e sazonais de luz e ciclos de temperatura (Más & Yanovsky 2009), podendo ser uma justificativa para a antecipação da floração nas subespécies cultivadas em Mogi-Guaçu.

As medições de crescimento, altura (cm) e diâmetro do caule (cm), das subespécies cultivadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MGÇ) e no Instituto de Botânica (IBt) são mostradas na Figura 3. No geral, as subespécies tiveram o crescimento acentuado até o início do estágio reprodutivo 180 e 210 dias para *ruderale* cultivada em MGÇ e IBt, respectivamente (Figura 3 C) e 110 dias para *macrocephalum* cultivada no IBt. Esta observação não foi notada para a subespécie *macrocephalum* cultivada em MGÇ, que teve sua fase reprodutiva iniciada aos 75 dias (Figura 3A), e aos 140 dias já apresentava indícios de senescência. De acordo com Larcher (1986), quando a planta atinge a maturidade necessária para florescer, há uma desaceleração no crescimento, pois ocorre a combinação do crescimento do corpo vegetativo junto ao ciclo reprodutivo, que ora se processam simultaneamente, ora alternadamente, de acordo com a espécie vegetal (Magalhães, 1985).

Na Figura 4 e Tabelas 2 e 3 são apresentados os dados de rendimento dos óleos voláteis das subespécies de *Porophyllum ruderale* cultivadas em Mogi-Guaçu e IBt, ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta.

Tabela 1. Média mensal da temperatura máxima e mínima, precipitação total (mm), e umidade relativa do ar (%) da Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MGÇ) e do Instituto de Botânica (IBt) durante o período de coleta; e observações dos estádios de desenvolvimento das subespécies *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* (PRM) e *Porophyllum ruderale* subsp. *runderale* (PRR). VG = estágio vegetativo; BT, FL, FR estágio reprodutivo onde BT – Botões Florais; FL – Flores; e FR – Frutos.

	2010										2011							
	setembro		outubro		novembro		dezembro		janeiro		fevereiro		março		abril		maio	junho
	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	IBt	IBt
Temperatura max (°C)	35	25,1	36	23,7	34	26,1	34	27,6	34	29,3	34	30,2	34	25,3	32	26,4	22,5	21,7
Temperatura min (°C)	13	14,2	11	13,6	11	15,6	17	18,4	18	19,5	18	19,1	18	18,1	15	16,7	12,7	9,7
Precipitação (mm)	50	96,7	27	76,6	84	159,2	240	280,6	344	466,3	232	327,6	197	91,4	114	102,3	23,6	65,4
Umidade relativa (%)	55	76,9	63	82,5	67	80,1	73	84,1	77	83,4	73	80,7	80	86,9	74	81,7	82,7	81,1
Fenologia PRM	-	-	-	-	-	-	VG	VG	VG	VG	BT/FL	VG	BT/FL	BT	FR	BT/FL	FR	FR
Fenologia PRR	VG	VG	VG	VG	VG	VG	BT/FL	BT	FL/FR	FL	FR	FR	FR	FR	-	-	-	-

Fonte dos dados meteorológicos: MGÇ = International Paper; IBt = IAG/USP

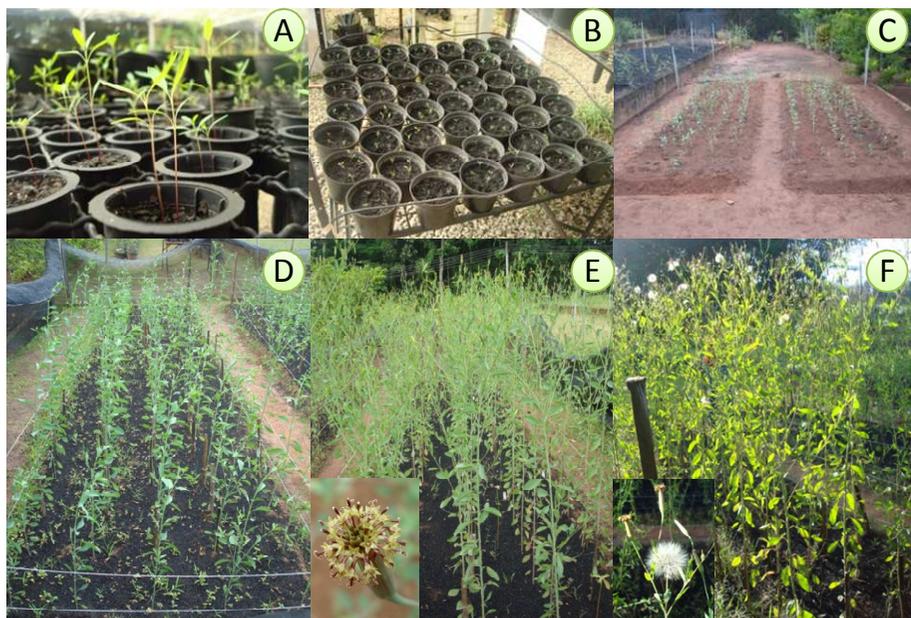


Figura 2. Estádio de desenvolvimento da subespécie *runderale*. A - D: estágio vegetativo; E - F: estágio reprodutivo.

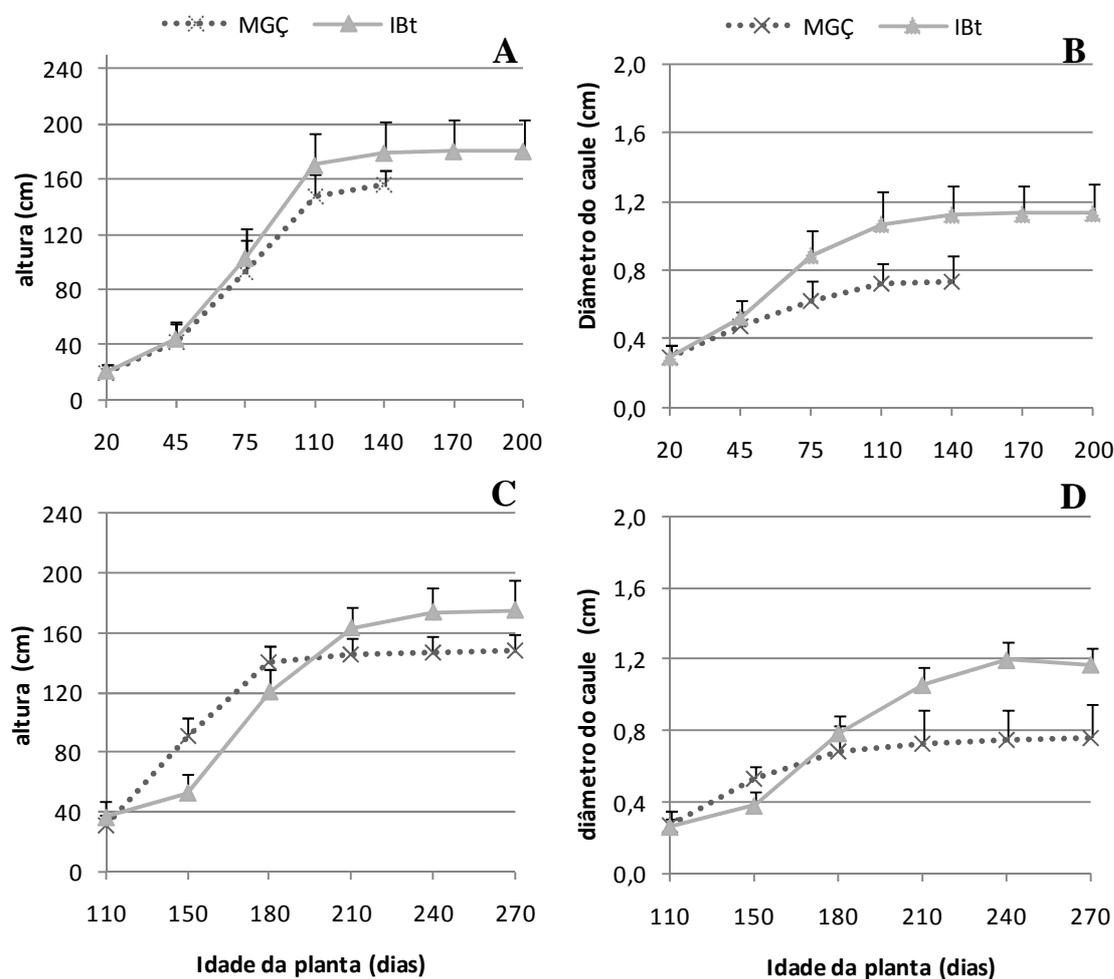


Figura 3 – Medidas de crescimento, altura (A e C) e diâmetro do caule rente ao solo (B e D), de *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* (A-B) e *Porophyllum ruderale* subsp. *runderale* (C-D) durante o estágio de desenvolvimento em dois locais distintos, Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MGÇ) e Instituto de Botânica (IBt). As barras indicam o desvio padrão (n=16).

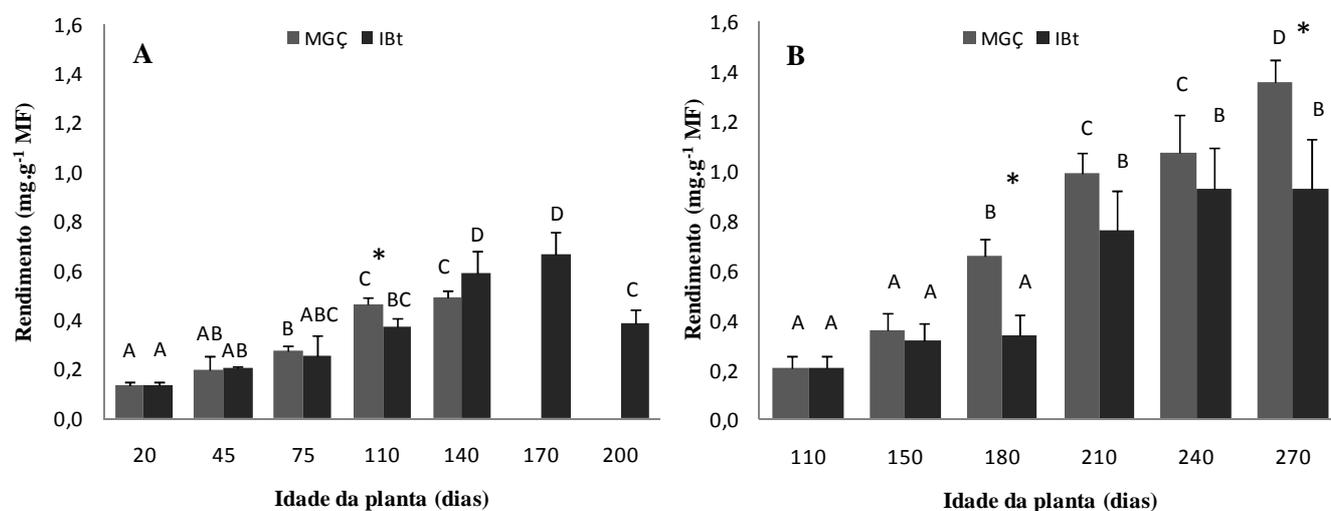


Figura 4 - Rendimento médio (mg.g^{-1} MF) dos óleos voláteis de partes aéreas de *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* (A) e *Porophyllum ruderale* subsp. *runderale* (B) durante o estágio de desenvolvimento em dois locais distintos, Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MGÇ) e Instituto de Botânica (IBt). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. * Diferença entre os locais de coleta. As barras indicam o desvio padrão ($n=3$ extrações).

Para a subespécie *macrocephalum* o rendimento inicial, aos 20 dias, dos óleos voláteis de partes aéreas foi de $0,13 \text{ mg.g}^{-1}$ Massa Fresca. Para as plantas cultivadas em MGÇ o menor rendimento foi aos 45 dias e o maior aos 110 dias correspondendo a $0,19$ e $0,49 \text{ mg.g}^{-1}$ MF respectivamente. No IBt, o menor rendimento também foi aos 45 dias ($0,21 \text{ mg.g}^{-1}$ MF) e o maior aos 170 dias $0,66 \text{ mg.g}^{-1}$ MF. Com 200 dias de cultivo, houve uma redução de 40% no rendimento do óleo volátil. O rendimento da subespécie *runderale* foi maior quando comparado com a subespécie *macrocephalum*, esse mesmo resultado foi obtido avaliando a influência da nutrição mineral no teor e composição química dos óleos voláteis das subespécies *macrocephalum* e *runderale* (Leporini, dados não publicados). O rendimento inicial dos óleos voláteis de partes aéreas da subespécie *runderale* foi de $0,21 \text{ mg.g}^{-1}$ MF. Para as plantas cultivadas em MGÇ o rendimento variou entre $0,36 - 1,35 \text{ mg.g}^{-1}$ MF e no IBt a variação foi de $0,32 - 0,92 \text{ mg.g}^{-1}$ MF. Não foi observado redução do teor dos óleos voláteis na última coleta. Na

Bolívia, o teor dos óleos voláteis de *Porophyllum ruderale* foi de 3,0 mg.g⁻¹ massa seca (Loayza *et al.* 1999). Fonseca *et al.* (2006, 2007) também verificaram variações no teor do óleo volátil de folhas de *P. ruderale* cultivada em Minas Gerais, o rendimento (0,07 – 0,13 mg.g⁻¹ MF) foi inferior ao observado neste estudo. Por outro lado, o rendimento do óleo volátil das flores foi de 0,45 mg.g⁻¹ MF, os autores sugerem uma realocação de óleo volátil para as gemas florais o que de fato pode acontecer, pois os maiores teores de óleo apresentados aqui também correspondem ao período após a floração. Esta pode ser uma estratégia para atrair polinizadores e dispersar predadores (Wink 2010).

A composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *P. ruderale* subsp. *macrocephalum* e *P. ruderale* subsp. *ruderale* durante os estádios de desenvolvimento, cultivadas na Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu e no Instituto de Botânica são apresentados nas Tabelas 2 e 3 e Figuras 5 e 6.

Os óleos voláteis de *P. ruderale* são formados majoritariamente por mono- e sesquiterpenos. O teor destes compostos e do hidrocarboneto undeceno variou durante as fases de desenvolvimento da planta.

Para a subespécie *macrocephalum* com idade de 20 e 45 dias os óleos voláteis apresentaram menor teor de monoterpenos (35,2 – 40,6%) e maior de sesquiterpenos (12,1 – 19%) quando comparados com as demais idades, além da grande concentração de outros componentes (28,8 – 35,6%) tais como: alcenos, aldeídos e ácidos graxos. A partir dos 75 dias de idade, o teor médio de monoterpenos é ca.de 90% .

Quanto aos monoterpenos, o limoneno foi o composto majoritário durante todo o período de desenvolvimento da planta, aos 20 dias corresponde a 29,9% chegando a 83,5% quando a planta atinge a idade de 140 dias. O mirceno apresentou maiores concentrações após 75 dias atingindo o máximo teor, 21,83 e 20,60% quando as plantas estavam no período de dispersão dos frutos aos 140 dias de

idade em MGÇ e 200 dias no IBt, respectivamente. O sabineno e β -pineno só foram identificados após os 75 dias, e apenas nesta idade foi identificada a presença de α -pineno. Já o monoterpene *E*- β -ocimeno se manteve praticamente constante durante o ciclo de desenvolvimento da planta.

Em relação aos sesquiterpenos, o α e β -isocomeno foram os principais nas coletas realizadas aos 20 e 45 dias com uma média de 3 e 2%, respectivamente. A presença do hidrocarboneto undeceno foi constante em todo o período analisado, exceto para a primeira e última coletas, nas quais a concentração foi três e duas vezes maior que nas demais coletas.

A composição química dos óleos voláteis de partes aéreas da subespécie *macrocephalum* cultivada no IBt, aos 45 dias de idade apresentou alguns componentes que não foram comuns aos demais como o aldeído nonanal, os monoterpenos *trans*-carveol e carvona, álcool decanol, o hidrocarboneto trideceno e alguns compostos que não puderam ser identificados. Os ácidos graxos mirístico, palmítico, linoléico e linolênico foram identificados principalmente nas duas primeiras coletas.

Foi possível observar que a subespécie *macrocephalum* se desenvolveu de forma mais rápida em MGÇ. A composição química dos óleos voláteis foi similar em ambos locais quando as plantas apresentavam 75 dias de idade e estavam no período final da fase vegetativa e início da reprodutiva (MGÇ). Plantas com idade entre 110, 140 e 170 dias no IBt apresentaram semelhança na composição química dos óleos voláteis das plantas com 110 dias de MGÇ; na última coleta de MGÇ, quando as plantas tinham 140 dias, a composição química dos óleos voláteis foi semelhante à da última coleta do IBt aos 200 dias, este fato pode estar relacionado a senescência das plantas.

A composição química dos óleos voláteis da subespécie *ruderale* (Tabela 3) foi majoritariamente composta por monoterpenos (56,3 – 96,9%) com a presença de alguns oxigenados. Dos sesquiterpenos identificados (0,6 – 8,8%) quase todos são oxigenados. Houve ainda a presença de

outros componentes como o hidrocarboneto undeceno. Não foi possível a identificação dos componentes voláteis referentes à primeira coleta, aos 110 dias.

Dentre os monoterpenos, o componente majoritário foi o *E*- β -ocimeno (25,5 – 57,7%), seguido de limoneno (14,7 – 25,2%) e β -pineno (5,4 – 12,9%). Os monoterpenos α -pineno, sabineno e mirceno foram constantes em todo o período de análise não ultrapassando o teor de 3,6%. Foram identificados alguns monoterpenos oxigenados como trans epóxi ocimeno e terpinen-4-ol em baixas concentrações e o β -ciclocitral (0,3 – 7,7%) sendo os maiores teores identificados na coleta realizada aos 150 dias.

O sesquiterpeno majoritário espatulenol (0,6 - 6,2%) foi identificado em todo o período estudado, já β -cariofileno, germacreno-D, biciclogermacreno e óxido de cariofileno apresentaram menor ocorrência.

Assim, como ocorreu com a subespécie *macrocephalum*, a *ruderale* cultivada em MGÇ também teve o seu ciclo reprodutivo adiantado sendo possível observar a diferença da composição química dos óleos voláteis entre as localidades MGÇ e IBt aos 180 dias, momento em que as plantas cultivadas em MGÇ já apresentavam botões florais e flores e as do IBt apenas poucos botões.

O óleo volátil de *P. ruderale* contendo o monoterpeno *E*- β -ocimeno como componente majoritário (93%) apresentou forte atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (Fontes-Jr *et al.* 2012). Composição semelhante à encontrada neste trabalho foi identificada por Souza (2003) em plantas coletadas no Rio de Janeiro. O óleo volátil rico em *E*- β -ocimeno (53%), mirceno (16%), limoneno (13%) e undeceno (10%) apresentou atividade antiinflamatória.

Devido ao forte odor exalado das folhas e propriedades medicinais atribuídas a *Porophyllum ruderale*, muitos trabalhos foram realizados a fim de identificar os constituintes químicos dos óleos voláteis. Na Venezuela, os constituintes majoritários são uma mistura de limoneno e β -felandreno (Rondón *et al.* 2008), na Bolívia e Argentina o componente majoritário foi o monoterpeno sabineno

(Loayza *et al.*, 1999, Juliani *et al.* 2004). No Brasil, os monoterpênos limoneno e β -felandreno foram identificados em plantas coletadas no Ceará e cultivadas em Minas Gerais, respectivamente (Bezerra *et al.* 2002, Fonseca *et al.* 2006).

Alguns autores atribuem às diferenças encontradas na composição química a origem geográfica ou existência de quimiotipos. No entanto, Guillet *et al.* (1998) cultivaram *P. ruderale* subsp. *macrocephalum* no Canadá com sementes oriundas do México e identificaram como componente principal nas folhas o monoterpêno limoneno. Este foi o único trabalho em que a subespécie foi mencionada e o componente majoritário corroborou com o componente principal identificado para a subespécie *macrocephalum* no presente trabalho. O monoterpêno limoneno foi identificado também como o componente majoritário do óleo volátil de *P. ruderale* coletado no Ceará (Bezerra *et al.* 2002). No presente estudo, identificamos como componente majoritário do óleo volátil de *P. ruderale* subsp. *ruderale* o monoterpêno E- β -ocimeno sendo este, identificado como componente majoritário do óleo volátil de *P. ruderale* coletado em Sergipe (Fontes-Jr *et al.* 2012) e Rio de Janeiro (Souza *et al.* 2003).

Segundo Johnson (1969) na América do Sul as duas subespécies são simpátricas, sendo comum a existência de plantas intermediárias, geralmente com características vegetativas de *macrocephalum* e florais de *ruderale* ou vice-versa. Segundo este mesmo autor, as características das cipselas podem diferenciar as subespécies. Analisando a figura ilustrativa apresentada no trabalho de Fonseca (2001), é possível notar características vegetativas da subespécie *macrocephalum* e características florais (cipselas mais curtas com papus mais longos) da subespécie *ruderale* o que nos leva a acreditar que possivelmente este seja um espécime simpátrico, o que justificaria a diferença encontrada na composição química do óleo volátil de plantas coletadas em Minas Gerais, rico em β -felandreno (Fonseca *et al.* 2006).

Este é o primeiro estudo comparando a composição química de duas subespécies de *Porophyllum*. E os resultados obtidos no presente estudo mostraram as diferenças e a complexidade na composição química dos óleos voláteis das subespécies de *Porophyllum* durante o ciclo de desenvolvimento. No início do desenvolvimento, a complexidade química, para ambas as subespécies, foi muito maior quando comparado ao final do desenvolvimento, essa complexidade pode estar relacionada aos sistemas de defesa do vegetal contra herbivoria. Foi observado ainda que, no momento em que as plantas iniciam o processo reprodutivo, essa complexidade química é reduzida.

Foi possível verificar que o fator genético foi mais determinante na composição química dos óleos voláteis do que o fator geográfico uma vez que não houve alterações na composição química dos óleos voláteis de plantas cultivadas em locais diferentes mas houve diferenças significativas quando comparamos as subespécies.

Essas informações podem contribuir para a seleção de subespécies visando o uso potencial desses óleos.

Tabela 2. Composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* cultivadas no Instituto de Botânica (IBt) e na Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (MGÇ) durante o estágio de desenvolvimento. I.R.: Índice de Retenção; n.i.: compostos não identificados.

Composto	I.R.	Concentração relativa (%)															
		20 dias		45 dias		75 dias		110 dias		140 dias		170 dias		200 dias			
		MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	IBt	IBt				
pentanona	823	3,2 ± 1,0	2,1 ± 0,9	2,9 ± 0,6	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-pineno	931	-	-	-	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sabineno	971	-	-	-	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,1	-	-	
β-pineno	975	-	-	-	1,4 ± 0,7	1,7 ± 0,9	2,4 ± 0,8	0,4 ± 0,3	2,3 ± 0,9	0,7 ± 0,6	1,1 ± 1,0	2,4 ± 2,0	-	-	-	-	
mirreno	988	2,7 ± 2,0	5,5 ± 2,0	4,5 ± 2,0	13,2 ± 7,0	16,1 ± 7,0	14,3 ± 8,0	4,7 ± 0,9	21,8 ± 8,0	6,3 ± 5,0	9,1 ± 7,0	20,6 ± 12,0	-	-	-	-	
limoneno	1027	29,9 ± 7,0	32,7 ± 8,0	30,2 ± 2,0	70,2 ± 10,0	68,9 ± 8,0	69,3 ± 4,0	81,8 ± 1,0	68,3 ± 9,0	83,5 ± 6,0	79,3 ± 9,0	58,8 ± 17,0	-	-	-	-	
E-β-ocimeno	1045	2,6 ± 0,3	2,2 ± 1,0	-	3,9 ± 0,1	3,8 ± 0,6	7,6 ± 8,0	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,5 ± 0,1	4,7 ± 0,9	-	-	-	-	
undeceno	1088	15,6 ± 2,0	5,1 ± 3,0	4,2 ± 0,8	5,6 ± 0,6	4,9 ± 1,0	3,7 ± 0,5	6,8 ± 0,4	4,2 ± 0,1	5,4 ± 0,9	5,3 ± 0,3	11,1 ± 1,0	-	-	-	-	
nonanal	1098	-	-	0,9 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
terpinen-4-ol	1174	-	0,2 ± 0,4	-	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
decanal	1199	2,7 ± 0,8	4,9 ± 0,6	10,4 ± 2,34	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,6 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	
trans carveol	1211	-	-	1,4 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
carvona	1237	-	-	1,6 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
decanol	1268	-	-	0,7 ± 0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
trideceno	1287	-	-	0,3 ± 0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
n.i.	1294	-	-	0,7 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
silfineno	1337	0,2 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
n.i.	1353	-	-	0,7 ± 0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
n.i.	1369	-	-	0,0 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
modéfeno	1373	0,8 ± 0,2	-	0,8 ± 0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-isocomeno	1379	3,4 ± 0,9	3,1 ± 0,1	4,5 ± 0,8	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-	0,5 ± 0,0	-	-	0,5 ± 0,0	1,0 ± 0,1	-	-	-	-	
β-isocomeno	1399	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,1	2,5 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
β-cariofileno	1408	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-humuleno	1440	0,2 ± 0,4	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
germacreno-D	1462	1,0 ± 0,1	3,6 ± 1,0	-	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,3	-	-	-	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,2	-	-	-	-	
bibiclogermaceno	1476	0,5 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
indipona	1480	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,5	2,1 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Continua...

Porophyllum ruderale subsp. *ruderale* e *P. ruderale* subsp. *macrocephalum*

dimetil ionona	1486	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,8	1,6 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
α-cedreno epóxido	1492	1,7 ± 0,3	3,0 ± 1,0	3,7 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,3	-	-	-	-	-	-
n.i.	1536	0,5 ± 0,4	-	0,8 ± 1,4	-	-	-	-	-	-	-	-
óxido de cariofileno	1564	-	-	1,5 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
epóxido de humuleno	1596	-	-	1,0 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	1672	-	1,6 ± 0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ácido mirístico	1728	0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
contaminante	1774	0,7 ± 0,1	-	2,2 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	1790	0,9 ± 0,8	4,2 ± 1,0	-	0,1 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	-
ácido palmítico	1959	8,5 ± 1,6	8,7 ± 3,0	8,5 ± 2,0	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,3	-	-	-	-	-	-
n.i.	2099	1,9 ± 0,5	1,6 ± 0,4	2,0 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
ácido linoleico	2106	0,8 ± 0,7	2,1 ± 1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	2108	-	-	-	0,1 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	-
ácido linolênico	2108	3,8 ± 0,2	5,4 ± 3,0	0,9 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	2110	2,3 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	2156	9,1 ± 0,9	6,8 ± 3,0	8,1 ± 2,0	0,6 ± 0,2	-	-	0,5 ± 0,0	-	-	-	-
n.i.	2173	-	0,8 ± 0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	2184	2,5 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total Identificado %		82,9	86,6	87,7	99,2	100,0	100,0	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0
Monoterpenos		35,2	40,6	37,6	90,4	92,2	94,9	90,8	95,8	94,6	94,0	87,3
hidrocarbonetos		35,2	40,4	34,6	90,0	91,9	94,9	90,8	95,8	94,6	94,0	87,3
oxigenados		0,0	0,2	3,0	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sesquiterpenos		12,1	17,2	19,0	1,6	1,1	0,2	0,5	0,0	0,0	0,7	1,6
hidrocarbonetos		9,0	10,8	9,1	1,4	0,9	0,2	0,5	0,0	0,0	0,7	1,6
oxigenados		3,1	6,4	9,9	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Outros		35,6	28,8	31,0	7,3	6,7	4,9	8,2	4,2	5,4	5,3	11,1
Rendimento (mg.g ⁻¹ MF)		0,13	0,19	0,21	0,27	0,25	0,46	0,37	0,49	0,58	0,66	0,39

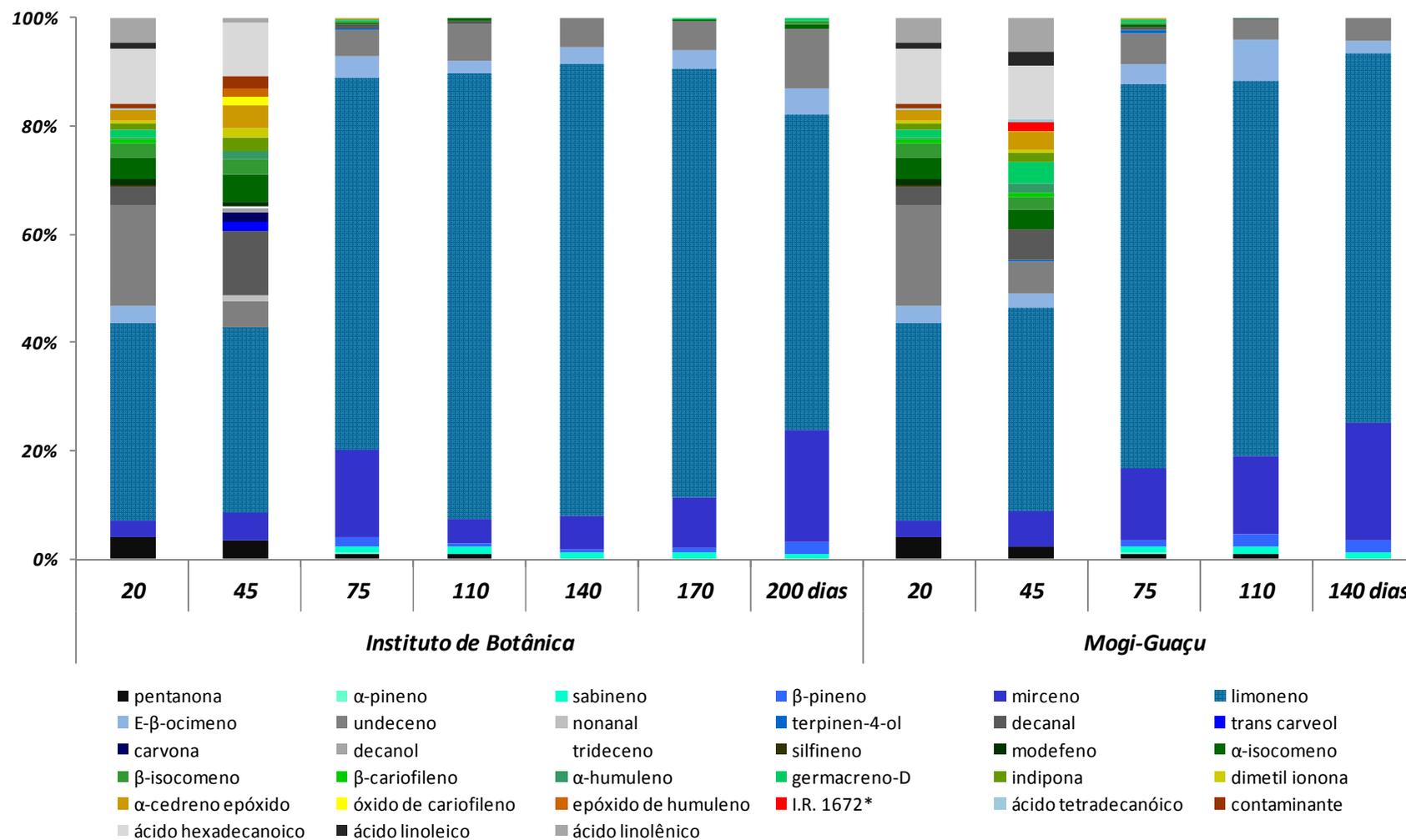


Figura 5. Compostos identificados presentes nos óleos voláteis de *Porophyllum ruderale* subs. *macrocephalum*, cultivados no Instituto de Botânica e Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu durante o ciclo de desenvolvimento. I.R. 1672 = germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol.

Tabela 3. Composição química dos óleos voláteis de partes aéreas de *Porophyllum ruderale* subsp. *runderale* cultivadas no Instituto de Botânica (IBt) e na Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (MGÇ) durante o estágio de desenvolvimento. I.R.: Índice de Retenção; n.i.: compostos não identificados.

Composto	I.R.	Concentração relativa (%)									
		150 dias		180 dias		210 dias		240 dias		270 dias	
		MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt	MGÇ	IBt
pentanona	822	2,3 ± 0,8	3,8 ± 0,6	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,0
α-pineno	931	1,5 ± 0,7	0,2 ± 0,0	2,6 ± 0,7	1,3 ± 0,1	3,1 ± 1,0	1,6 ± 0,8	2,4 ± 1,2	2,4 ± 1,0	1,2 ± 0,0	3,6 ± 2,0
sabineno	971	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,0	1,7 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,3
β-pineno	975	7,7 ± 0,7	5,4 ± 0,2	12,8 ± 1,0	8,5 ± 0,3	12,9 ± 0,5	10,1 ± 1,1	12,3 ± 0,4	9,5 ± 0,7	12,3 ± 0,7	11,3 ± 0,7
mirreno	988	1,2 ± 0,3	-	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,0	2,0 ± 1,0	0,8 ± 0,4	1,5 ± 1,0	2,7 ± 2,0	0,4 ± 0,0	3,6 ± 3,0
limoneno	1027	21,7 ± 2,0	14,7 ± 0,4	25,2 ± 3,0	22,8 ± 0,6	23,4 ± 2,0	25,2 ± 2,0	24,3 ± 4,0	26,4 ± 3,0	22,0 ± 1,0	26,9 ± 2,0
Z-β-ocimeno	1035	0,6 ± 0,6	0,5 ± 0,0	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,2
E-β-ocimeno	1046	30,4 ± 7,0	25,5 ± 1,0	47,2 ± 6,0	40,3 ± 4,0	52,2 ± 4,0	54,9 ± 6,0	53,1 ± 5,0	52,6 ± 6,0	57,7 ± 2,0	47,7 ± 7,0
undeceno	1087	5,9 ± 0,6	5,38 ± 0,1	3,5 ± 1,0	6,4 ± 0,7	1,5 ± 0,1	2,6 ± 0,8	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0
n.i.	1090	-	-	-	0,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-
trans Epoxi Ocimeno	1134	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,0	-	0,8 ± 0,1	-	-	-	-	-	-
terpinen-4-ol	1174	-	-	0,5 ± 0,2	-	0,3 ± 0,3	-	-	0,3 ± 0,0	-	-
n.i.	1191	-	0,9 ± 0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
decanal	1199	1,0 ± 0,3	-	-	0,7 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
β-ciclocitral	1201	5,2 ± 0,7	7,7 ± 0,3	1,7 ± 0,5	2,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	0,8 ± 0,6	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,43 ± 0,1
n.i.	1264	4,1 ± 2,0	9,4 ± 0,9	-	2,5 ± 0,6	-	-	-	0,3 ± 0,1	-	-
n.i.	1374	1,9 ± 0,5	3,1 ± 0,0	-	1,7 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
β-cariofileno	1408	-	-	-	0,8 ± 0,2	-	-	-	0,2 ± 0,0	-	-
n.i.	1449	1,0 ± 0,4	2,1 ± 0,1	-	0,9 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
germacreno-D	1462	-	-	-	-	0,3 ± 0,2	-	-	-	-	0,3 ± 0,1
biclogermacreno	1474	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4 ± 0,0
n.i.	1512	1,2 ± 0,5	2,5 ± 0,1	-	0,9 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
contaminante	1536	3,3 ± 1,0	4,0 ± 0,1	-	2,0 ± 0,6	-	-	-	-	-	-
n.i.	1543	1,0 ± 0,4	2,0 ± 0,1	-	0,8 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
espatulenol	1558	6,2 ± 1,0	6,2 ± 0,6	1,2 ± 0,0	2,3 ± 0,5	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Continua...

Porophyllum ruderale subsp. *ruderale* e *P. ruderale* subsp. *macrocephalum*

óxido de cariofileno	1561	1,4 ± 0,3	2,6 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	1774		1,7 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-
Total Identificado %	90,9	78,3	100,0	92,6	100,0	100,0	100,0	99,7	100,0	100,0
Monoterpenos	70,8	56,3	94,2	79,1	96,9	95,7	96,8	96,8	96,8	96,0
hidrocarbonetos	64,2	46,7	92,0	75,9	96,3	94,9	96,2	96,0	96,1	95,6
oxigenados	6,6	9,6	2,2	3,2	0,6	0,8	0,6	0,9	0,7	0,4
Sesquiterpenos	7,6	8,8	1,2	3,1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	1,5
hidrocarbonetos	0,0	0,0	0,0	0,8	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,7
oxigenados	7,6	8,8	1,2	2,3	0,6	0,8	0,8	0,6	0,6	0,8
Outros	12,5	13,2	4,6	10,4	2,3	3,5	2,4	2,1	2,6	2,5
Rendimento (mg.g ⁻¹ MF)	0,36	0,32	0,66	0,34	0,99	0,76	1,07	0,92	1,35	0,92

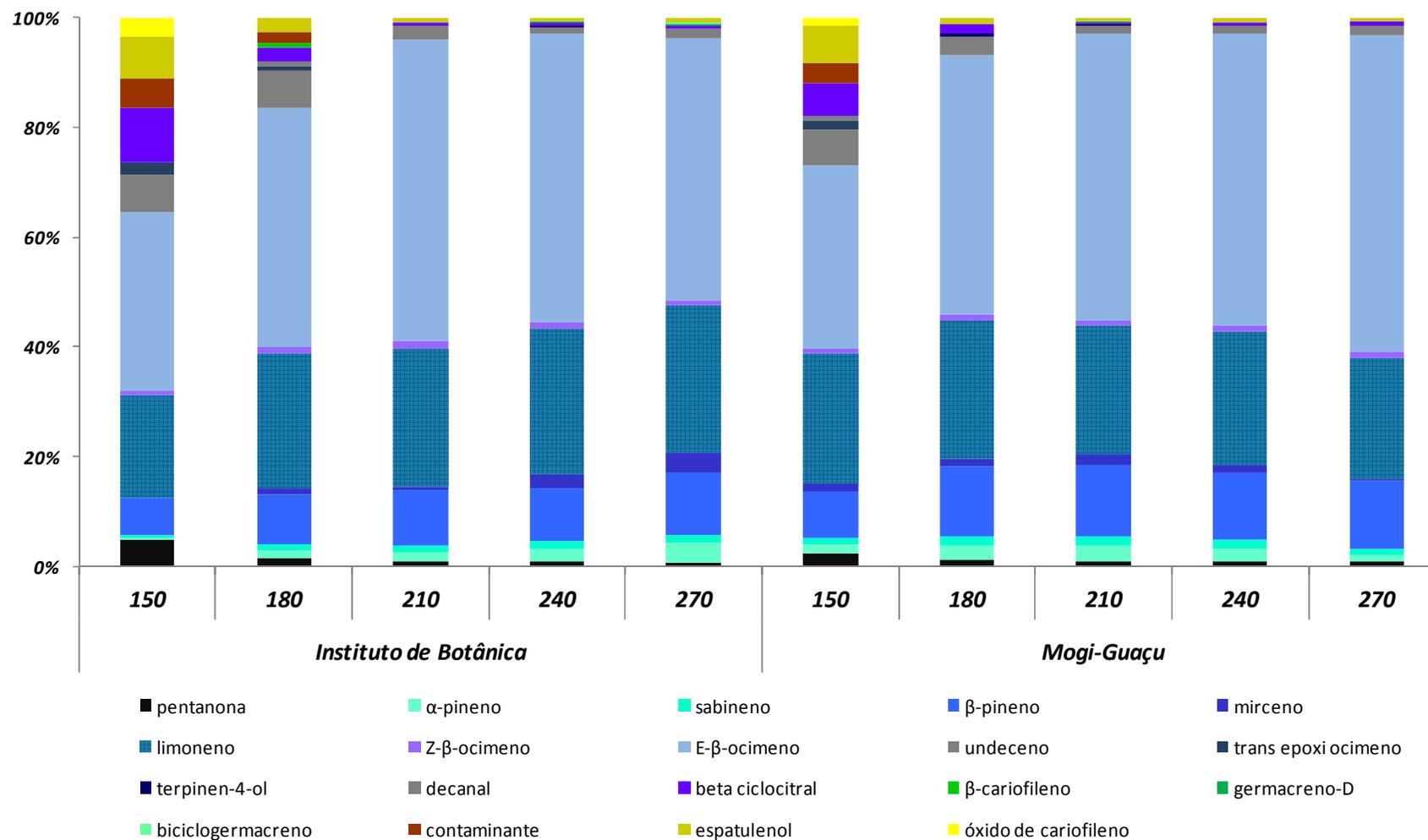


Figura 6. Compostos identificados presentes nos óleos voláteis de *Porophyllum ruderale* subsp. *ruderale*, cultivados no Instituto de Botânica e Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu durante o ciclo de desenvolvimento.

Literatura citada

- Adams, R.P.** 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Allured. Illinois.
- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L., Monteiro, J.M., Neto, E.M.F.L., Melo, J.G., & Santos J.P.** 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology* 114:325–354.
- Bezerra, M.Z.B., Andrade-Neto, M. & Freitas, R.M.** 2002. The Essential Oil of *Porophyllum ruderale* Cass (Asteraceae). *The Journal of Essential Oil Research*.14:14-15.
- Bussmann, R.W., Malca-Garcia, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Diaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frias-Fernandez, F. & Benito M.** 2010. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 132 101–108.
- Farmacopéia Brasileira** 2001. 4ed. Parte II Fascículo 2. *In*. Diário Oficial, Suplemento n.1.
- Fett-Neto, A.G.** 2008. Ritmos circadianos nas plantas *In*: Kerbauy G.B. *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan.
- Fonseca, M.C.M.** 2001. Crescimento, composição do óleo essencial, teores de óleo e de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.
- Fonseca, M.C.M., Casali V.W.D. & Barbosa L.C.A.** 2007. Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 9: 75-79.

- Fonseca, M.C.M., Barbosa, L.C.A., Nascimento, E.A. & Casali V.W.D.** 2006. Essential oil from leaves and flowers of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research* 18: 345-347.
- Fontes-Jr, U.R., Ramos, C.S., Serafini, M.R., Cavalcanti, S.C.H., Alves, P.B., Lima, G.M., Andrade, P.H.S, Bonjardim, L.R., Quintans-Jr, L.J. & Araújo A.A.S.** 2012. Evaluation of the lethality of *Porophyllum ruderale* essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Aedes aegypti* and *Artemia salina* *African Journal of Biotechnology* 11: 3169-3172.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30: 374-381.
- Goleniowski, M.E., Bongiovanni, G.A., Palacio, L., Nunez, C.O. & Cantero, J.J.** 2006. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones” Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 324-341.
- Guillet, G., Belanger, A. & Arnason, J.T.** 1998. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): identification, localization and insecticidal synergism with α -terthienyl. *Phytochemistry* 49: 423-429.
- Hajdu, Z. & Hohmann J.** 2012. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 838– 857.
- Johnson, R.R.** 1969. Monograph of the plant genus *Porophyllum* (Compositae: Helenieae). *Science Bulletin* 48: 225-267.
- Juliani, H.R., Korocho, A., Simon, J.E., Biurrun, F.N., Castellano, V. & Zygadlo J.A.** 2004. Essential oils from argentinean aromatic plants. *Acta Horticulturae* 629: 491-498.
- Larcher, W.** 1986. *Ecofisiologia Vegetal*. São Paulo: Pedagógica e Universitária.

- Lima, G.M., Bonfin, R.R., Silva, M.R., Tomazzi, S.M., Santos, M.R.V., Quintans-Jr, L.J., Bonjardim, L.R. & Araújo A.A.S.** 2011. Assessment of antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Asteraceae, aqueous extract Revista Brasileira de Farmacognosia 21: 486-490.
- Loayza, I., Groot, W., Lorenzo, D., Delacassa, E., Mondello, L. & Dugo, G.** 1999. Composition of the essential oil of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. from Bolivia. Flavour and Fragrance Journal 14: 393-398.
- Lorenzi, H. & Matos, F.J.A.** 2008. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Instituto Plantarum. Nova Odessa.
- Magalhães, A.C.N.** 1985. Análise quantitativa do crescimento. In: Ferri, M.G., coord. Fisiologia vegetal. 2.ed. São Paulo: EDUSP.
- Más, P. & Yanovsky, M.** 2009. Time for circadian rhythms: plants get synchronized Current Opinion in Plant Biology 12: 574–579.
- Mendonça, V., Neto, S.E.A., Ramos, J.D., Pio, R. & Gontijo T.C.A.** 2003. Diferentes substratos e recipientes na formação de mudas de mamoeiro ‘sunrise solo’. Revista Brasileira de Fruticultura 25: 127-130.
- Odonne, G., Valadeau, C., Alban-Castillo, J., Stien, D., Sauvain, M. & Bourdy G.** 2012. Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Paranapura basin (Peruvian Amazon). Journal of Ethnopharmacology, DOI: org/10.1016/j.jep.2012.12.014i
- Picó, B., Nuez, F.** 2000. Minor crops of Mesoamerica in early sources (II). Herbs used as condiments Genetic Resources and Crop Evolution 47: 541–552.

- Rondón, M.E., Delgado, J., Velasco, J., Rojas, J., Rojas, L.B., Morales, A. & Carmona J.** 2008. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. collected in Venezuela, *Ciencia* 16: 5-9.
- Sayuri, V.A., Romoff, P., Favero, O.A., Ferreira, M.J.P., Lago, J.H.G. & Buturi F.O.S.** 2010. Chemical Composition, Seasonal Variation, and Biosynthetic Considerations of Essential Oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*. 7: 2771-2782.
- Schmeda-Hirschmann, G. & Bordas E.** 1990. Paraguayan medicinal compositae *Journal of Ethnopharmacology*, 28: 163- 171.
- Souza, M.C., Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de-Lima, Jr. O. & Henriques M.M.M.O.** 2003. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Pharmazie* 58:582-586.
- Wink, M.** 2010. Secondary Metabolites:Deterring Herbivores *In: Encyclopedia of Life Sciences* (ELS).

Discussão geral

Nas últimas décadas, o número de trabalhos com compostos voláteis de plantas tem aumentado bastante em razão do grande interesse ecológico e econômico despertado pelas moléculas que compõem esses óleos.

Os óleos voláteis, produto do metabolismo secundário das plantas, são amplamente utilizados pelo homem desde os tempos mais remotos e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, de cosmético e de alimentos por apresentarem propriedades antimicrobianas, antiinflamatória, anticolinesterásica, anti-helmíntica, entre outras, e aromas e sabores característicos (Bizzo *et al.* 2009, Ladeira 2002, Souza *et al.* 2010).

Compostos voláteis como isoprenos, mono- e sesquiterpenos e fenilpropanóides desempenham funções ecológicas importantes para a adaptação dos vegetais ao ambiente em que vivem, atuando como substâncias de defesa contra herbívoros, inibidores de germinação e atração de polinizadores (Harrewijn *et al.*, 2001). Estas substâncias podem sofrer alterações em decorrência do ambiente em que as plantas vivem, da fase fisiológica e de fatores ambientais.

A tese foi dividida em cinco capítulos sendo o primeiro um breve histórico a respeito dos óleos voláteis, e nos demais foram realizados estudos da composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* e subespécies de *Porophyllum ruderale* em diferentes condições a fim de identificar possíveis variações na composição química dos óleos voláteis em decorrência dos diferentes ambientes.

Os capítulos 2, 3 e 4 se referem aos resultados obtidos dos experimentos realizados com *Sphagneticola trilobata* e o capítulo 5, aos obtidos com as subespécies de *Porophyllum ruderale*.

No capítulo 2, a sazonalidade bem como as variações geográficas parece exercer influência na composição química dos óleos voláteis. No inverno o rendimento dos óleos voláteis foi menor para os três locais estudados (Instituto de Botânica [IBt], Paranapiacaba [PARN] ambas em área de Mata Atlântica e Mogi-Guaçu [MGÇ] área de Cerrado) diferindo de trabalhos realizados com a espécie no qual o inverno apresentou maior rendimento (Silva *et al.* 2012). Ainda em relação ao

rendimento, foi possível notar que os maiores rendimentos foram obtidos das plantas cultivadas no Instituto de Botânica (IBt) e os menores em Paranapiacaba (PARN), ambas inseridas no bioma Mata Atlântica.

Em Paranapiacaba, uma característica marcante do local é a intensidade de nevoeiros e a alta umidade relativa do ar, praticamente de 90% o ano inteiro (Domingos *et al* 2000).

A composição química é majoritariamente de monoterpenos sendo estes diferentes nas três regiões. No IBt o componente principal foi o β -pineno em PARN α -pineno e em MGÇ houve predominância de α -felandreno e α -pineno. Estes compostos também foram majoritários em outros estudos com a espécie indicando que a variação geográfica pode influenciar na composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata*. Ainda no capítulo 2, foram testadas as atividades antifúngicas dos óleos voláteis obtidos e praticamente todos os óleos de PARN foram ativos frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. O monoterpeno α -pineno tem reconhecida atividade antimicrobiana (Ludley *et al.* 2008) mas provavelmente a mistura com os demais componentes favoreceu as atividades encontradas.

A variação diuturna dos óleos voláteis de *S. trilobata* foi estudada no capítulo 3. Foram notadas diferenças nos rendimentos dos óleos voláteis quando comparado os dois períodos de análise, verão e inverno. Diferente do capítulo anterior, maiores rendimentos foram obtidos na coleta de inverno. Os horários das 12h no verão (fevereiro) e 11 e 19h no inverno (agosto) foram os de maior rendimento. Outros trabalhos já relataram aumento do teor de óleos voláteis neste mesmo período. As variações sazonais foram mais evidentes quando comparadas com os horários de coleta.

O capítulo 4 aborda a composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* submetidas às diferentes concentrações de [CO₂] atmosférico (\approx 380 e 760 ppm). Com o aumento da disponibilidade de CO₂ as plantas no geral, tendem a aumentar a assimilação fotossintética (Oliveira *et al.* 2012) aumentando por sua vez a quantidade de carboidratos não estruturais. Alguns trabalhos relatam o aumento de óleos voláteis em plantas submetidas às diferentes [CO₂] (Vurro *et al.* 2009, Song *et al.* 2009).

Dentre os parâmetros fisiológicos analisados apenas a transpiração, aos 90 dias, apresentou diferença. O número de estômatos em plantas tratadas com elevada [CO₂] foi maior. Geralmente o número de estômatos é reduzido nestas condições (Driscoll *et al.* 2006). Quanto ao rendimento e a composição química dos óleos voláteis, foi notado aumento em função do tempo de exposição e não em função das diferentes [CO₂] atmosférico.

Conhecida como arnica ou arnica-paulistana, *P. ruderale* é muito utilizada popularmente contra contusões. É uma erva anual com presença de glândulas de óleo na lâmina foliar, visíveis a olho nu. O cheiro dos compostos voláteis é bem forte e facilmente sentimos quando danificamos suas folhas. Em Mogi-Guaçu *Porophyllum ruderale* é frequentemente encontrado e muito utilizado pela população local, o plantio de sementes oriundas de Mogi-Guaçu no Instituto de Botânica nos permitiu comparar com os indivíduos que ocorriam no Instituto de Botânica. As duas eram morfologicamente muito semelhantes mas o odor exalado a partir de suas folhas era bem diferente. No intuito de conhecer a composição química e verificar se há diferenças na composição química dos óleos voláteis durante o ciclo de desenvolvimento, desenvolvemos o capítulo 4. De acordo com os especialistas, Dra. Inês Cordeiro e Dr. Benoît Francis Patrice Loeuille verificamos que se tratavam de duas subespécies, *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* e *Porophyllum ruderale* subsp. *ruderale*.

O teor dos óleos voláteis foi diferente durante o ciclo de desenvolvimento para ambas subespécies. Em *P. ruderale* subsp. *ruderale* o rendimento dos óleos voláteis foi maior quando comparado com a subespécie *macrocephalum*. O componente majoritário de *macrocephalum* foi o monoterpene limoneno, chegando a 83,5% quando esta atinge o período de floração e mircenos. Já *ruderale*, os componentes majoritários foram os monoterpenos E-β-ocimeno, limoneno e β-pineno. Murakami (2009) observou diferenças na composição química dos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata*, Asteraceae, nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Foram notadas diferenças quantitativas em relação as diferentes localidades mas, a presença dos componentes majoritários foi sempre marcante.

Este é o primeiro trabalho que compara a composição química dos óleos voláteis de duas subespécies de *Porophyllum*. Na literatura encontramos apenas um trabalho citando a subespécie *macrocephalum* cultivada no Canadá. Neste trabalho, o componente majoritário do óleo volátil foi o monoterpeno limoneno, corroborando com os nossos resultados. A grande maioria dos autores atribui as diferenças qualitativas encontradas da composição química dos óleos voláteis de *Porophyllum ruderale* à existência de quimiotipos ou variação geográfica porém, acreditamos que a genética da planta é o principal fator de alteração da composição química dos óleos voláteis uma vez que essas subespécies, de acordo com Johnson (1969), são simpátricas.

Diante do exposto concluímos:

- Alterações na composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* são influenciadas pela sazonalidade e distribuição geográfica;
- plantas cultivadas respondem de forma diferente das ocorrentes em ecossistemas naturais;
- os óleos voláteis de *S. trilobata* que ocorrem em Mogi-Guaçu e Paranapiacaba apresentam boa atividade antifúngica;
- alterações da [CO₂] atmosférico não influenciam no teor e composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata*;
- existem duas subespécies de *Porophyllum ruderale* no estado de São Paulo apresentando teor e composição química dos óleos voláteis distinta e este é o primeiro trabalho que compara as subespécies;
- a correta identificação do material vegetal é de grande importância para a ampliação do conhecimento científico a respeito da espécie/subespécie estudada.

Literatura citada

- Bizzo, H. R., Hovell, A.M. & Rezende C.M.** 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova* 32: 588-594.
- Domingos, M., Lopes, M.I.S. & De Vuono Y. S.** 2000. Nutrient cycling disturbance in Atlantic Forest sites affected by air pollution coming from the industrial complex of Cubatão, Southeast Brazil *Revista Brasileira de Botânica* 23: 77-85.
- Driscoll, S.P. Prins, A., Olmos, E., Kunert, J.K. & Foyer, C.H.** 2006. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. *Journal Experimental Botany* 57: 381–390
- Harrewijn, P., van, A.M.O. & Piron, P.G.M.** 2001. *Natural Terpenoids as Messengers*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Johnson, R.R.** 1969. Monograph of the plant genus *Porophyllum* (Compositae: Helenieae). *Science Bulletin* 48:225-267.
- Ladeira, A.M.** 2002. *Plantas medicinais com óleos essenciais*. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Instituto de Botânica.
- Ludley, K.E., Robinson, C.H., Jickells, S., Chamberlain, P.M. & Whitaker J.** 2008. Differential response of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal mycelium from coniferous forest soils to selected monoterpenes. *Soil Biology & Biochemistry* 40:669–678
- Murakami, C.** 2009. Estudo da composição química e atividades biológicas de óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King & Rob. em diferentes fases fenológicas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica.
- Oliveira, V.F., Silva, E.A., Zaidan, L.B.P. & Carvalho, M.A.M.** 2013 Effects of elevated CO₂ concentration and water deficit on fructan metabolism in *Viguiera discolor* Baker. *Plant Biology* 15:471-482

Silva, C.J., Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J. Montanari, R.M., Francino, D., Meira, R.M.S.A. & Souza A.O. 2012. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 482-489.

Song, L., Wu, J., Li, C., Li, F., Peng, S. & Chen B. 2009. Different responses of invasive and native species to elevated CO₂ concentration. *Acta Oecologica* 35:128–135.

Souza, A., Lopes, E.M.C., Silva, M.C., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E.G. & Moreno, P.R.H. 2010. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrceugenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20: 175-179.

Vurro, E., Bruni, R., Bianchi, A. & Toppi L.S. 2009. Elevated atmospheric CO₂ decreases oxidative stress and increases essential oil yield in leaves of *Thymus vulgaris* grown in a mini-FACE system *Environmental and Experimental Botany* 65: 99–106.

Resumo

Sphagneticola trilobata Pruski e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae) são conhecidas popularmente como vedélia e arnica, respectivamente. Considerando que diferenças climáticas, localização geográfica e diferentes fases do desenvolvimento vegetal são fatores que alteram a composição química de óleos voláteis, este trabalho teve como objetivos: comparar a composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* sob aspectos sazonais, regionais (avaliando a atividade antifúngica nestes dois casos), diurnos e sob incremento de CO₂ atmosférico; e comparar a composição química dos óleos voláteis de *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* e *P. ruderale* subs. *runderale* sob aspectos regionais e de desenvolvimento. Partes aéreas e folhas frescas foram hidrodestiladas em aparelho do tipo Clevenger durante quatro horas e o óleo foi analisado por CG/MS. A atividade antifúngica foi realizada pelo método de bioautografia frente aos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. A composição química dos óleos voláteis de *S. trilobata* obtidos em três localidades (Instituto de Botânica [IBt], Paranapiacaba [PARN] e Mogi-Guaçu [MGÇ]) foi quantitativamente distinta. Os principais componentes foram α -pineno [majoritário em PARN e MGÇ], β -pineno [IBt], α -felandreno [MGÇ], limoneno, β -cariofileno e germacreno D. Diferenças no teor e composição química foram observados nas diferentes estações do ano, na atividade biológica e idade da planta. Os óleos de PARN e MGÇ apresentaram forte atividade frente aos fungos testados. O rendimento e composição química dos óleos voláteis das subespécies de *Porophyllum ruderale* foram quantitativamente diferentes. Os compostos majoritários foram: limoneno e mirceno para a subespécie *macrocephalum*; E- β -ocimeno, limoneno e β -pineno para *runderale*. Mesmo cultivadas em ambientes diferentes os compostos majoritários foram mantidos para as duas subespécies. Este é o primeiro relato comparando a composição química de subespécies de *Porophyllum*.

Abstract

Sphagneticola trilobata Pruski and *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae) are commonly known as vedélia and arnica, respectively. Since climatic differences, geographical location and different stages of plant development are factors that alter the chemical composition of volatile oils, this work aimed to compare the chemical composition of the essential oils of *S. trilobata* under seasonal, regional (evaluating the antifungal activity in these two cases), diurnal and increased atmospheric [CO₂] aspects; and to compare the chemical composition of the volatile oils of *Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum* and *P. ruderale* subs. *ruderale* under regional and plant development aspects. Aerial parts and fresh leaves were hydrodistilled in Clevenger type apparatus for four hours and the oils were analyzed by GC-MS. The antifungal activity was determined by the bioautography with the fungi *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. The chemical composition of the volatile oils of *S. trilobata* from three localities (Instituto de Botânica [IBt] Paranapiacaba [PARN] and Mogi-Guaçu [MGÇ]) was quantitatively different. The main components were α -pinene [PARN and MGÇ], β -pinene [IBt], α -phellandrene [MGC], limonene, β -caryophyllene and germacrene D. Differences in the content, chemical composition and biological activity of the oils were observed in different seasons and plant age. The oil from PARN and MGÇ showed strong inhibitory activity against the fungi tested. The yield and chemical composition of the volatile oils of *Porophyllum ruderale* subspecies were quantitatively distinct. The major compounds were: limonene and myrcene to *macrocephalum* subspecies; E- β -ocimene, limonene and β -pinene to *ruderale*. The differences in the major compounds of essential oils from these subspecies were maintained irrespective of the place of cultivation. This is the first report comparing the chemical composition of *Porophyllum* subspecies.

*Oração a Pachamama**S. Caticha Ellis*

"Mãe de Deus,
Espírito da tarde,
Filha do Sol,
Irmã da lua,
Mãe do vento,
Senhora dos Andes,
protetora da vida
em todas as suas formas.
Tu que eras a vida,
a magia de viver,
e a certeza de morrer,
és agora o mistério,
o silêncio e a majestade da cordilheira.
Acendas a madrugada de cada dia,
pressentida pelos
pássaros e pelos poetas.
Tu acolhias o Sol
cansado e sonolento
a cada entardecer
e sobre Ele estendas
mantos de vicunha,
só percebidos pelos índios da cordilheira.
Tu guiavas o índio perdido
quando seus caminhos
chegavam ao céu.
Por que te ensombreceste?
Acaso foram as caravelas?
Foi o homem branco,
que tu não criaste?
Foram seus rifles
e as matanças que fizeram
de tua criação?
Foram seus deuses ferozes
que de Atahualpa
beberam o sangue
e usurparam as riquezas?
Pachamama levanta-te:
A natureza é tua.
Restitui-a a sua antiga grandeza,
a humanidade está a tua espera,
precisa de tua bondade
e do teu equilíbrio,
e até o homem branco,
pedindo perdão de joelhos,
chorando te agradecerá."