**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Carboidratos não estruturais e aspectos anatômicos de plantas
herbáceas de campos rupestres, com ênfase em Asteraceae**

Emanuela de Oliveira Joaquim

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

Emanuela de Oliveira Joaquim
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Carboidratos não estruturais e aspectos anatômicos de plantas herbáceas de campos rupestres, com ênfase em Asteraceae

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Joaquim, Emanuela de Oliveira

Carboidratos não estruturais e aspectos anatômicos de plantas herbáceas de campos rupestres, com ênfase em Asteraceae / Emanuela de Oliveira Joaquim. - Piracicaba, 2013.

84 p: il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Compositae 2. Açúcares 3. Polissacarídeos 4. Campos rupestres I. Título

CDD 583.55
J62c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A minha mãe, Maria Graciete,
por sempre me apoiar nas minhas escolhas
e por todo amor e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho, pela orientação, dedicação e amizade. Por pegar no pé, de forma bem sutil, quando preciso. Por acreditar e confiar em mim. Obrigada por ter dado a oportunidade de ser sua aluna, e me sinto muito honrada por isso.
- À Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro, pela colaboração com o trabalho, por tudo que me ensinou e por sempre me motivar dizendo que meus resultados eram “interessantíssimos” quando estava desanimada.
- À Dra. Adriana Hissae Hayashi, pela colaboração em todo o estudo de anatomia, por todo aprendizado e pelas várias vezes que ficou ao meu lado me ajudando.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, a todos os professores, pelos ensinamentos valiosos e a todos os colegas de curso pela companhia e risadas nas horas de estresse.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.
- Ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, onde foi desenvolvido todo o trabalho, à Diretora Dra Marília Gaspar e a todos os pesquisadores.
- Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, Ana Alice, Maria Aparecida, Pedro e Mary. Obrigada pelas inúmeras vezes que me ajudaram.
- À secretária do programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva, pelas mil vezes que me ajudou, pela simpatia, competência e dedicação ao trabalho.
- Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Anatomia do Instituto de Botânica. Obrigada por me receberem tão bem.
- As anatomistas fofíssimas Poliana Cardoso e Andrea Nunes, por me ajudarem, pelas dicas, bolos, cafés, conversas e risadas.
- Ao Dr. Aristônio Teles da Universidade Federal de Goiás, pela identificação das espécies de Asteraceae da Serra Dourada. Agradeço pela oportunidade de poder conhecer e coletar nesta linda serra, pela gentileza e amizade.

- À Dra. Moemy Gomes de Moraes da Universidade Federal de Goiás, pela recepção quando cheguei a Goiânia.
- Aos alunos de iniciação científica da UFG, Gustavo e Marina por me ajudarem com os dias de estadia e nas coletas.
- Ao Leonardo Guimarães pela ajuda na coleta da Serra do Cipó e pelas dúvidas esclarecidas sobre orquídeas.
- À Dra. Nádia Roque (UFBA), ao Dr. Benoit Francis Patrice Loeuille (USP) e à Dra. Rosangela Simão Bianchini (IBT), pela identificação e depósito do material botânico.
- Às minhas amigas queridas Daiane Salette, Juliana Zerlin, Kássia Mantovani, Marina Veronesi e Vanessa Fuentes, companheiras de pós-graduação, de risadas, congressos, marmitada e salada de frutas. O trabalho fica muito mais fácil quando estamos em boa companhia. Obrigada por fazer com que o meu dia a dia no laboratório se tornasse mais leve e feliz!
- Às queridas amigas Paula Caroline Silva Moura e Marcela Muller por me acolherem em Piracicaba, seja pelo abrigo por algum tempo ou pelas caronas, idas ao shopping depois da aula, estudos e “sofrimento” em conjunto. Muito obrigada de coração e, por favor, não sumam!
- Ao meu querido teacher (Titi!) Oda, com quem eu me divertia e aprendia inglês. Por toda a força que me deu nas provas, resumos em inglês e amizade.
- Aos fitoquímicos Rodrigo Santana Cabral, Anderson Luís do Nascimento e Ludmila Raggi. Anderson, obrigada pela indicação como técnica bolsista, pelos anos de amizade na faculdade e por me ajudar na coleta da Serra do Cipó. Cabral, obrigada pela amizade destes anos, pelas conversas de bar e na ajuda na coleta (principalmente na hora do jantar!) e Lud, obrigada pelas conversas, caronas e atenção!
- Aos meus amigos que continuam e aos que já passaram pelo Instituto de Botânica, Athos Polli, Ana Paula Silva, Aline Coelho, Alex Nascimento, Bárbara Messa, César Pasqualetti, Daiane Galvão, Cláudio, Danilo Centeno, Evandro Vieira, Flávio Trevisan, Fernanda Zanizette, Glaucia Rodrigues, Glauco Fukuda, Janaína Silva, Juliana Iura, Josiane Bison, Leila Camacho, Leilyane Coelho, Maura Casari, Raíssa Rosa, Rodrigo Sanches, Thiara Siqueira e Vanessa Costa. Obrigada pelos bons momentos de convívio!
- Aos queridos João Paulo Naldi, Vanessa Oliveira e Kelly Simões, pelas inúmeras vezes que me ajudaram no laboratório, pela amizade, risadas e caronas.

- À minha querida amiga e irmã de coração, Anna Rigolli, que sempre me escutou e me aconselhou. Por sempre estar presente e torcer pela minha felicidade.
- Aos meus amigos que não entendem nada do que eu faço, mas sempre me apoiaram e torceram por mim.
- À minha família, por me apoiarem, respeitarem meus desejos e minhas decisões, por torcerem por um bom futuro e acima de tudo, por desejarem que eu simplesmente seja feliz.
- A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, mesmo que indiretamente. Muito obrigada por tudo!

"Procuro semear otimismo e plantar
sementes de paz e justiça. Digo o que
penso, com esperança. Penso no que faço,
com fé. Faço o que devo fazer, com amor.

Eu me esforço para ser cada dia
melhor, pois bondade também se aprende.

Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri,
no caminho incerto da vida, que o mais
importante é o decidir."

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	27
2.1 Material e Métodos.....	27
2.1.1 Material vegetal	27
2.1.2 Análise de carboidratos	29
2.1.3 Estudos anatômicos	31
2.2 Resultados	32
2.2.1 Espécies da Serra do Cipó (MG).....	32
2.2.2 Espécies da Serra de Itacambira (MG)	46
2.2.3 Espécies da Serra Dourada (GO)	51
2.2.4 Estudos Anatômicos.....	57
2.3 Discussão.....	63
3 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Carboidratos não estruturais e aspectos anatômicos de plantas herbáceas de campos rupestres, com ênfase em Asteraceae

Em muitas espécies vegetais alguns órgãos desempenham mais do que uma função em certos estágios da vida. Raízes, caules ou folhas começam a acumular substâncias de reserva e, dependendo da sua origem, podem ser transformados em órgão de reserva, como tubérculos, bulbos, rizóforos e raízes tuberosas. Entre os compostos de reserva, os carboidratos são responsáveis por diversas funções, tais como fonte de energia, proteção contra a seca e temperaturas extremas. Os campos rupestres são caracterizados por um clima mesotérmico, com três a cinco meses de seca, correspondendo ao inverno, e seis a oito meses de chuvas, que corresponde ao verão. Os solos são rasos, salinos e com afloramentos rochosos. A flora possui um alto grau de endemismo, sugerindo a existência de estratégias adaptativas metabólicas para sobreviver aos estresses ambientais. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma triagem dos carboidratos não estruturais em diferentes órgãos de espécies herbáceas predominantes destas regiões e a análise anatômica do sistema subterrâneo de quatro espécies de Asteraceae para visualização e localização dos cristais de inulina. Foram coletadas 26 espécies em três regiões distintas: 14 na Serra do Cipó e, cinco na Serra de Itacambira (estado de Minas Gerais), e sete na Serra Dourada (estado de Goiás), representantes das famílias Amaranthaceae, Orchidaceae, Eriocaulaceae, Velloziaceae, Apiaceae, Apocynaceae e Asteraceae, sendo a última a mais representativa em números de espécies. Carboidratos solúveis foram quantificados colorimetricamente e analisados cromatograficamente por CCD e HPAEC/PAD. Amido foi quantificado por método enzimático e cristais de inulina foram visualizados sob luz polarizada. Frutanos foram detectados nos órgãos subterrâneos de reserva de todas as espécies de Asteraceae e Amaranthaceae. A maior concentração de frutose total foi encontrada em *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae), compreendendo 30% da massa seca de seus órgãos subterrâneos. *Lessingianthus psilophyllus* e *Richtera polymorpha* (Asteraceae) também contêm altas porcentagens de açúcares solúveis (34% e 33%, respectivamente), dos quais 26 e 27% correspondem aos frutanos. Todas as Asteraceae apresentaram frutanos da série homóloga da inulina com alto grau de polimerização. *Gomphrena agrastis* e *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae) apresentaram frutanos da série dos levanos. *Vellozia mínima* e *Barbacenia plantaginea* (Velloziaceae) apresentaram os oligossacarídeos da série da rafinose. De todas as espécies estudadas, somente *Habenaria caldensis*, *Oncidium hydrophyllum* (Orchidaceae), *Mandevilla tenuifolia* (Apocynaceae) and *Klotzschia brasiliensis* (Apiaceae) acumulam amido como principal polissacarídeo de reserva em seus órgãos subterrâneos, enquanto em *Leiothrix curvifolia* (Eriocaulaceae) o amido foi detectado nos caules. Cristais de inulina foram visualizados nas quatro Asteraceae analisadas e se localizam principalmente no cilindro vascular. Foi observada também, a ocorrência de estruturas secretoras em *Chresta curumbensis* e *Strophopappus glomeratus*. Este trabalho fornece informações úteis para expandir o conhecimento de estratégias fisiológicas das plantas para sobreviverem a condições ambientais adversas, como ocorre nos campos rupestres, e contribuir para estabelecer estratégias de conservação para a biodiversidade tropical.

Palavras-chave: Compositae; Açúcares; Polissacarídeos; Campos rupestres

ABSTRACT

Non-structural carbohydrates and anatomical aspects of rocky field herbaceous species, with emphasis on Asteraceae

In many plant species some organs perform more than one function at certain stages of the life cycle. Roots, stems or leaves begin to accumulate reserve substances and depending on the origin may be transformed into storage organs like tubers, bulbs, rhizophores and tuberous roots. Among other storage compounds, carbohydrates are assigned several functions such as source of energy and protection against drought and extreme temperatures. Rocky fields are characterized by mesothermal climate, with three to five months of dry season in winter, and seven to eight months of humidity in summer. The soils are shallow, sandy and with rocky outcrops. The flora has a high degree of endemism suggesting the existence of metabolic adaptive strategies to overcome environmental stresses. The aim of this work was to carry out a screening of reserve compounds accumulated in different organs of predominant herbaceous species, and to analyze the localization of inulin crystals in the underground system in four Asteraceae species. Twenty-six species of the following families, Amaranthaceae, Orchidaceae, Eriocaulaceae, Velloziaceae, Apiaceae, Apocynaceae and Asteraceae were collected in three regions: 14 at “Serra do Cipó” and five at “Serra de Itacambira” (state of Minas Gerais), and seven at “Serra Dourada” (state of Goiás). The Asteraceae was the most significant in species number. Soluble carbohydrates were quantified colorimetrically and analyzed chromatographically by TLC and HPAEC/PAD, and starch was quantified by enzymatic assay. Inulin crystals were visualized under polarized light. Fructans were detected in underground reserve organs of all the Asteraceae and Amaranthaceae species. The highest concentration of total fructose was found in *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae) comprising 30% of the underground organ dry mass. *Lessingianthus psilophyllus* and *Richterago polymorpha* (Asteraceae) also contained high percentages of soluble carbohydrates on a dry mass basis (34% and 33%, respectively), from which 26% and 27% corresponded to fructans. All the Asteraceae analyzed presented the inulin homologous series with a high degree of polymerization while *Gomphrena agrestis* and *G. marginata* (Amaranthaceae) presented the levan series. *Vellozia minina* and *Barbacenia plantaginea* presented the raffinose family oligosaccharides. Of all the analyzed species, only *Habenaria caldensis*, *Oncidium hidrophylum* (Orchidaceae), *Mandevilla tenuifolia* (Apocynaceae) and *Klotzschia brasiliensis* (Apiaceae) accumulate starch as the main reserve carbohydrate in the underground organs while in *Leiothrix curvifolia* (Eriocaulaceae) starch is accumulated in stems. Inulin crystals were visualized mainly in the vascular cylinder in the four Asteraceae analyzed. Secretory structures were identified in *Strophopappus glomeratus* and *Chresta curumbensis*. This work provides information to enhance the knowledge on physiological strategies used by plants to survive adverse environmental conditions such as those predominating in rocky fields, and may contribute for the establishment of conservation strategies of tropical biodiversity.

Keywords: Compositae; Sugar; Polysaccharides; Rupestrian fields

1 INTRODUÇÃO

Nas espécies vegetais, em geral, alguns de seus órgãos desempenham mais do que uma função em determinadas fases de seu ciclo de vida. Raízes, caules ou folhas passam a acumular substâncias de reserva, ocorrendo uma hipertrofia radial do órgão e, dependendo da sua origem, recebem designações diversas como tubérculo, cormo, pseudobulbo, bulbo, rizóforo, rizoma e raiz tuberosa (FIGUEIREDO-RIBEIRO; CHU; ALMEIDA, 2008). Os órgãos subterrâneos espessados, que são de ocorrência frequente em regiões de cerrado, caatinga e campos rupestres (MENEZES; MÜLLER; SAJO, 1979), apresentam uma complexa natureza estrutural, podendo ter origem de raízes, caules ou de ambos (VILHALVA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). Nestes ambientes, em determinadas espécies, as partes aéreas comumente parecem ser indivíduos independentes, que muitas vezes estão interligados subterraneamente e, ao se desconectarem da planta de origem, formam clones. A emissão de gemas e a formação de ramos aéreos ocorrem, em geral, devido a uma forte perturbação do ambiente que estimula a preferencialmente gemação radicular ao invés da reprodução por sementes. Fatores como secas prolongadas, queimadas consecutivas e herbivoria limitam o papel das sementes e favorecem a participação das raízes, que se encontram protegidas no interior do substrato e ligadas a um sistema axial profundo, capaz de nutri-las continuamente (RIZZINI; HERINGER, 1966).

Os carboidratos de reserva, armazenados em grandes quantidades nesses órgãos, são fundamentais para o crescimento das plantas, pois garantem um suprimento de carbono e energia para a manutenção da vida quando estas se encontram em condições ambientais desfavoráveis (RANWALA; MILLER, 2008).

Os produtos oriundos da fotossíntese são translocados na forma de sacarose para os órgãos de reserva (sementes, bulbos, tubérculos, etc.), nos quais geralmente é transformada em outras substâncias como amido ou frutanos, ou armazenada na forma livre, como em cana-de-açúcar e beterraba açucareira (DIETRICH; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1986).

A sacarose é a principal forma de transporte de assimilados, mas não é a única utilizada pelas plantas. Em algumas, os fotoassimilados são transportados na forma de açúcares alcoóis, por exemplo, o sorbitol, ou também de oligossacarídeos da série da rafinose, que são bastante frequentes, ocorrendo em todas as partes das plantas que os contêm. Estes oligossacarídeos são sintetizados a partir da

incorporação de unidades de galactose à molécula de sacarose e, quando hidrolisados pela ação da α -galactosidase, liberam galactose livre e sacarose. Os oligossacarídeos da série da rafinose incluem a rafinose, com um resíduo de galactose, a estaquiose, com dois e a verbascose com três resíduos de galactose (HELDT; PIECHULLA, 2011). Estes oligossacarídeos também atuam como compostos de reserva, além da provável função de proteção contra a seca e o frio (TAJI et al., 2002).

Entre os polissacarídeos de reserva não estruturais, o amido é o mais abundante; no entanto, outros tipos de carboidratos de reserva, como os frutanos, podem ocorrer em conjunto com o amido, ou substituindo-o (HENDRY, 1993; ORTHEN, 2001; ORTHEN; WEHRMEYER, 2004).

O amido é depositado na forma de grânulos e ocorre em quase todas as plantas, em vários tipos de tecidos e órgãos como folhas, raízes, caules, frutos e sementes. Nas folhas, seu acúmulo é devido à fixação de carbono durante a fotossíntese e este amido formado na luz é degradado no escuro dando origem a produtos que são utilizados, na maioria dos casos, na síntese de sacarose. Este amido, estocado nos cloroplastos, é comumente conhecido como amido transitório. A sacarose formada nas folhas é transportada pelos tecidos vasculares para outros órgãos, atuando como fonte de energia para o crescimento ou, então, é estocada na forma de polissacarídeos de reserva em sistemas subterrâneos ou sementes. Todas as enzimas que participam da biossíntese do amido ocorrem somente nos plastídios (PREISS, 2004). Os grãos de amido são constituídos por dois principais tipos de polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. Ambos são polímeros de α -D-glicose conectadas por ligações 1,4 em grandes e pequenas cadeias. A amilose consiste somente de uma ou algumas cadeias longas, sendo uma molécula linear ou ligeiramente ramificada com aproximadamente 200 a 300 resíduos de glicose. A amilopectina é uma cadeia altamente ramificada, consistindo de um grande número de cadeias pequenas, com uma média de 20 a 25 resíduos de glicose com ligações α -1,6. Na maioria das plantas, a amilopectina é o principal componente do amido, compreendendo aproximadamente 70% do grão de amido, enquanto o conteúdo de amilose compreende de 20 a 30% (BERTOFT, 2004; HELDT; PIECHULLA, 2011; KOOLMAN; ROEHM, 2005).

Já os frutanos são polímeros de frutose encontrados em plantas altamente derivadas, que consistem de séries homólogas de oligo e polissacarídeos não

redutores, podendo alcançar mais de 80% da massa seca nos tecidos de reserva (EDELMAN; JEFFORD, 1968). São sintetizados no vacúolo por ação de enzimas específicas, as frutossiltransferases (VIJN; SMEEKENS, 1999). A primeira enzima, sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST) que inicia a síntese de frutano, catalisa a transferência irreversível da unidade frutossil da sacarose para outra molécula de sacarose que resulta na formação de um trissacarídeo, a 1-cestose (1-F-frutossilacarose), e na liberação de uma molécula de glicose. A enzima, frutano:frutano 1- frutossiltransferase (1-FFT) transfere reversivelmente a unidade frutossil de uma molécula de frutano, com um grau de polimerização maior ou igual a três, para outra molécula de frutano ou de sacarose, podendo promover o alongamento ou a diminuição do comprimento da cadeia. A ação de ambas, 1-SST e 1-FFT resulta na formação da mistura de moléculas de frutanos com diferentes comprimentos. A despolimerização da molécula de frutano é conhecida como um processo sequencial de remoção da frutose terminal por uma enzima específica, a frutano exohidrolase (1-FEH) (EDELMAN; JEFFORD, 1968). O modelo proposto por estes autores para a espécie de Asteraceae (Compositae) *Helianthus tuberosus*, é comum às dicotiledôneas. Já em gramíneas e outras monocotiledôneas, outros tipos de frutanos são encontrados e a sua biossíntese é muito mais complexa (CAIRNS; POLLOCK, 1988). Assim, em plantas superiores existem cinco classes principais de frutanos estruturalmente diferentes, originados de três trissacarídeos distintos. Estes trissacarídeos consistem de uma unidade de frutose ligada a uma molécula de sacarose. No trissacarídeo 1-cestose (1-F-frutossilacarose), uma unidade de frutose se liga à frutose da molécula de sacarose por uma ligação glicosídica β (2,1). Já no trissacarídeo 6-cestose (6-F-frutossilacarose), estas ligações são do tipo β (2,6). As classes de frutanos iniciadas com esses trissacarídeos possuem sempre uma unidade terminal de glicose. O trissacarídeo neocestose (6-G-frutossilacarose) pode ter ligações β (2,1) ou β (2,6), mas a unidade de frutose se liga à glicose da molécula de sacarose ao invés de se ligar à frutose, tornando a unidade da glicose interna à molécula. As classes de frutanos podem ser distinguidas como:

- 1) inulina, uma molécula linear com ligações do tipo β (2,1) entre as unidades de frutose e baseada no trissacarídeo 1-cestose;
- 2) levano ou fleano, uma molécula também linear, com ligações do tipo β (2,6) e baseada no trissacarídeo 6-cestose;

3) graminanos, moléculas ramificadas contendo ligações mistas β (2,6) e β (2,1);

4) frutanos baseados na neocestose ou neosérie da inulina, com ligações β (2,1) entre as unidades de frutose;

5) frutanos baseados na neocestose ou neosérie do levano, com ligações β (2,6) entre as unidades de frutose (CARVALHO; ASEGA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2007).

A diferença mais evidente entre o amido e o frutano, além do primeiro ser um polímero de glicose e o segundo de frutose, é a sua localização celular e a solubilidade. O amido é insolúvel e localiza-se nos plastídios enquanto os frutanos são solúveis e estocados nos vacúolos. Uma possível vantagem do vacúolo, como uma organela de reserva, sobre os plastídios, poderia advir da sua maior capacidade de armazenagem, já que constitui 95% do volume do protoplasma (PILON-SMITS et al., 1995). Apesar de serem estocados no vacúolo, muitos trabalhos demonstraram a presença de enzimas do metabolismo de frutanos no apoplasto, e uma provável razão para essa localização seria a proteção da membrana celular quando as plantas são expostas a baixas temperaturas (KAWAKAMI; YOSHIDA; VAN DEN ENDE, 2005; LIVINGSTON III; HENSON, 1998).

Em órgãos subterrâneos de algumas espécies de Asteraceae do cerrado, cristais de inulina foram localizados no parênquima xilemático radial, parênquima cortical e parênquima medular de raízes adventícias (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CURY, 2011). Em várias espécies de *Richtera*, um gênero de Asteraceae comumente encontrado em campos rupestres, cristais de inulina foram visualizados em suas raízes adventícias, localizados no parênquima cortical, no periciclo, nas células parenquimáticas do xilema e no parênquima axial (MELO-DE-PINNA; MENEZES, 2003).

Em geral, os frutanos encontrados nos vegetais superiores apresentam de 30 a 50 unidades de frutose (GP 50), mas ocasionalmente podem ultrapassar 200 (PILON-SMITS et al., 1995; VIJN; SMEEKENS, 1999). Na indústria alimentícia eles são utilizados como substituinte de gorduras e também, devido ao seu sabor doce, são utilizados como adoçantes não calóricos. O frutano do tipo inulina é classificado como alimento funcional, pois tem a capacidade de melhorar a composição, a atividade e a funcionalidade da microflora do cólon e da mucosa intestinal, aumentando os níveis de absorção de cálcio e magnésio e reduzindo os níveis de triglicérides (HELDT; PIECHULLA, 2011; ROBERFROID, 2005). A presença de frutanos como principal carboidrato de reserva é estimada em 15% das

angiospermas e as principais famílias que os acumulam são Poaceae, Liliaceae e Asteraceae (HENDRY; WALLACE, 1993; PILON-SMITS et al., 1995).

Além da sua atuação como um carboidrato de reserva, vários estudos realizados com plantas que acumulam frutanos, submetidas a condições de estresse, demonstraram a relação deste carboidrato com a tolerância a baixas temperaturas, seca, alta salinidade, devido, em parte, a sua capacidade de osmorregulação (GARCIA et al., 2011; HENDRY, 1987; HENSON; LIVINGSTON, 1998; LIVINGSTON; HINCHA; HEYER, 2009).

Em um levantamento florístico realizado na Serra do Cipó (MG), região de campos rupestres, os quais são caracterizados por longos períodos de seca, foram identificadas 169 espécies de Asteraceae, família de ocorrência ampla na flora dessa região (GIULIETTI et al., 1987). Muitas espécies desta família possuem órgãos subterrâneos espessados e apresentam grande quantidade de frutanos como principal carboidrato de reserva (HENDRY, 1993; CARVALHO; ASEGA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2007).

O metabolismo de frutanos em plantas vasculares tem sido estudado extensivamente nas últimas décadas, e o interesse científico por esses carboidratos decorre de sua estreita ligação com a sacarose e o seu mecanismo peculiar de síntese e degradação. No entanto, a maioria dos estudos está focada em um número pequeno de espécies, principalmente as de expressiva importância econômica (CARVALHO; ASEGA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2007). O número de espécies acumuladoras de frutanos nativas de regiões tropicais e subtropicais é grande em comparação com o pequeno número de espécies cultivadas de interesse econômico e isso ocorre principalmente pela falta de informações sobre sua fisiologia e bioquímica (FIGUEIREDO-RIBEIRO et al., 1986). A ampliação do conhecimento sobre o metabolismo de frutanos através do estudo dessas espécies possibilitará sua utilização como recurso econômico sustentável, além de contribuir para o estabelecimento de estratégias de conservação, principalmente por que essas regiões são consideradas altamente vulneráveis, com muitas espécies sob ameaça de extinção.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma triagem dos carboidratos não estruturais em diferentes órgãos de reserva de plantas herbáceas de famílias predominantes em regiões de campos rupestres, com o enfoque maior em Asteraceae. Foram realizadas análises de carboidratos solúveis e amido para

quantificar e identificar os principais carboidratos de reserva e um estudo da anatomia do órgão subterrâneo de quatro dessas espécies, visando à caracterização da sua estrutura e a localização dos cristais de inulina.

Campos rupestres

Campos rupestres é uma designação utilizada para campos altos e pedregosos, ocorrentes principalmente em serras dos estados de Minas Gerais e Goiás. Embora estejam localizados dentro de áreas fitogeográficas diversas, os campos rupestres destacam-se fundamentalmente nestas áreas, seja pela fisionomia ou pela composição botânica ímpar (JOLY, 1970).

Inicialmente os complexos rupestres não eram considerados como um tipo vegetacional à parte, sendo incorporados em outros grandes ecossistemas, como o cerrado. Com a evolução do conhecimento destes biomas outras classificações foram surgindo (BENITES et al., 2003). Segundo Veloso et al. (1991), comunidades localizadas em altitudes elevadas como os campos rupestres são consideradas “refúgios vegetacionais” ou “vegetação relíquia” por se tratarem de vegetações isoladas em um contexto completamente distinto da flora dominante nas regiões onde estes campos se localizam. Por ocorrerem de forma disjunta, separados por vales, planaltos e bacias, levando assim a um isolamento geográfico de populações, o que resultou foi uma flora com um dos maiores índices de endemismo dentre a flora brasileira (BENITES et al., 2003) e é justamente por isso que nos campos rupestres há um grande número de espécies ameaçadas, dentre um número estimado de 472 espécies oficialmente reconhecidas (RIBEIRO; FREITAS, 2010).

Os campos rupestres se encontram distribuídos principalmente ao longo da Cadeia do Espinhaço, que se estende desde as proximidades de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, até o limite norte do estado da Bahia com o estado do Piauí. Em Minas Gerais, a Serra do Espinhaço estende-se por cerca de 550 km, entre norte e sul, e com largura variável de até 100 km (GONJITO, 2008). A maioria dos estudos em campos rupestres foi realizado na Cadeia do Espinhaço, principalmente na região do Parque Nacional da Serra do Cipó (COELHO et al., 2007; GIULIETTI et al., 1987; MEDINA; FERNANDES, 2007). Além das serras de Minas Gerais, também são encontrados complexos rupestres no Brasil Central, como por exemplo, as regiões da Serra Dourada, Serra dos Pirineus e Chapada dos Veadeiros, todas localizadas em Goiás (VASCONCELOS, 2011).

Nestas regiões o solo é pobre em nutrientes, arenoso, com níveis elevados de alumínio e baixo conteúdo de carbono orgânico. O baixo nível de fertilidade do solo está relacionado com a perda de nutrientes por lixiviação, condicionando assim o desenvolvimento de estratégias de sobrevivência da vegetação. A profundidade do solo é variável, dependendo do local e da topografia, podendo ser muito raso em encostas íngremes ou mais profundo em áreas mais estáveis (BENITES et al., 2007). As altitudes são superiores a 800 m, a temperatura média varia de 17°C a 19°C e a precipitação anual é de aproximadamente 1500 mm, com três a cinco meses de seca, correspondente ao inverno, e seis a oito meses de chuvas. Os campos rupestres com suas características tão específicas abrigam espécies que apresentam adaptações para sobreviverem a condições ambientais adversas (GIULIETTI et al., 1987). As plantas destas regiões podem competir, sobreviver e perpetuar-se neste ambiente pela rapidez com que completam seu ciclo vegetativo.

Figura 1 - Áreas de Campos rupestres de Goiás e Minas Gerais. (1) Serra Dourada; (2) Serra de Itacambira e (3) Serra do Cipó

A família Asteraceae

As Asteraceae compreendem plantas de hábito muito variado podendo ser ervas, subarbustos, trepadeiras ou, excepcionalmente, árvores. A grande maioria dos gêneros é constituída por plantas de pequeno porte. As folhas também são muito variadas, inteiras ou fendidas, de disposição alterna ou oposta. As flores são pentâmeras e sempre reunidas em inflorescência característica, o capítulo, e os frutos são secos, indeiscentes, do tipo aquênio (cipsela) (JOLY, 2005). A família Asteraceae possui distribuição cosmopolita, sendo a maior família de eudicotiledôneas; possui de 1600 a 1700 gêneros, com aproximadamente 24000 a 30000 espécies. No Brasil, a família é bem representada, com aproximadamente 250 gêneros e 2000 espécies. Muitas Asteraceae são cultivadas como ornamentais, podendo-se destacar a margarida (*Leucanthemum vulgare*), os crisântemos (*Chrysanthemum* ssp.), a dália (*Dahlia X hybrida*), a gazânia (*Gazania rigens*) e a zínia (*Zinnia elegans*). Pertencem a esta mesma família o girassol (*Helianthus annuus*), a alface (*Lactuca sativa*), a alcachofra (*Cynara scolymus*), a chicória, o almeirão e a escarola (*Cichorium intybus*). Diversas plantas medicinais estão também incluídas entre as Asteraceae, destacando-se a carqueja (*Baccharis trimera* e outras espécies do gênero), a camomila (*Matricaria recutita*), o guaco (*Mikania* ssp.), a estévia (*Stevia rebaudiana*), e a mil-folhas (*Achillea millefolium*). Esta família está também entre as principais famílias de plantas invasoras, incluindo plantas como o picão-preto (*Bidens pilosa*) e dente-de-leão (*Taraxacum officinale*). As Asteraceae são particularmente comuns nas formações abertas do Brasil, principalmente no cerrado, onde se destacam espécies de *Calea* e *Aspilia*. Nos campos são frequentes espécies de *Vernonia*, *Baccharis* e *Senecio*. Nos campos rupestres destaca-se *Lychnophora*, com porte geralmente arbustivo e folhas rígidas, sendo um dos elementos de maior destaque neste tipo de vegetação. No interior das florestas densas as Asteraceae são pouco comuns e apenas alguns gêneros podem ser encontrados (SOUZA; LORENZI, 2008).

Em um estudo comparativo de listas vermelhas de espécies ameaçadas da família Asteraceae, a que melhor reflete a situação destas é a lista preparada pela Fundação Biodiversitas, que é baseada nos critérios da IUCN (International Union for Conservation of Nature). Nesta lista vermelha estão incluídas um total de 427 espécies, das quais 50 são classificadas como pouco preocupantes, 70 classificadas como em perigo crítico, 21 em perigo, 74 como vulnerável e 212 sem dados

suficientes. Justamente por terem uma grande incidência em formações abertas, é no cerrado que esta família possui o maior índice de espécies ameaçadas, sendo também considerada como domínio deste bioma, as regiões de campos rupestres. Já em relação aos estados brasileiros, Minas Gerais exibiu o mais alto número de espécies ameaçadas, seguido pela Bahia, Rio Grande do Sul e Goiás. A maioria das espécies de Asteraceae incluídas em qualquer categoria de ameaçada foram classificadas principalmente devido à sua distribuição restrita, declínio da população e deterioração do seu habitat natural (NAKAJIMA et al., 2012).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Material vegetal

As coletas foram realizadas em áreas de campos rupestres situadas nos estados de Minas Gerais e Goiás. Em Minas Gerais, as regiões de coleta foram o Parque Nacional da Serra do Cipó, localizado a aproximadamente 100 km da capital, Belo Horizonte, ao sul da Cadeia do Espinhaço, e a Serra de Itacambira, ao norte da Cadeia do Espinhaço. Em Goiás a coleta foi realizada na região do Parque Estadual da Serra Dourada. Foram priorizadas, além de Asteraceae, famílias predominantes das regiões de campos rupestres sendo coletados pelo menos três indivíduos de cada espécie.

Todas as análises foram realizadas com plantas coletadas no período reprodutivo, com flores ou frutos, para possibilitar a identificação do material botânico, e suas respectivas exsiccatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Botânica e no Herbário da Universidade Federal de Goiás. Nas tabelas 1, 2 e 3 são listadas as espécies coletadas, família e órgão analisado, por local de coleta.

Para a análise anatômica, foram selecionadas 4 espécies de Asteraceae coletadas no Parque Estadual da Serra Dourada, Estado de Goiás, *Lessingianthus floccosus*, *Strophopappus glomeratus*, *Chresta corumbensis* e *Baccharis subdentata*.

Tabela 1 - Espécies coletadas na região da Serra de Itacambira, Minas Gerais

Família / Espécie	Órgão analisado
Família Amaranthaceae	
<i>Gomphrena agrestis</i> Mart.	Órgão subterrâneo
<i>Gomphrena marginata</i> Seub.	Órgão subterrâneo
Família Asteraceae	
<i>Richterago riparia</i> Roque	Raiz adventícia
Família Apiaceae	
<i>Klotzschia brasiliensis</i> Cham.	Órgão subterrâneo
Família Apocynaceae	
<i>Mandevilla tenuifolia</i> (J.C.Mikan) Woodson	Órgão subterrâneo

Tabela 2 - Espécies coletadas na região da Serra do Cipó, Minas Gerais

Família / Espécie	Órgão analisado
Família Asteraceae	
<i>Cyrtocymura lanuginosa</i> (Gardner) H.Rob.	Órgão subterrâneo
<i>Lessingianthus linearifolius</i> (Less.) H.Rob.	Órgão subterrâneo
<i>Lessingianthus linearis</i> (Spreng.) H.Rob.	Órgão subterrâneo
<i>Lessingianthus psilophyllus</i> (DC.) H.Rob.	Órgão subterrâneo
<i>Prestelia eriopus</i> Sch.Bip.	Órgão subterrâneo
<i>Richterago angustifolia</i> (Gardner) Roque	Raiz adventícia
<i>Richterago conduplicata</i> Roque	Raiz adventícia
<i>Richterago polymorpha</i> (Less.) Roque	Raiz adventícia
Família Eriocaulaceae	
<i>Leiothrix curvifolia</i> (Bong.) Ruhland	Folha/Caule
Família Orchidaceae	
<i>Habenaria caldensis</i> Kraenzl.	Tuberóide
<i>Oncidium hidrophylum</i> Barb. Rodr.	Pseudobulbo/ Raiz
Família Velloziaceae	
<i>Barbacenia plantaginea</i> L.B.Sm.	Bainha/Folha/Raiz
<i>Vellozia epidendroides</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	Folha/Caule
<i>Vellozia minina</i> Pohl	Folha verde/Folha seca

Tabela 3 - Espécies coletadas na região da Serra Dourada, Goiás

Família / Espécie	Órgão analisado
Família Asteraceae	
<i>Baccharis subdentata</i> DC.	Xilopódio
<i>Chresta curumbensis</i> (Philipson) H.Rob	Órgão subterrâneo
<i>Chresta scapigera</i> (Less.) Gardner	Órgão subterrâneo
<i>Chresta speciosa</i> Gardner	Órgão subterrâneo
<i>Lessingianthus floccosus</i> (Gardner) H.Rob.	Raiz espessada
<i>Strophopappus glomeratus</i> (Gardner) R.Esteves	Raiz espessada

2.1.2 Análise de carboidratos

Extração e quantificação de carboidratos solúveis

Após a coleta, o material foi separado, lavado em água de torneira e pesado para extração de carboidratos e para determinação da massa de matéria seca. Para as extrações foram utilizadas amostras de aproximadamente 2 g de massa de matéria fresca, que foram previamente fervidas por 5 minutos em etanol 80%, para inativação de enzimas. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em etanol 80%, mantidas em banho-maria a 80°C por 15 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 700 g por 15 minutos. As amostras foram re-extraídas 2 vezes. Os resíduos finais foram submetidos a duas extrações aquosas a 60°C por 30 minutos e filtrados a vácuo em tecido de algodão. Os extratos obtidos (etanólicos e aquosos) foram concentrados em evaporador rotatório e analisados separadamente (CARVALHO; PINTO; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1998).

Os açúcares solúveis totais foram quantificados pelo método do fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando-se glicose ou frutose como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 490 nm.

O conteúdo de frutose total nos extratos foi estimado pelo método de antrona modificado (JERMYN, 1956), utilizando-se frutose como padrão e obtendo-se a leitura da absorbância em 620 nm, em espectrofotômetro.

Os conteúdos de açúcares redutores foram determinados de acordo com o método Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945), utilizando-se glicose ou frutose como

padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm.

O cálculo para quantificação de açúcares solúveis pelos métodos colorimétricos foi realizado utilizando-se a equação da reta obtida a partir das curvas padrão.

Identificação de açúcares solúveis

Para as análises qualitativas cromatográficas, as amostras dos extratos etanólicos e aquosos foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica, contendo resinas nas formas catiônicas (Dowex 50 WX8 - 100) e aniônicas (Dowex 1 X 8 -100) (CARVALHO; DIETRICH,1993). Em seguida, as amostras contendo 80 µm de açúcar foram cromatografadas em placas prontas de sílica-gel, com desenvolvimento duplo por 7 horas, utilizando como fase móvel *n*-butanol, isopropanol e água na proporção 3:12:4 (v:v:v). Para a revelação de frutose livre e ligada, foi utilizado o reagente uréia-ácido ortofosfórico (WISE et al., 1955). As amostras deionizadas foram filtradas em membranas de 0,45 µm e utilizadas também para análise por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em cromatógrafo DIONEX, modelo ICS3000, em coluna CarboPac PA-1 (2 X 250mm), na concentração de 400 µg mL⁻¹ e fluxo de 1mL min⁻¹, ao longo da coluna. Para separação dos açúcares foram utilizados diferentes sistemas, como o método isocrático de 100 mM de hidróxido de sódio (GARCIA, 2009) e para separação das moléculas de frutanos foi estabelecido um gradiente da mistura dos eluentes A (150 mM de hidróxido de sódio) e B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio), com a seguinte programação: 0-2 min, 25 mM; 2,1-8,5 min, 50 mM; 8,6-10 min, 75 mM; 10,1-28 min, 100 mM; 28,1-30 min, 500 mM; 30,1-40 min, 25 mM. Foram utilizados como padrões de açúcares frutose, glucose, sacarose, 1-cestose e nistose, além de frutanos da série da inulina extraídos de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (EDELMAN; JEFFORD, 1968) e frutanos da série dos levanos, extraídos de raízes tuberosas de *Gomphrena macrocephala*, Amaranthaceae nativa do cerrado (SHIOMI et al., 1996).

Extração e análise de amido

A quantificação do amido foi feita por método enzimático (AMARAL et al., 2007). Os resíduos da extração de carboidratos solúveis foram congelados e liofilizados,

sendo pesados 10 mg de cada amostra. Foi adicionado 0,5 mL (120 U mL^{-1}) de α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (Megazyme), diluída em tampão MOPS 10 mM, pH 6,5. A seguir, as amostras foram incubadas em banho-maria a 75°C por 30 min. Este procedimento foi realizado duas vezes. As amostras foram incubadas novamente em banho-maria, duas vezes, a 50°C , sendo então adicionada uma solução contendo 0,5 mL (30 U mL^{-1}) de amiloglucosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (Megazyme), em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, seguido de incubação das amostras a 50°C por 30 min. Após as quatro incubações descritas acima, foram acrescentados 100 μL de ácido perclórico 0,8 M para interromper a reação. Em seguida, foi realizada uma incubação por 15 min a 30°C . Para a dosagem, foram utilizadas as enzimas glicose-oxidase e peroxidase (GOD-POD). A leitura foi feita em leitor de microplaca e os valores calculados com base em uma curva padrão construída a partir de quantidades crescentes de glicose.

2.1.3 Estudos anatômicos

O estudo anatômico foi realizado somente nos órgãos similares utilizados nas análises de carboidratos. Os órgãos subterrâneos de três indivíduos de cada uma das espécies selecionadas foram fixados em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50%, nas proporções 1:1:8 (v:v:v)), submetidos à bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos, e mantidos em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica até 100%, infiltradas e incluídas em resina plástica hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin). O material incluído foi seccionado transversalmente a 7 μm de espessura em micrótomo rotativo (modelo Olympus CUT 4055) com navalha descartável. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (SAKAI, 1973) em tampão fosfato e citrato (McILVAINE, 1921) pH 4,5 e montados em resina sintética Entellan para a obtenção de lâminas histológicas permanentes. Cortes à mão livre também foram realizados com auxílio de lâmina de barbear, corados com safranina 1% em solução etanólica (BERLYN; MIKSCHE, 1976), desidratados em série etílica, sendo as lâminas montadas com resina sintética Entellan.

Para a localização dos tecidos acumuladores de frutanos do tipo inulina, amostras dos órgãos subterrâneos foram fixadas em etanol 70% por 2-4 dias para cristalização dos polímeros de frutose. Cortes transversais das amostras foram feitos

à mão livre com o auxílio de lâmina de barbear e analisados sob luz polarizada. A presença dos cristais de inulina foi confirmada pelo teste com solução alcoólica de timol 15% e ácido sulfúrico (JOHANSEN, 1940).

Testes histoquímicos foram realizados em material fixado em FAA 50 (JOHANSEN, 1940) e cortado à mão-livre, com o auxílio de lâmina de barbear, ou em micrótomo rotativo e de deslize. Os lipídios totais foram evidenciados pelo Sudan Black B (JENSEN, 1962) e os compostos fenólicos por cloreto férrico (JOHANSEN, 1940).

A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada ao microscópio Olympus BX53 equipado com câmera de vídeo Olympus Q-Color 5, software Pro-Express versão 6.0 (Media Cybernetics). As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas utilizadas.

2.2 Resultados

2.2.1 Espécies da Serra do Cipó (MG)

Família Asteraceae

Dentre os carboidratos solúveis totais extraídos dos órgãos subterrâneos das espécies de Asteraceae coletadas na Serra do Cipó, grande parte consiste de frutanos quantificados na forma frutose total (Figura 2). As espécies que apresentaram maiores teores de açúcares solúveis totais foram *Lessingianthus psilophyllus* e *Richterago polymorpha* com aproximadamente 340 mg g⁻¹ MS, enquanto a que apresentou o mais baixo teor foi *Lessingianthus linearis*, com apenas 92 mg g⁻¹ MS em seus órgãos subterrâneos. Os teores de frutose total variaram de 34 mg g⁻¹ MS em *Lessingianthus linearis* a 274 mg g⁻¹ MS em *Richterago polymorpha*. Todas exibiram um baixo teor de açúcares redutores.

Figura 2 - Conteúdo de açúcares solúveis totais □, frutose total ■ e açúcares redutores ■ em órgãos subterrâneos de espécies de Asteraceae da Serra do Cipó. Barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Em cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível separar os componentes da série homóloga da inulina com grau de polimerização (GP) de até aproximadamente 10, além da frutose e da sacarose (Figura 3). Para as análises qualitativas dos açúcares neutros, por cromatografia aniônica de alta eficiência (HPAEC/PAD), foram utilizados padrões de inulina de *Helianthus tuberosus* e levanos de *Gomphrena macrocephala*, cujos perfis cromatográficos estão representados na figura 4.

Os perfis cromatográficos dos carboidratos solúveis dos órgãos subterrâneos das Asteraceae da Serra do Cipó estão representados nas figuras 5 a 12. Em todas foram identificadas glicose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, o tetrassacarídeo da série da inulina, além dos fruto-oligossacarídeos com grau de polimerização (GP) maior do que quatro. As frações etanólicas (contendo predominantemente hexoses, sacarose e fruto-oligossacarídeos) e aquosa (contendo predominantemente fruto-polissacarídeos) foram analisadas separadamente para a obtenção de uma melhor resolução dos açúcares. Observou-se que todas as espécies apresentam frutanos com pelo menos 40 unidades de frutose (GP 40).

Figura 3 – Cromatografia em camada delgada de fruto-oligossacarídeos presentes em órgãos subterrâneos de Asteraceae da Serra do Cipó. (1) *Lessingianthus psilophyllus*; (2) *Lessingianthus linearifolius*; (3) *Richterago angustifolia*; (4) *Richterago polymorpha*; (5) *Richterago conduplicata*; (6) *Prestelia eriopus*; (7) *Lessingianthus linearis*; (8) *Cyrtocymura lanuginosa*. (Ht) oligossacarídeos de *Helianthus tuberosus*

Figura 4 – Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD da série dos levanos de raízes tuberosas de *Gomphrena macrocephala* (A) e inulina de tubérculos de *Helianthus tuberosus*. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 5 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Richterago angustifolia*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro.

Figura 6 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneo de *Richterago polymorpha*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 7 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Lessingianthus linearifolius*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 8 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Lessingianthus psilophyllus*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 9 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Richterago conduplicata*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 10 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Cyrtocymura lanuginosa*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 11 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Prestelia eriopus*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 12 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Lessingianthus linearis*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Outras famílias da Serra do Cipó

Espécies de outras famílias de ampla ocorrência na Serra do Cipó, tais como Velloziaceae, Orchidaceae e Eriocaulaceae, também foram coletadas para este estudo.

Nas duas espécies de Orchidaceae, foi verificada a presença de amido como polissacarídeo de reserva em seus sistemas subterrâneos. *Habenaria caldensis* apresentou 56 mg g⁻¹ MS de amido nos tuberóides, enquanto *Oncidium hydrophyllum* apresentou 173 mg g⁻¹ MS no pseudobulbo. Na raiz o amido não foi detectado (Figura 13).

Habenaria caldensis foi a que apresentou o maior conteúdo de açúcares solúveis, 413 mg g⁻¹ MS, dos quais, aproximadamente 179 mg g⁻¹ MS consistiu de açúcares redutores. *Oncidium hydrophyllum* apresentou 163 mg g⁻¹ MS de açúcar solúvel total no pseudobulbo, dos quais 34 mg g⁻¹ MS consistiu de açúcares redutores (Figura 13). Em ambas as Orchidaceae foram identificados açúcares solúveis simples, como glicose, frutose e sacarose em análise por HPAEC/PAD (Figuras 14 e 15).

Figura 13 - Conteúdo de açúcares solúveis totais □, frutose total ■, açúcares redutores ■ e amido □ em órgãos subterrâneos das duas espécies de Orchidaceae da Serra do Cipó. Barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Figura 14 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de tuberóides de *Habenaria caldensis*, fração etanólica. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose

Figura 15 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de pseudobulbos de *Oncidium hydrophyllum*, fração etanólica. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose

Na única espécie de Eriocaulaceae analisada, *Leiothrix curvifolia*, a presença de amido foi encontrado somente no caule, e em baixa concentração. As folhas apresentaram 43 mg g⁻¹ MS de açúcar solúvel total (Figura 16), consistindo principalmente de glicose, como demonstrado no perfil cromatográfico (Figura 17).

Figura 16 - Conteúdo de açúcares solúveis totais □, frutose total ■, açúcares redutores ■ e amido □ em folha e caule de *Leiothrix curvifolia*. Barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Figura 17 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD em folhas de *Leiothrix curvifolia*, fração etanólica; (G) glicose

Das três espécies de Velloziaceae estudadas, *Barbacenia plantaginea* foi a que apresentou o teor mais elevado de açúcar solúvel total em suas folhas e na bainha foliar, correspondendo a 205 mg g⁻¹ MS e 251 mg g⁻¹ MS, respectivamente (Figura 18). Pela análise cromatográfica em HPAEC/PAD foram identificados, além de frutose, glicose e sacarose, oligossacarídeos da série da rafinose, tais como

rafinose, estaquiose e verbascose (Figura 19). No perfil cromatográfico alguns picos não foram identificados, especialmente no perfil cromatográfico dos açúcares extraídos das raízes.

Em *Vellozia minima*, foram analisadas apenas as folhas, que foram separadas em folhas verdes e folhas secas (senescentes), apresentaram 34 mg g⁻¹ MS e 28 mg g⁻¹ MS de açúcares solúveis totais, respectivamente (Figura 18). Em HPAEC/PAD, esses açúcares são representados por glicose, frutose, sacarose e os oligossacarídeos da série da rafinose (Figura 20). Em folhas de *Vellozia epidendroides* foram identificados açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose (Figura 21). Os teores de frutose total e açúcares redutores foram baixos em comparação com os de açúcares solúveis totais encontrados nas outras espécies de Velloziaceae analisadas.

Figura 18 - Conteúdo de açúcares solúveis totais □, frutose total ■, e açúcares redutores ■ em espécies de Velloziaceae da Serra do Cipó. Barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Figura 19 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de folha (A), bainha (B) e raiz (C) de *Barbacenia plantaginea*, fração etanólica. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (R) rafinose, (E) estaquiose, (V) verbascose

Figura 20 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de folhas verdes (A) e folhas secas (B) de *Vellozia minima*, fração etanólica. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (R) rafinose, (E) estaquiose, (V) verbascose

Figura 21 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de folhas de *Vellozia epidendroides*, fração etanólica. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose

2.2.2 Espécies da Serra de Itacambira (MG)

Cinco espécies com sistemas subterrâneos espessados foram coletadas ao norte da cadeia do Espinhaço, na Serra de Itacambira. *Gomphrena marginata* foi a espécie que apresentou o conteúdo mais elevado de açúcares solúveis totais, 361 mg g⁻¹ MS, e de frutose total, 306 mg g⁻¹ MS, entre todas as espécies analisadas no presente estudo (Figura 22). Em *Richterago riparia* e *G. marginata* o conteúdo de açúcares solúveis totais foi semelhante ao de frutose total. Os resultados obtidos para essas duas espécies indica que a frutose é o principal açúcar constituinte do seu órgão subterrâneo (Figura 22). Em *R. riparia* foi verificada a presença de frutanos do tipo inulina por CCD (Figura 23) e HPAEC/PAD (Figura 24). Em *Gomphrena marginata* e *Gomphrena agrestis*, a presença de frutanos também foi verificada por CCD (Figura 23) e HPAEC/PAD (Figuras 26 e 27), mas para que fosse possível uma identificação da classe desses frutanos foram realizadas co-eluições com frutanos da série homóloga da inulina de *Helianthus tuberosus* e da série dos levanos de *Gomphrena macrocephala*. Analisando os cromatogramas das figuras 28 e 29, é possível observar a sobreposição dos picos de ambas as espécies com os picos referentes aos levanos de *G. macrocephala*, indicando assim, a presença desta classe de frutanos nestas duas espécies.

Figura 22 - Conteúdo de açúcares solúveis totais □, frutose total ■, açúcares redutores ■ e amido □ em sistemas subterrâneos das espécies coletadas na Serra de Itacambira. Barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Figura 23 – Cromatografia em camada delgada de fruto-oligossacarídeos de órgãos subterrâneos de espécies de Asteraceae e Amaranthaceae da Serra de Itacambira (1) *Gomphrena marginata*; (2) *G. agrestis*; (3) *Richterago riparia* e (Ht) oligossacarídeos de *Helianthus tuberosus*

Klotzchia brasiliensis e *Mandevilla tenuifolia* acumulam amido como carboidrato de reserva, tendo sido detectado, respectivamente, 384 mg g⁻¹ MS e 156 mg g⁻¹ MS deste polissacarídeo nos seus órgãos subterrâneos (Figura 22). Entre os açúcares solúveis identificados, foi confirmada a presença de glicose, frutose e sacarose (Figura 25).

Figura 24 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Richterago riparia*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 25 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de (A) *Mandevilla tenuifolia* e (B) *Klotzschia brasiliensis*, fração etanólica. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose

Figura 26 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Gomphrena agrestis* (A) fração etanólica; (B) fração aquosa; (G) glicose; (F) frutose, (S) sacarose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 27 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Gomphrena marginata* (A) fração etanólica; (B) fração aquosa; (G) glicose; (F) frutose; (S) sacarose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 28 - Cromatografia líquida de alta eficiência da co-eluição do extrato aquoso de *Gomphrena agrestis* com inulina de *Helianthus tuberosus* e levano de *Gomphrena macrocephala*

Figura 29 - Cromatografia líquida de alta eficiência da co-eluição do extrato aquoso de *Gomphrena marginata* com inulina de *Helianthus tuberosus* e levano de *Gomphrena macrocephala*

2.2.3 Espécies da Serra Dourada (GO)

Entre as sete espécies de Asteraceae coletadas na Serra Dourada, a que apresentou conteúdo de açúcares solúveis totais mais elevado foi *Viguiera kunthiana*, com 297 mg g^{-1} MS, seguida de *Chresta curumbensis*, com 234 mg g^{-1} MS. Ambas também apresentaram maior conteúdo de frutose total e açúcares redutores, em comparação às outras espécies (Figura 30). *Chresta speciosa* apresentou o menor conteúdo de açúcares solúveis totais, com 24 mg g^{-1} MS (Figura 30). Os teores de frutose total variaram de 3 mg g^{-1} MS, em *Chresta speciosa* a 235 mg g^{-1} MS, em *Viguiera kunthiana*. Os sistemas subterrâneos de todas estas espécies acumulam frutanos do tipo inulina, identificados tanto por CCD (Figura 31), como por HPAEC/PAD, com grau de polimerização variando de três, como na 1-cestose a 50, além de glicose, frutose e sacarose, como mostrado nos cromatogramas das figuras 32 a 38. A presença destes açúcares foi confirmada também por cromatografia em camada delgada em todas as espécies, exceto em *Chresta speciosa*, na qual foram visualizadas somente a sacarose e a frutose (Figura 31). Nesta espécie foi possível detectar a série da inulina apenas por HPAEC/PAD (Figura 32).

Figura 30 - Conteúdo de açúcares solúveis totais □, frutose total ■ e açúcares redutores ■ em órgãos subterrâneos de espécies de Asteraceae coletadas na Serra Dourada. Barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Figura 31 – Cromatografia em camada delgada de fruto-oligossacarídeos de órgãos subterrâneos de espécies de Asteraceae e Amaranthaceae da Serra Dourada e Serra de Itacambira. (Ht) oligossacarídeos de *Helianthus tuberosus*; (1) *Baccharis subdentata*; (2) *Chresta corumbensis*; (3) *Chresta scapigera*; (4) *Chresta speciosa*; (5) *Lessingianthus floccosus*; (6) *Strophopappus glomeratus*; (7) *Viguiera kunthiana*

Figura 32 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Chresta scapigera*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 33 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Chresta speciosa* (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 34 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Baccharis subdendata* (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 35 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Chresta curumbensis* (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 36 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Strophopappus glomeratus* (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 37 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Lessingianthus floccosus* (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-cestose, (N) nistose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

Figura 38 - Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de órgãos subterrâneos de *Viguiera kunthiana*: (A) fração etanólica, (B) fração aquosa. (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (C) 1-kestose, (N) maltose, (GP>4) frutanos com grau de polimerização maior que quatro

2.2.4 Estudos Anatômicos

Baccharis subdentata

O sistema subterrâneo de *Baccharis subdentata* trata-se de um xilopódio, lignificado e tuberizado, orientado verticalmente em relação à superfície do solo (Figura 39 A). Os xilopódios dos indivíduos estudados apresentam estrutura secundária. O tecido de revestimento é constituído pela camada mais externa do floema secundário, cujas células vão se tornando suberizadas e aos poucos vão sendo descartadas à medida que o órgão cresce em diâmetro (Figura 39 B). Os elementos condutores do floema secundário apresentam-se incluso nas fibras (Figura 39 C) e, nas células parenquimáticas do xilema secundário, são visualizados inúmeros cristais de inulina (Figura 39 F). No plano de corte demonstrado na figura 39 A, observou-se que naquele nível a estrutura trata-se de raiz (Figura 39 G). Foi observada a presença de gemas com tricomas glandulares os quais apresentaram reação positiva para substâncias lipofílicas, evidenciadas pelo Sudan Black B (Figuras D e E).

Chresta curumbensis

O sistema subterrâneo de *Chresta curumbensis* apresenta diferentes graus de tuberização, sendo as regiões mais espessadas interligadas por regiões não espessadas, com crescimento preferencialmente horizontal em relação à superfície do solo. Nas regiões tuberizadas, cujos níveis de corte estão representados nas figuras 40 A (nível 1) e 40 B (nível 2), verifica-se a estrutura secundária, tendo a periderme como tecido de revestimento (Figura 40 C). As células da periderme contêm compostos fenólicos, evidenciados pelo cloreto férrico (Figura 40 D). No córtex há células parenquimáticas se dividindo em todos os planos e estruturas secretoras (Figuras 40 C e F) representadas por células endodérmicas maiores que as demais e com conteúdo lipofílico evidenciado pelo Sudan Black B (Figura 40 E). O floema secundário apresenta agrupamentos de esclerênquima (Figura 40 C) e, na região mais externa, foi possível verificar a presença de gemas (Figura 40 F). O xilema secundário apresenta grande proliferação de células parenquimáticas em relação aos tecidos condutores (Figura 40 H), nas quais são visualizados cristais de inulina (Figura 40 G). Em cortes realizados nas regiões não tuberizadas (Figura 40 B, nível 3), comprovou-se que o órgão subterrâneo apresenta natureza radicular (Figuras 40 I e J).

Figura 39 – *Baccharis subdentata*. (A) Visão geral do xilopódio mostrando o nível do corte (linha contínua) referente à figura G. (B-G) Secções transversais do xilopódio. (B) Tecidos vasculares secundários: floema secundário (FS), câmbio (C), xilema secundário (XS). (C) Elementos condutores do floema secundário inclusos nas fibras (seta). (D-E) Gemas com tricomas glandulares com conteúdo lipofílico. (F) Cristais de inulina visualizados sob luz polarizada. (G) Região central do órgão, mostrando o xilema secundário (XS) e primário (XP). Barras: B, C e G = 50 µm; D = 100 µm; E-F = 25 µm

Figura 40 – *Chresta curumbensis*. (A e B) Visão geral dos órgãos subterrâneos mostrando os níveis de corte (linhas contínuas) referentes às figuras C-F (linha 1), G e H (linha 2) e I e J (linha 3). (C-J) Secções transversais da raiz tuberosa (C-H) e não tuberosa (I-J). (C) Detalhe da periderme (Pe), córtex (Co) com endoderme secretora (En) e floema secundário (FS). (D) Células da periderme com conteúdo fenólico (seta). (E) Células secretoras da endoderme com conteúdo lipofílico (setas). (F) Gema. (G) Cristais de inulina visualizados sob luz polarizada. (H-J) Detalhes da região central da raiz tuberosa (H) e não tuberosa (I-J). Observar a maturação centrípeta dos dois polos de protoxilema (destaque) Barras: C, F e H = 100 µm; D, E e I = 50 µm; G = 25 µm; J = 20 µm

Lessingianthus floccosus

Lessingianthus floccosus apresenta sistema subterrâneo espessado com raízes espessadas nas quais foi realizado o seccionamento para as análises anatômicas (Figuras 41 A e B). O crescimento destas raízes ocorre tanto horizontal quanto verticalmente. No nível do corte analisado, a raiz se encontra em estrutura secundária, revestida por periderme (Figuras 41 C e D). O córtex possui várias camadas de células parenquimáticas com divisões tanto periclinais quanto anticlinais (Figura 41 D), sendo que a última camada, a endoderme, é constituída por células secretoras com estrias de Caspary evidentes (Figura 41 D). Essas células secretoras são achatadas e possuem conteúdo lipofílico evidenciado pelo Sudan Black B (Figura 41 E). O floema secundário envolve o xilema secundário e, na região central da estrutura, é possível distinguir 5 pólos de protoxilema apresentando maturação centrípeta, confirmando que a estrutura trata-se de raiz (Figuras 41 G e H). Em luz polarizada, foi possível observar cristais de inulina no parênquima radial e axial do floema secundário e no parênquima radial do xilema secundário (Figura 41 F).

Strophopappus glomeratus

Strophopappus glomeratus possui um órgão subterrâneo tubalizado com raízes espessadas, nas quais foram realizadas as análises estruturais (Figura 42 A). As amostras analisadas apresentam estrutura secundária, sendo possível observar a periderme atuando como tecido de revestimento (Figura 42 B). O córtex possui várias camadas de células parenquimáticas, com divisões celulares ocorrendo em vários planos, e estruturas secretoras representadas pela endoderme e canais (Figuras 42 B-D). Nos cortes longitudinais, observam-se os canais localizados próximos à endoderme, a qual apresenta estrias de Caspary evidentes (Figura 42 C). Tanto as células da endoderme quanto os canais secretam substâncias lipofílicas evidenciadas por Sudan Black B (Figura 42 D). O sistema vascular possui crescimento cambial não usual, sendo que em algumas regiões forma-se mais floema secundário e, em outras regiões, mais xilema secundário (Figura 42 B). A presença de metaxilema no centro da estrutura confirma sua natureza radicular (Figura 42 E). Os cristais de inulina estão localizados nas células parenquimáticas do córtex, no parênquima radial e axial do floema secundário, no parênquima radial do xilema secundário e no interior dos elementos de vaso (Figura 42 F).

Figura 41 – *Lessingianthus floccosus*. (A e B) Visão geral dos órgãos subterrâneos: nível do corte 1 é referente às figuras C-F e o nível 2 às figuras G e H. (C-H) Secções transversais da raiz. (C e D) Periderme (Pe), córtex (Co) com estrias de Caspary evidentes (setas) na endoderme (En), floema secundário (FS), câmbio (C) e xilema secundário (XS). (E) Endoderme secretora (En) com conteúdo lipofílico. (F) Cristais de inulina visualizados sob luz polarizada. (G) Região central da raiz, mostrando xilema secundário (XS) e primário. (H) Detalhe dos pólos de protoxilema (destaques). Barras: C, D e H = 50 μ m; E e G = 100 μ m; F = 25 μ m

Figura 42 – *Strophopappus glomeratus*. (A) Visão geral do órgão subterrâneo mostrando o nível de corte (linha contínua) referente às figuras B, C e E. (B-F) Secções transversais (B, D-F) e (C) longitudinal da raiz. (B) Observar o felogênio (cabeças de seta), os canais secretores (setas), endoderme (En), floema secundário (FS), câmbio (C), xilema secundário (XS) e primário. (C) Detalhe do canal secretor mostrando as estrias de Caspary (setas) nas células epiteliais. (D) Endoderme (En) e canais secretores (setas) com conteúdo lipofílico. (E) Detalhe da região central da raiz, mostrando cilindro vascular sólido. (F) Cristais de inulina visualizados sob luz polarizada (seta). Barras: B-E = 50 µm; F = 25 µm

2.3 Discussão

No presente trabalho foi proposto estudar espécies herbáceas de campos rupestres, especialmente da família Asteraceae, com o objetivo de se analisar os carboidratos de reserva e sua localização nos órgãos subterrâneos. Algumas espécies de outras famílias amplamente distribuídas neste bioma também foram estudadas, visando ao conhecimento de seus carboidratos de reserva.

Levantamentos em área de cerrado no Brasil, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (SP), já foram realizados com o objetivo de se conhecer espécies armazenadores de carboidratos e também, especificamente, acumuladoras de frutanos (FIGUEIREDO-RIBEIRO et al., 1986; MORAES et al., 2013; TERTULIANO; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993). No presente trabalho, realizado em campos rupestres, 14 espécies de Asteraceae coletadas em três locais de estudo apresentaram como carboidrato de reserva frutanos do tipo inulina, enquanto duas espécies de Amaranthaceae, do gênero *Gomphrera*, apresentaram frutanos da classe dos levanos.

Estudos sobre o conteúdo e a composição de frutanos em diferentes estádios fenológicos em *Vernonia herbacea* (CARVALHO; DIETRICH, 1993) e *Viguiera discolor* (ISEJIMA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993), duas Asteraceae do cerrado que acumulam frutanos do tipo inulina, mostraram que os teores de açúcares solúveis totais, mais precisamente de frutanos, em seus órgãos subterrâneos foram mais baixos no período de floração em comparação com os outros estádios. É bem conhecido que para o desenvolvimento e crescimento de ramos aéreos, flores e frutos, é necessária a mobilização de polissacarídeos de reserva para suprir a demanda de energia que, nesses períodos, pode exceder a produção pela fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2009). Durante o ciclo fenológico destas espécies, há processos de síntese e despolimerização dos frutanos, sendo que no estágio de floração a concentração e o comprimento da cadeia de frutanos diminuem concomitantemente ao aumento dos açúcares redutores. Em *Vernonia herbacea*, a diferença nos conteúdos de açúcares entre as fases fenológicas pode chegar a 50% em relação à massa seca do órgão subterrâneo (CARVALHO; DIETRICH, 1993). Em um estudo com *Viguiera discolor*, as condições de fotoperíodo que induzem o florescimento podem causar alterações na proporção de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos, sem alterar os teores de frutose total (ISEJIMA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1991). Já em *G. macrocephala* (Amaranthaceae), o conteúdo de frutose

total não varia entre os estádios vegetativo e reprodutivo e diminui somente no fim da dormência (VIEIRA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993). No presente estudo, entre todas as espécies que apresentaram frutanos nos órgãos subterrâneos, a variação nos teores de frutose total foi de 3, em *Chresta speciosa* a 306 mg g⁻¹ MS, em *Gomphrena marginata*. Todas as plantas foram coletadas na fase reprodutiva para que pudessem ser corretamente identificadas, portanto, muitas delas apresentaram teores baixos de açúcares solúveis totais, como *C. speciosa*, com 24 mg g⁻¹ MS e *Lessingianthus floccosus*, com 75 mg g⁻¹ MS, possivelmente, devido à fase em que foram coletadas. Em *Chresta speciosa*, como os teores de açúcar solúvel total e de frutose total foram baixos, não foi possível detectar a presença dos frutanos em CCD. Desta maneira, só foi possível a identificação da série homóloga de inulina por HPAEC/PAD, uma vez que este é um método mais sensível à detecção destes carboidratos.

Silva (2012) avaliou o teor de açúcares solúveis mensalmente, durante um ano, em raízes tuberosas de *G. marginata*, e verificou a ocorrência de variações ao longo deste período. O teor mais baixo de frutose total foi encontrado em dezembro, portanto, no período de chuvas. No presente estudo, indivíduos desta espécie foram coletados nesta mesma época, encontrando-se aproximadamente 30% de frutose total em relação à massa seca, valor semelhante ao encontrado por Silva (2012). De acordo com esta autora, o teor de frutose total pode chegar a cerca de 80% no período de seca.

Tanto *G. marginata* quanto *G. agrestis* acumulam frutanos do tipo levano, como em *G. macrocephala* (SHIOMI et al., 1996). A espécie *G. macrocephala* foi a primeira da sub-classe Caryophyllidae em que foi constatada a presença de frutanos, sendo que cerca de 40% da matéria seca de suas raízes tuberosas são compostas por esses carboidratos (VIEIRA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993). O gênero *Gomphrena*, da família Amaranthaceae é o único, até o momento, em que frutanos da classe dos levanos foram encontrados. Em geral, estes compostos são encontrados em gramíneas de regiões temperadas, como *Poa ampla* (CHATTERTON; HARRISON, 1997) e *Dactylis glomerata* (CHATTERTON et al., 1993).

Muitas espécies de Amaranthaceae possuem fotossíntese do tipo C4 (SAGE et al., 2007). Em um estudo do mecanismo fotossintético realizado com espécies desta família constatou-se que dentre 122 espécies de *Gomphrena* analisadas, 109

apresentaram fotossíntese do tipo C4. *Gomphrena agrestis* aparece nesta lista como C4, assim como *G. macrocephala*. Entretanto, *G. marginata* não foi incluída neste estudo (SAGE et al., 2007). Plantas C4 são adaptadas a altas intensidades luminosas, altas temperaturas e seca. Estas plantas não necessitam de grande abertura estomática para a entrada de CO₂, e desta forma, perdem menos água do que uma planta que possui mecanismo C3 (TAIZ; ZEIGER, 2009). Além de possuir mecanismo C4, plantas de *G. agrestis* acumulam frutanos e são plantas altamente adaptadas às condições do ambiente em que vivem, como os campos rupestres, caracterizados por uma estação seca bem definida e, dependendo da região, este período de seca pode chegar a sete meses, além de apresentarem solos salinos e pobres em nutrientes (BENITES et al., 2007; MADEIRA; FERNANDES, 1999)

Muitos trabalhos demonstram que, além da sua função de reserva, a presença de frutanos está relacionada com a tolerância das plantas à seca e ao frio (GARCIA et al., 2011; HINCHA et al., 2007; VALLURU; VAN DEN ENDE, 2008; VANDOORNE et al., 2012). Além disso, muitas espécies de importância econômica, como arroz (*Oryza sativa*) (KAWAKAMI; SATO; YOSHIDA, 2008), batata (*Solanum tuberosum*) (KNIPP; HONERMEIER, 2006) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (PARVANOV et al., 2004), que já foram modificadas geneticamente com enzimas do metabolismo de frutanos, se mostraram mais resistentes quando expostas a algum tipo de estresse. Estudos recentes também sugerem a atuação de carboidratos, principalmente dos frutanos, em mecanismos de proteção antioxidativa, colaborando na dissipação de espécies reativas de oxigênio (BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010; PESHEV et al., 2013).

Os estudos anatômicos dos órgãos subterrâneos de reserva realizados nas quatro espécies de Asteraceae, *Baccharis subdentata*, *Chresta curumbensis*, *Lessingianthus floccosus* e *Strophopappus glomeratus*, coletadas na Serra Dourada, tiveram como foco, a localização dos cristais de inulina. Estes cristais foram encontrados em todas as espécies analisadas, concentrados principalmente nos tecidos vasculares. A maioria dos estudos anatômicos já realizados com sistemas subterrâneos de Asteraceae relata a localização dos tecidos acumuladores de cristais de inulina (ABDALLA, 2012; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CURY, 2011; HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2005, 2007; OLIVEIRA; BOMBO; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2013; TERTULIANO; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993; VIEIRA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993; VILHALVA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA,

2006; VILHALVA et al., 2011). Em *Lessingianthus bardanoides*, *L. glabratus*, *Vernonia elegans* (atualmente *L. elegans*) e *V. grandiflora* (atualmente *L. grandiflorus*), foram encontradas grandes quantidades de cristais de inulina somente no parênquima cortical das raízes espessadas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CURY, 2011; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008a; HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2007). Apesar destas espécies apresentarem sistemas subterrâneos muito parecidos morfológicamente com o de *L. floccosus* e pertencerem ao mesmo gênero, a distribuição dos cristais de inulina nesta última ocorre no parênquima radial e axial do floema secundário e no parênquima radial do xilema secundário. A localização dos cristais de inulina nos tecidos vasculares pode estar relacionada com uma rápida resposta destas plantas a fatores abióticos, como a seca (VILHALVA et al., 2011).

Em *B. subdentata* foram encontrados cristais de inulina dispersos por todo o parênquima xilemático secundário do xilopódio, assim como foi encontrado nas raízes tuberosas de *C. curumbensis*. Esta apresentou poucos cristais de inulina dispersos no parênquima de reserva, fato este possivelmente associado à proporção elevada de açúcares redutores em relação à frutose total. Num estudo com outra espécie do mesmo gênero, *Chresta sphaerocephala*, estes cristais foram encontrados tanto no parênquima cortical quanto no parênquima vascular (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008a). Apesar de serem do mesmo gênero, estas duas espécies possuem sistema subterrâneo com estruturas muito diferentes; enquanto *C. sphaerocephala* apresenta um sistema radicular difuso, *C. curumbensis* apresenta raízes tuberosas.

Em *Strophopappus glomeratus* os cristais de inulina foram encontrados no parênquima radial do xilema secundário, no parênquima radial e axial do floema secundário, no interior dos elementos de vaso e no parênquima cortical das raízes espessadas. Cristais de frutanos já foram localizados no interior de elementos de vaso e podem estar envolvidos em um sistema alternativo para a translocação destes açúcares em algumas espécies (OLIVEIRA; BOMBO; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2013; VIEIRA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993). Além disso, em folhas de *Agave deserti*, foram identificados frutanos com baixo grau de polimerização (GP até 5) nos tecidos vasculares, sugerindo que essas moléculas poderiam ser translocadas pelos tecidos condutores (WANG; NOBEL, 1998).

Em *C. curumbensis*, *Lessingianthus floccosus* e *Strophopappus glomeratus*, as células do córtex se dividem por todas as direções. A primeira espécie também apresentou abundância de parênquima vascular quando comparada com os tecidos condutores no xilema secundário. Em *Helianthus tuberosus*, verificou-se o aumento da concentração de inulina juntamente com o aumento do diâmetro dos tubérculos (SCHUBERT; FEUERLE, 1997). Estas divisões celulares por todos os planos têm como função acompanhar o aumento de diâmetro do órgão que armazenam estes polissacarídeos.

Em *Baccharis subdentata*, no plano de corte analisado, a estrutura do órgão subterrâneo apresentou natureza radicular, além de gemas com tricomas glandulares que secretam substâncias lipofílicas. Nestes indivíduos, as camadas mais externas do floema secundário têm a função de tecido de revestimento, que aos poucos se torna suberizado e é descartado à medida que novas células são formadas pela atividade cambial. A suberina protege as plantas contra a perda de água, ataque de microorganismos e exposição ao calor (HELDT; PIECHULLA, 2011), garantindo a sobrevivência dessas plantas às frequentes queimadas que ocorrem nas regiões em que habitam. Esta espécie apresenta xilopódio de natureza mista (HAYASHI, 2003) e, segundo Rizzini (1965), os xilopódios são órgãos rígidos, altamente resistentes à seca prolongada e com potencial gemífero. Em *Chresta curumbensis* também foi constatada a presença de gema em sua raiz tuberosa. A ocorrência de gemas nos órgãos subterrâneos é de extrema importância para a sobrevivência dessas plantas. A passagem do fogo é frequente nas regiões de campos rupestres e cerrado, no período seco, quando normalmente estas plantas perdem os órgãos aéreos. Quando as condições ambientais tornam-se favoráveis, no início do período de chuva, voltam a emitir brotos a partir destes órgãos subterrâneos (RIZZINI; HERINGER, 1961) e o acúmulo de reservas, principalmente de carboidratos, é importante, pois estes compostos de reserva, que atuam como fonte de energia para regeneração da parte aérea (ALONSO; MACHADO, 2007).

Compostos fenólicos foram visualizados na periderme dos órgãos subterrâneos somente em *C. curumbensis*. A presença de compostos fenólicos já foi relatada nos tecidos de revestimento em órgãos subterrâneos de Asteraceae (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CURY, 2011). Nas plantas, estes compostos têm a importante função de proteção contra herbivoria, microorganismos patogênicos,

poluição, radiação UV, além de outros papéis, como o de sinalização e produção de substâncias alelopáticas (LAMBERS; CHAPIN III; PONS, 2008).

As estruturas secretoras com conteúdo lipofílico encontradas no córtex interno em *Chresta curumbensis* e *Strophopappus glomeratus* são frequentes em sistemas subterrâneos de Asteraceae e já foram relatadas em diversas espécies. A função destas estruturas em órgãos subterrâneos espessados ainda não foi bem compreendida, podendo estar relacionada com processos de defesa contra herbivoria (CURY; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2009; MELO-DE-PINNA; MENEZES, 2003; VILHALVA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). Além dessas estruturas, *C. curumbensis*, *S. glomeratus* e *L. floccosus* apresentam ainda endoderme secretora. Este tipo de endoderme parece ser comum em espécies da tribo Vernonie, na qual são classificadas estas três espécies (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008b; CURY; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2009).

Além dos frutanos, outros tipos de carboidratos, como os oligossacarídeos da série da rafinose (RFO), também atuam como protetores de membrana e osmorreguladores (TAJI et al., 2002). Entre outros metabólitos, os carboidratos têm uma importante função na re-hidratação dos tecidos, atuando como osmoprotetores (DINAKARA; DJILIANOV; BARTELS, 2012). Baixas temperaturas, seca, alta salinidade são os principais fatores abióticos que causam perturbações nas estruturas das membranas e os açúcares solúveis podem contribuir para prevenir estes danos (VALLURU; VAN DEN ENDE, 2008).

Dentre os carboidratos solúveis encontrados nas espécies de Velloziaceae, foram identificados os oligossacarídeos da série da rafinose RFOs (rafinose, estaquiose, verbascose). A sua presença em bainhas e lâminas foliares de *Barbacenia plantaginea* e em folhas de *Vellozia minina* parece estar associada ao seu papel de proteção à seca, conforme foi constatado em folhas de *Xerophyta viscosa* (Velloziaceae) (PETERS et al., 2007). Plantas desta espécie foram submetidas ao déficit hídrico, tendo-se verificado uma correlação positiva entre os dias em déficit hídrico e o aumento no acúmulo de RFOs, que foi rapidamente revertida quando as plantas foram re-irrigadas. Estes oligossacarídeos são bem frequentes em espécies desta família e em muitos trabalhos é sugerido que atuam como protetores de membranas, protegendo-as da seca e do frio (BACHMANN; KELLER, 1995; PETERS; KELLER, 2009). Os RFOs também são frequentes em sementes ortodoxas, tolerantes à dessecação, havendo um acúmulo durante o

desenvolvimento da semente e um rápido esgotamento na germinação (PETERBAUER; RICHTER, 2001). A família Velloziaceae, com ampla distribuição nos campos rupestres, possui muitas espécies chamadas de “revivescentes” por sua grande capacidade de sobreviver à seca prolongada (AIDAR et al., 2010; GAFF, 1987). Estas plantas perdem grandes quantidades de água, chegando a ficar completamente secas, mas conseguem se recuperar completamente logo após a re-hidratação (GAFF, 1971).

Com relação às Eriocaulaceae da região da Serra do Cipó, segundo Giulietti e Hensold (1990), 19 espécies do gênero *Leiothrix* são endêmicas, sendo que, dentre as 37 espécies endêmicas da América do Sul, 25 ocorrem em Minas Gerais. *Leiothrix curvifolia*, a única espécie de Eriocaulaceae estudada neste trabalho, apresentou glicose como açúcar solúvel prioritário e baixas quantidades de amido, somente nos caules. Glicose é um monossacarídeo relativamente instável, uma vez que o grupo aldeído possa ser espontaneamente oxidado a um grupo carboxila; portanto, não são bons açúcares de reserva (HELDT; PIECHULLA, 2011). Em um trabalho, no qual diferentes variedades de trigo foram submetidas ao déficit hídrico, verificou-se uma correlação entre o aumento de glicose nas folhas e o tempo em que as plantas permaneceram sem água (KAMELI; LOSEL, 1993). A mesma correlação também foi encontrada em plantas de tremoço, sendo que estes açúcares se acumularam em maior quantidade em folhas jovens (DAVID et al., 1998). A glicose pode atuar como um composto osmorregulador em conjunto com outras substâncias, para manter a integridade da membrana celular (ANJUM et al., 2011). Além disso, as plantas podem ter diversas estratégias para diminuir a perda de água, como por exemplo, a presença de tricomas. Em *L. curvifolia* a presença de tricomas nas folhas é muito intensa, assemelhando-se a algodão. Estes tricomas se desenvolvem no período seco, para manter a umidade nas folhas e evitar a dessecação, enquanto no período de chuvas não são encontrados (COELHO et al., 2007).

Mandevilla tenuifolia (Apocynaceae), *Habenaria caldensis*, *Oncidium hydrophilum* (Orchidaceae) e *Klotzschia brasiliensis* (Apiaceae) foram as únicas espécies que apresentaram amido como polissacarídeo de reserva em seus órgãos subterrâneos. Em sistemas subterrâneos de Asteraceae, usualmente, os frutanos são os principais carboidratos de reserva e o amido é ausente ou encontrado em concentrações muito baixas (CARVALHO; DIETRICH, 1993). Já em espécies de

Liliaceae, Hyacinthaceae e Amaryllidaceae foram identificados tanto frutanos como amido nos sistemas subterrâneos espessados (ORTHEN; WEHRMEYER, 2004; ORTHEN, 2001; RANWALA; MILLER, 2008). Em *Galanthis nivales* (Amaryllidaceae), por exemplo, os bulbos contêm frutanos e amido, sendo que os frutanos ocorrem em maior proporção. Durante a fase de rebrotamento, o amido é mobilizado em proporções maiores, enquanto o conteúdo de frutanos permanece praticamente constante, sugerindo que há uma preferência pela utilização do amido como recurso energético durante o estágio de desenvolvimento, enquanto os frutanos teriam a função de osmorregulação e proteção de membranas. O amido é o polissacarídeo de reserva de maior ocorrência nas plantas. Acumula-se nos plastídeos em forma de grânulos insolúveis em água e variam de tamanho e forma dentro de uma mesma célula (KERMODE, 2011). Por razões osmóticas as células têm um limite de capacidade para armazenar monossacarídeos. Na forma de amido, grandes quantidades de glicose podem ser estocadas nas células por longos períodos sem alterar a pressão osmótica (HELDT; PIECHULLA, 2011).

Mandevilla velutina apresentou 156 mg g⁻¹ MS de amido em seus órgãos subterrâneos. Quantidades semelhantes foram também encontradas nas raízes tuberosas de *Mandevilla sanderi*, espécie utilizada comercialmente como ornamental (BOUTEBTOUB et al., 2009). Em levantamentos etnobotânicos foi relatado, no cerrado de Goiás, o uso das raízes tuberosas de *Mandevilla velutina* como medicinal (VILA VERDE; PAULA; CARNEIRO, 2003) e, em comunidades rurais do nordeste do Brasil, o sistema subterrâneo tuberizado de *M. tenuifolia* é utilizado na alimentação, apresentando um baixo valor calórico e um alto conteúdo de água (NASCIMENTO et al., 2012). Visto seu potencial econômico, estudos com espécies deste gênero são importantes para ampliar o conhecimento bioquímico e a possibilidade de uso sustentável na alimentação e como planta medicinal.

Já na família Orchidaceae, muitos trabalhos recentes que abordam os carboidratos estão focados em seu desenvolvimento *in vitro* ou relacionados à germinação e viabilidade de sementes, principalmente por terem valor comercial como plantas ornamentais (JOHNSON; KANE; PÉREZ, 2011; NAMBIAR; TEE; MAZIAH, 2012; WANG et al., 2011). Entretanto, não há trabalhos referentes a carboidratos e órgãos de reserva em espécies de *Habenaria*. Em *Oncidium hydrophyllum*, a quantidade elevada de amido (173 mg g⁻¹ MS) e açúcares solúveis (163 mg g⁻¹ MS) em seus pseudobulbos está provavelmente relacionada com a

época de coleta, realizada no início da floração. Em um estudo com híbridos do gênero *Oncidium* (*Oncidium* “Gower Ramsey”), os açúcares dos pseudobulbos foram quantificados em três estádios do processo de floração. Observou-se que há um aumento de amido no estágio inicial da floração, acumulando aproximadamente 120 mg g⁻¹ MS, e um rápido decréscimo no estágio final, chegando próximo de esgotar estas reservas (WANG et al., 2008).

Klotzschia brasiliensis foi a espécie que apresentou o maior conteúdo de amido, 384 mg g⁻¹ MS. Em um levantamento de espécies alpinas da Austrália, três espécies de Apiaceae apresentaram amido, mas em quantidades bem menores, entre 4 e 9% em relação à massa seca (TOLSMA; READ; TOLHURST, 2007). Trabalhos com espécies do gênero *Klotzschia*, e particularmente, os que abordam os carboidratos são escassos. Entretanto, o conteúdo elevado de amido encontrado na espécie em estudo, 38% da massa seca do órgão subterrâneo, sugere que este composto, quando despolimerizado, atua na regulação osmótica da célula e também pode contribuir para o aumento da tolerância da planta a condições ambientais adversas, como é o caso de *K. brasiliensis*, nativa de uma região de campos rupestres e, portanto, sujeita a longos períodos de seca (GIULIETTI et al., 1987).

3 CONCLUSÕES

Em regiões de campos rupestres as plantas estão sujeitas a vários fatores de estresses abióticos, como a seca e o fogo, e os órgãos subterrâneos de reserva, comumente encontrados nestas plantas, são essenciais para a sua sobrevivência, uma vez que as gemas ali presentes garantem a rebrota logo após a dormência. No presente trabalho, verificou-se que as 14 espécies de Asteraceae estudadas apresentam frutanos do tipo inulina como carboidrato de reserva em seus órgãos subterrâneos. As duas espécies de *Gomphrena* analisadas apresentam frutanos do tipo levano. A ocorrência de frutanos nestas plantas é consistente com a sua ampla ocorrência em espécies nativas do bioma cerrado, sujeitas à sazonalidade climática e outras adversidades. O papel dos frutanos como reguladores osmóticos, conferem às plantas uma maior tolerância à seca e ao frio. *Klotzschia brasiliensis*, *Mandevilla tenuifolia*, *Habenaria caldensis* e *Oncidium hydrophilum* acumulam grandes quantidades de amido em seus órgãos subterrâneos, que quando necessário, é despolimerizado para suprir a demanda energética, tendo uma importante função no ciclo fenológico destas plantas. Outros carboidratos, os oligossacarídeos da série da rafinose, também importantes na proteção das plantas à seca, foram detectados nas duas espécies de Velloziaceae, *Barbacenia plantaginea* e *Vellozia minima*. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que diferentes tipos de carboidratos podem ser armazenados em espécies de diferentes grupos taxonômicos, e ainda assim, desempenhar papéis fisiológicos semelhantes, além do papel fundamental de reserva. As análises histoquímicas dos sistemas subterrâneos das quatro espécies de Asteraceae, comprovaram também que as plantas podem apresentar várias estratégias adaptativas pois, além do acúmulo de polissacarídeos, algumas apresentam substâncias lipofílicas e compostos fenólicos, que protegem as plantas de adversidades encontradas nestes ambientes.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D.F. **Morfoanatomia e fitoquímica de órgãos vegetativos de *Apopyros warmingii* (Baker) G.L. Nesom e *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) S.F. Blake (Asteraceae): estratégias adaptativas ao cerrado rupestre.** 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- AIDAR, S.T.; MEIRELLES, S.T.; POCIUS, O.; DELITTI, W.B.C.; SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A.N. Desiccation tolerance in *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, p. 193-202, 2010.
- ALONSO, A.A.; MACHADO, S.R. Morphological and developmental investigations of the underground system of *Erythroxylum* species from Brazilian cerrado. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 55, p. 749-758, 2007.
- AMARAL, L.I.V.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; GASPAR, M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, p. 425-431, 2007.
- ANJUM, S.A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M.F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v. 6, p. 2026-2032, 2011.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CURY, G. Morpho-anatomical features of underground systems in six Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 981-92, 2011.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CURY, G.; SOARES, M.K.M.; ROCHA, R.; HAYASHI, A.H. Underground systems of Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, London, v. 135, p. 103-113, 2008a.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; HAYASHI, A.H.; CURY, G.; SOARES, M.K.M.; ROCHA, R. Occurrence of secretory structures in underground systems of seven Asteraceae species. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 157, p. 789-796, 2008b.
- BACHMANN, M.; KELLER, F. Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 991-998, 1995.
- BENITES, V.M.; CAIAFA, A.N.; MENDONÇA, E.S.; SCHAEFER, C.E.; KER, J.C. Solos e vegetação nos complexos rupestres de altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 10, p. 76-85, 2003.
- BENITES, V.M.; SCHAEFER, C.E.G.R.; SIMAS, F.N.B.; SANTOS, H.G. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, p. 569-577, 2007.

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State Press, 1976. 326 p.

BERTOFT, E. Analysing starch structure. In: ELIASSON, A.-C (Ed.). **Starch in food-structure, function and applications**. Boston; New York; Washington: CRC Press, 2004. p. 57-81.

BOLOURI-MOGHADDAM, M.R.; LE ROY, K.; XIANG, L.; ROLLAND, F.; VAN DEN ENDE, W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 277, p. 2022-2037, 2010.

BOUTEBTOUB, W.; MAUGET, J.C.; SIGOGNE, M., MOREL, P., GALOPIN, G. Localizing starch reserves in *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson using a combined histochemical and biochemical approach. **Hort Science**, Geneva, v. 44, p. 1879-1883, 2009.

CAIRNS, A.; POLLOCK, C.J. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. **New Phytologist**, Lancaster, v. 109, p. 399-405, 1988.

CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M.C. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Veil.) Rusby at different phenological phases. **New Phytologist**, Lancaster, v. 123, p. 735-740, 1993.

CARVALHO, M.A.M.; ASEGA, A.F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructans in Asteraceae from the Brazilian cerrado In SHIOMI, N.; BENKEBLIA, N.; ONODERA, S.(Ed). **Recent advances in fructooligosaccharies research**. Trivandrum: Research Signpost, 2007. p. 69-91.

CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, p. 1-8, 1998.

CHATTERTON, N.; HARRISON, P.A. Fructan oligomers in *Poa ampla*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 136, p. 3-10, 1997.

CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; THORNLEY, W.R.; BENNETTI, J.H. Structure of fructan oligomers in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 142, p. 552-536, 1993.

COELHO, F.F.; CAPELO, C.D.L.; NEVES, A.C.O.; FIGUEIRA, J.E.C. Vegetative propagation strategies of four rupestrian species of *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 30, p. 687-694, 2007.

CURY, G.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Internal secretory spaces in thickened underground systems of Asteraceae species. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 57, p. 229-239, 2009.

DAVID, M.M.; COELHO, D.; BARROTE, I.; CORREIA, M.J. Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, p. 299-306, 1998.

DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Carboidratos de reserva em plantas superiores e sua importância para o homem. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, Bogotá, v. 16, n. 61, p. 65-71, 1986.

DINAKARA, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, Oxford, v. 182, p. 29-41, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus Tuberosus*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 67, p. 517-531, 1968.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; CHU, E.P.; ALMEIDA, V.P. Tuberização. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2008. p. 409-419.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.; CHU, E.P.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 159-166, 1986.

GAFF, D.F. Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa Botany. **Science**, Washington, v. 174, p. 1033-1034, 1971.

_____. Desiccation tolerant plants in South America. **Oecologia**, Berlin, v. 74, p. 133-136, 1987.

GARCIA, P. **Variações no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) em resposta ao déficit hídrico e sua relação com a tolerância à seca**. 2009. 130 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, São Paulo, 2009.

GARCIA, P.M.A.; ASEGA, A.F.; SILVA, E.A.; CARVALHO, M.A.M. Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. **Plant Physiology and Biochemistry**, Maryland, v. 49, p. 664-70, 2011.

GIULIETTI, A.M.; HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 4, p. 133-158, 1990.

GIULIETTI, A.M.; MENEZES, N.L.; PIRANI, J.R.; MEGURO, M.; WANDERLEY, M.G.L.I. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 9, p. 1-151, 1987.

GONJITO, B. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 12, p. 7-15, 2008.

HAYASHI, A.H. **Morfo-anatomia de sistemas subterrâneos de espécies herbáceo-subarbustivas e arbóreas, enfatizando a origem das gemas caulinares**. 2003. 143 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 53, p. 273-279, 2005.

_____. Anatomy of the underground system in *Vernonia grandiflora* Less . and *V. brevifolia* Less. (Asteraceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 6, p. 979-988, 2007.

HELDT, H-W; PIECHULLA, B. **Plant biochemistry**. 3rd ed. London: Elsevier- Academic Press, 2011. 622 p.

HENDRY, G. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. **New Phytologist**, Lancaster, v. 106, p. 201-216, 1987.

_____. Evolutionary origins and natural functions of fructans — a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, Lancaster, v. 123, p. 3-14, 1993.

HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In SUZUKI, M.; CHATTERTON, N.J. (Ed.). **Science and technology of fructans**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 119–139.

HENSON, C.; LIVINGSTON, D.P. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. **Plant Physiology and Biochemistry**, Maryland, v. 36, p. 715-720, 1998.

HINCHA, D.K.; LIVINGSTON, D.P.; PREMAKUMAR, R.; ZUTHER, E.; OBEL, N.; CACELA, C.; HEYER, A.G. Fructans from oat and rye: composition and effects on membrane stability during drying. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1768, n. 6, p. 1611-1619, 2007.

ISEJIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. **New Phytologist**, Lancaster, v. 119, n. 1, p. 149-154, 1991.

_____. Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v.34, p. 723-727, 1993.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W.H. Freeman, 1962. 408 p.

JERMYN, M.A. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldohexoses. **Nature**, London, v. 177, p. 38-39, 1956.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw–Hill, 1940. 523 p.

JOHNSON, T.R.; KANE, M.E.; PÉREZ, H.E. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, p. 89-99, 2011.

JOLY, A.B. **Conheça a vegetação brasileira**. São Paulo: EDUSP, 1970. 181 p.

_____. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. Jaguaré: Companhia Editora Nacional, 2005. 777 p.

KAMELI, A.; LOSEL, D.M. Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. **New Phytologist**, Lancaster, v. 125, p. 609-614, 1993.

KAWAKAMI, A.; SATO, Y.; YOSHIDA, M. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 793-802, 2008.

KAWAKAMI, A.; YOSHIDA, M.; VAN DEN ENDE, W. Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. **Gene**, Amsterdam, v. 358, p. 93-101, 2005.

KERMODE, A.R. Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). In BEWLEY, D.J. **Encyclopedia of life sciences**. Chichester: John Wiley, 2011. p. 1-20.

KNIPP, G.; HONERMEIER, B. Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 4, p. 392-7, Mar. 2006.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K-H. **Color atlas of biochemistry**. 2nd ed. Stuttgart; New York: Thieme, 2005. 467 p.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F.; PONS, T.L. **Plant physiological ecology**. 2nd ed. New York: Springer, 2008. 604 p.

LIVINGSTON, D.P.; HINCHA, D.K.; HEYER, A.G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, p. 2007-2023, 2009.

LIVINGSTON III, D.P.; HENSON, C.A. Apoplastic sugars, fructans exohydrolase, and invertase in winter oat : responses to second-phase cold hardening. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 403-408, 1998.

MADEIRA, J.A.; FERNANDES, G.W. Reproductive phenology of sympatric taxa of *Chamaecrista* (Leguminosae) in Serra do Cipó, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 15, p. 463-479, 1999.

McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 49, p. 183-186, 1921.

MEDINA, B.M.O.; FERNANDES, G.W. The potential of natural regeneration of rocky outcrop vegetation on rupestrian field soils in “Serra do Cipó”, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, p. 665-678, 2007.

MELO-DE-PINNA, G.F.A.; MENEZES, N.L. Meristematic endodermis and secretory structures in adventitious roots of *Richtera* Kuntze (Mutisieae-Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2003.

MENEZES, N.L.; MÜLLER, C.; SAJO, M. Um novo e peculiar tipo de sistema subterrâneo em espécies de *Vernonia* da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 7, p. 33-38, 1979.

MORAES, M.G.; CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; FILGUEIRAS, T.S.; FIGUEIREDO-RIBEIRO. Diversity of non-structural carbohydrates in grasses (Poaceae) from Brazil. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 165-177, 2013.

NAKAJIMA, J.N.; JUNQUEIRA, T.V.; FERITAS, F.S.F.; TELES, A.M. Comparative analysis of red lists of the Brazilian flora : Asteraceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 39-54, 2012.

NAMBIAR, N.; TEE, C.S.; MAZIAH, M. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm- like bodies in *Dendrobium* Alya Pink. **Plant Omics Journal**, Southern Cross, n. 1, p. 10-18, 2012.

NASCIMENTO, V.T.; VASCONCELOS, A.S; MACIEL, M.I.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Famine foods of Brazil 's seasonal dry forests: ethnobotanical and nutritional aspects. **Economic Botany**, New York, v. 66, p. 22-34, 2012.

OLIVEIRA, T.S.; BOMBO, A.B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of vegetative organs with an emphasis on the secretory structures of two species of *Aldama* (Asteraceae-Heliantheae). **Botany**, Ottawa, doi: 10.1139/cjb-2012-0271, 2013.

ORTHEN, B. Sprouting of the fructan- and starch-storing geophyte *Lachenalia minima*: effects on carbohydrate and water content within the bulbs. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 113, p. 308-314, 2001.

ORTHEN, B.; WEHRMEYER, A. Seasonal dynamics of non-structural carbohydrates in bulbs and shoots of the geophyte *Galanthus nivalis*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 120, p. 529-536, 2004.

PARVANOV, D.; IVANOV, S.; KONSTANTINOVA, T.; KARANOV, E.; ATANASSOV, A.; TSVETKOV, T.; ALEXIEVA, V.; DIJILIANOV, D. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Maryland, v. 42, p. 57-63, 2004.

PESHEV, D.; VERGAUWEN, R.; MOGILA, A.; HIDEG, E.; VAN DEN ENDE, W. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 4, 1025-1038, 2013.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, p. 185-197, 2001.

PETERS, S.; MUNDREE, S.G.; THOMSON, J.A.; FARRANT, J.M.; KELLER, F.. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1947-1956, 2007.

PETERS, S.; KELLER, F. Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs). **Plant, Cell & Environment**, Weinheim, v. 32, n. 8, p. 1099-107, 2009.

PILON-SMITS, E.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M.J.W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating Tobacco under drought stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 125-130, 1995.

PREISS, J. Plant starch synthesis. In: ELIASSON, A.-C. (Ed.). **Starch in food-structure, function and applications**. Boston; New York; Washington: CRC Press, 2004. p. 3-49.

RANWALA, A.P.; MILLER, W.B. Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **New phytologist**, Lancaster, v. 180, n. 2, p. 421-33, 2008.

RIBEIRO, K.; FREITAS, L. Impactos potenciais das alterações no código florestal sobre a vegetação de campos rupestres e campos de altitude. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 239-246, 2010.

RIZZINI, C.T. Estudos experimentais sobre o xilopódio e outros órgãos tuberosos de plantas do cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 87-113, 1965.

RIZZINI, C.; HERINGER, E. Underground organs of plants from some southern brazilian savannas, with special reference to the xylopodium. **Phyton**, Horn, v. 17, n. 1, p. 105-124, 1961.

_____. Estudos sobre os sistemas subterrâneos difusos de plantas campestres. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 85-112, 1966.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, suppl. 1, p. S13-S25, 2005.

SAGE, R.F.; SAGE, T.L.; PEARCY, R.W.; BORSCH, T. The taxonomic distribution of photosynthesis in *Amaranthaceae* sensu stricto. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 94, n. 12, p. 1992-2003, 2007.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 47-249, 1973.

SCHUBERT, S.; FEUERLE, R. Fructan storage in tubers of Jerusalem artichoke: characterization on sink strength. **New Phytologist**, Stuttgart, v. 136, p. 115-122, 1997.

SHIOMI, N.; ONODERA, S.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) from the cerrado. **New Phytologist**, Lancaster, v. 133, p. 643-650, 1996.

SILVA, F. **Sazonalidade no acúmulo de frutanos em órgãos subterrâneos de *Gomphrena marginata* Seub. (Amaranthaceae) em área de campo rupestre.** 2012. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2012.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determinatios of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.160, p. 61-68, 1945.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 703 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Michigan, v. 29, p. 417-426, 2002.

TERTULIANO, M.F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. **New Phytologist**, Lancaster, v. 123, p. 741-749, 1993.

TOLSMA, A.D.; READ, S. M.; TOLHURST, K.G. Roots of Australian alpine plant species contain high levels of stored carbohydrates independent of post-fire regeneration strategy. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 55, p. 771-779, 2007.

VALLURU, R.; VAN DEN ENDE, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 2905-2916, 2008.

VANDOORNE, B.; MATHIEU, A.S.; VAN DEN ENDE, W.; VERGAUWEN, R.; JAVAUX, M.; LUTTS, S. Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. sativum) independently of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 4359-73, 2012.

VASCONCELOS, M.F. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, p. 241-246, 2011.

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

VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hill. (Amaranthaceae) at different phenological phases. **Plant, Cell & Environment**, Weinheim, v. 16, p. 919-928, 1993.

VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 351-359, 1999.

VILA VERDE, G..M.; PAULA, J.R.;CARNEIRO, D.D. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, p. 64-66, 2003.

VILHALVA, D.A.A.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Morfo-anatomia do sistema subterrâneo de *Calea verticillata* (Klatt) Pruski e *Isostigma megapotamicum* (Spreng.) Sherff - Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, p. 39-47, 2006.

VILHALVA, D.A.A.; CORTELAZZO, A.L.; CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Histochemistry and ultrastructure of *Campuloclinium chlorolepis* (Asteraceae) tuberous roots accumulating fructan : evidences of functions other than reserve carbohydrate. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 59, p. 46-52, 2011.

WANG, C.-Y.; CHIOU, C.-Y.; WANG, H.-L.;KRISHNAMURTHY, R.; VENKATAGIRL, S.; TAN, J.; YEH, K.-W. Carbohydrate mobilization and gene regulatory profile in the pseudobulb of *Oncidium* orchid during the flowering process. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 1063-77, 2008.

WANG, N.; NOBEL, P. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 709-714, 1998.

WANG, R.X.; SONG, X.Q.; HE, M.G.; SONG, S.Q. Developmental changes of cryo-tolerance associated with stored reserve accumulation of *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae) seeds. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 39, p. 271-281, 2011.

WISE, C.S.; DIMLER, R.J.; DAVIS, H.A.; RIST, C.E. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparation. **Analytical Chemistry**, Wasingnton v. 27, p. 33-36, 1955.