Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Anatomia, germinação de sementes e análise do óleo essencial de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (Asteraceae – Heliantheae)

Tuane Santos de Oliveira

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

Piracicaba
2011

Tuane Santos de Oliveira
Bacharel em Ciências Biológicas

Anatomia, germinação de sementes e análise do óleo essencial de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (Asteraceae – Heliantheae)

Orientador:
Profa. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO DA GLÓRIA**

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

Piracicaba
2011

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

Oliveira, Tuane Santos de
Anatomia, germinação de sementes e análise do óleo essencial de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (Asteraceae – Heliantheae) / Tuane Santos de Oliveira. - - Piracicaba, 2011.
95 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Anatomia vegetal 2. Compositae 3. Fitoquímica 4. Germinação de sementes 5. Morfologia vegetal 6. Óleos essenciais I. Título

CDD 583.55
O48a

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

À minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo milagre da vida, por ser meu eterno guia e amigo.

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória pela confiança e por me abrir as portas do seu laboratório, transmitindo com tamanha dedicação seu exemplo de pesquisadora e docente, o qual levarei para sempre comigo. Minha eterna admiração e amizade.

À equipe do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), em especial à Profa. Dra. Vera Lucia Garcia Rehder pela orientação nas análises químicas dos óleos essenciais e à Adriana da Silva Santos de Oliveira pelo apoio técnico.

À equipe do Laboratório de Sementes da ESALQ/USP, em especial à Profa. Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre pela orientação nas análises referentes à germinação de sementes e à Helena Pescarin Chamma, pelo apoio técnico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo n°: 2010/02005-1) e pelo apoio financeiro através do projeto Temático (Processo n°: 2010/51454-3).

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo aprendizado profissional e pessoal, além das amizades que pude conquistar durante esse período. À Secretária do referido Programa Sra. Maria Solizete Granziol Silva por sua constante dedicação.

À equipe do laboratório de Anatomia Vegetal (ESALQ/USP) pela amizade e apoio nos momentos difíceis além dos maravilhosos momentos de descontração. Vocês se tornaram mais que amigos e estarão sempre na minha lembrança e no meu coração.

À Profa. Dra. Mara Angelina Galvão Magenta pela identificação dos materiais coletados.

À equipe do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ/USP) pelo apoio no uso dos equipamentos.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), em especial ao Enio Tiago de Oliveira e ao Vanderlei A. A. de Miranda (Vandi) pela amizade e pelo apoio na casa de vegetação e nas coletas.

À Comissão Técnico Científica do Instituto Florestal do Estado de São Paulo (COTEC) pela concessão da licença de coleta e aos funcionários da Estação Ecológica de Itirapina pelo apoio.

À Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e ao Instituto de Botânica de São Paulo pela autorização para coleta de material botânico na Reserva Biológica de Mogi Guaçu, em especial ao pesquisador João Del Giudice Neto e ao Sr. Paulo pela atenção e apoio nas coletas.

À Francynês e à Natalie por serem minhas companheiras de república durante o mestrado. Em Especial à Fran pela amizade e convivência tão agradável, pelas engrandecedoras discussões científicas, conselhos, risadas, por seu exemplo de superação e por ter se tornado uma verdadeira irmã.

Ao meu namorado e amigo Leonardo Namorato por todo o apoio, por ser um exemplo de dedicação à sua profissão e por tudo o que a nossa história significa nas nossas vidas.

À minha família, em especial à minha mãe pelo amor, dedicação e compreensão na minha ausência durante este estudo.

“E, se bem que seja obscuro
Tudo pela estrada fora,
E falso, ele vem seguro,
E, vencendo estrada e muro,
Chega onde em sono ela mora.
E, inda tonto do que houvera,
À cabeça, em maresia,
Ergue a mão, e encontra hera,
E vê que ele mesmo era A Princesa que dormia.”.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO..... 15
Referências.....18
2 ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE *Viguiera arenaria* BAKER IN MARTIUS E *Viguiera robusta* GARDNER IN HOOK.....21
Resumo.....21
Abstract.....22
2.1 Introdução.....22
2.2 Material e Métodos.....24
2.2.1 Material botânico.....24
2.2.2 Estudos anatômicos.....25
2.3 Resultados.....27
2.3.1 Anatomia da folha.....27
2.3.2 Anatomia do caule aéreo.....32
2.3.3 Anatomia do xilopódio.....34
2.3.4 Anatomia da raiz.....36
2.4 Discussão.....40
2.5 Conclusões.....45
Referências..... 45
3 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Viguiera arenaria* BAKER IN MARTIUS E *Viguiera robusta* GARDNER IN HOOK.....53
Resumo.....53
Abstract.....53
3.1 Introdução.....54
3.2 Material e Métodos.....56
3.2.1 Material botânico.....56
3.2.2 Obtenção dos óleos essenciais.....57
3.2.3 Análise da composição dos óleos essenciais por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas – CG/EM.....58

3.3 Resultados.....59
3.3.1 Rendimento dos óleos essenciais.....59
3.3.2 Perfil químico e composição dos óleos essenciais.....59
3.4 Discussão.....74
3.5 Conclusões.....77
Referências.....77
4 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE DUAS ESPÉCIES DE *Viguiera* KUNTH (ASTERACEAE) DO CERRADO PAULISTA..... 83
Resumo.....83
Abstract.....83
4.1 Introdução.....84
4.2 Material e Métodos.....86
4.2.1 Coleta, seleção e armazenamento dos frutos.....86
4.2.2 Instalação do experimento e acompanhamento do processo germinativo.....86
4.2.3 Análise das sementes não germinadas.....87
4.2.4 Análises estatísticas.....87
4.3 Resultados.....88
4.3.1 Teste de germinação.....88
4.3.2 Análises das sementes não germinadas.....89
4.4 Discussão.....90
4.5 Conclusões.....92
Referências.....92

RESUMO

Anatomia, germinação de sementes e análise do óleo essencial de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (Asteraceae – Heliantheae)

A família Asteraceae possui cerca de 1.600 gêneros e 20.000 espécies, representando cerca de 10% da flora mundial. No Cerrado é a segunda maior família dentre as fanerógamas em número de espécies, com grande importância no estrato herbáceo e arbustivo. Dentre as tribos da família Asteraceae, Heliantheae é considerada um grupo monofilético, com 189 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies de ervas, arbustos e árvores. É importante economicamente com utilização alimentícia (girassol), ornamental (dália) e medicinal (camomila). Dentre os maiores gêneros de Heliantheae estão *Bidens*, *Viguiera* e *Wedelia*. *Viguiera* Kunth é um gênero exclusivamente americano com 180 espécies, das quais 27 são exclusivamente brasileiras. Seus representantes ocorrem principalmente em regiões de inverno seco com eventos periódicos de queimada como o Cerrado. A adaptação a esses ambientes pode estar ligada ao comportamento sazonal destas espécies, o qual consiste na senescência dos ramos aéreos nos períodos de baixas temperaturas e seca (fase de dormência) e na formação de novos ramos nos períodos de disponibilidade hídrica e temperaturas favoráveis (fase de floração). As espécies *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook estão incluídas na seção *Paradosa* na classificação das espécies do gênero *Viguiera* e são confundidas em materiais herborizados, sendo distinguidas atualmente apenas por caracteres polínicos. O estudo anatômico de *V. arenaria* e *V. robusta* visa contribuir para o levantamento de caracteres diagnósticos que auxiliem no reconhecimento destas em materiais herborizados ou não. Ambas as espécies são aromáticas em campo, devido à presença de compostos voláteis. Estudos fitoquímicos têm destacado o potencial farmacológico destas espécies, com base na atividade de terpenos de alto peso molecular como lactonas sesquiterpênicas e diterpenos. A literatura carece, porém, de dados sobre a composição química dos óleos essenciais motivo pelo qual os mesmos são apresentados no presente estudo. Tais informações auxiliam, através da quimiotaxonomia, na distinção entre as espécies, além de identificar compostos possivelmente fitoterápicos. O estudo da germinação de espécies de *Viguiera arenaria* e *V. robusta* aqui apresentado visa contribuir para o conhecimento sobre a propagação destas espécies visando uma possível exploração de seus princípios ativos, já que atualmente, elas ocorrem apenas em ambientes naturais de Cerrado.

Palavras-chave: Asteraceae; *Viguiera* Kunth; Morfoanatomia; Óleos essenciais; Germinação de sementes

ABSTRACT

Anatomy, seed germination and analysis of essential oil of *Viguiera arenaria* Baker in Martius and *Viguiera robusta* Gardner in Hook (Asteraceae - Heliantheae)

Asteraceae family has about 1,600 genera and 20,000 species, representing about 10% of the world flora. In the Cerrado is the second largest family among the phanerogams in number of species with a great importance in the herbaceous and shrubby layers. In the family Asteraceae, Heliantheae is considered a monophyletic group, with 189 genera and approximately 2,500 species of herbs, shrubs and trees. It is a tribe of economical importance, with different uses: food (sunflower), ornamental (dahlia) and medicinal (chamomile). The most important genera of Heliantheae are *Bidens*, *Viguiera* and *Wedelia*. *Viguiera* Kunth is an exclusively American genus with 180 species, and 27 are exclusively Brazilian. Its representatives occur mainly in Cerrado regions with dry winters and periodic fire events. The adaptation to these environments can be linked to the seasonal behavior of these species, which is the senescence of the aerial organs during periods of low temperatures and dry (dormant phase) and the formation of new aerial organs during periods of water availability and favorable temperatures (flowering phase). *Viguiera arenaria* Baker in Martius and *Viguiera robusta* Gardner in Hook are included in *Paradosa* section in the classification of the genus *Viguiera* and they are indistinguishable to herborized materials, being distinguished only by their pollen. The anatomical study of *V. arenaria* and *V. robusta* aims to contribute to gather of diagnostic characters that aid in the recognition of herborized materials or not. Both species are aromatic in the field, due to the presence of volatile compounds. Phytochemical studies have highlighted the pharmacological potential of these species, based on the activity of terpenes of high molecular weight such as sesquiterpene lactones and diterpenes. The literature lacks, however, data about the chemical composition of the essential oils. This is the reason why their chemical composition is presented in this study. Such information helps, by chemotaxonomy, the distinction among species and besides that, could contribute to identify possible phytotherapics compounds. The study of the seed germination of *Viguiera arenaria* and *V. robusta* presented here aims to contribute to the knowledge about the spread of these species towards a possible exploitation of their active compounds, because nowadays they occur only in natural areas of Cerrado.

Keywords: Asteraceae; *Viguiera* Kunth; Morphoanatomy; Essential oils; Seed germination

1 INTRODUÇÃO

A família Asteraceae possui cerca de 1600 gêneros e, com mais de 20.000 espécies (BREMER, 1994; JEFFREY, 2007; JUDD et al., 2009), representa cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1994). No Cerrado é a segunda maior família dentre as fanerógamas em número de espécies (MENDONÇA et al., 2008), tendo grande importância no estrato herbáceo e arbustivo (BATALHA; MANTOVANI; MESQUITA JÚNIOR, 2001). Seus representantes possuem hábitos variados como ervas, subarbustos ou excepcionalmente árvores, epífitas e muitos ainda são escandentes (MAGENTA, 2006). A diversidade de nichos ocupados pelas espécies de Asteraceae reflete a grande plasticidade observada entre os representantes da família. Estes apresentam padrões fisiológicos, anatômicos e morfológicos particulares que permitiram a sua adaptação aos ambientes temperados, tropicais, subtropicais (CRONQUIST, 1981).

Dentre as tribos da família Asteraceae, Heliantheae é considerada um grupo monofilético, com 189 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies de ervas, arbustos e árvores (BREMER, 1994). Seus representantes são cosmopolitas, principalmente tropicais e subtropicais (MAGENTA, 2006) e são importantes economicamente como o girassol (*Helianthus annuus)* cujas sementes são usadas na produção de óleo, as dálias (*Dahlia* spp.), utilizadas como espécies ornamentais e a camomila (*Matricaria recutita*), aplicada na medicina popular. Dentre os maiores gêneros de Heliantheae estão *Bidens*, *Viguiera* e *Wedelia* (BREMER, 1994).

Viguiera Kunth é um gênero exclusivamente americano com 180 espécies, das quais 27 são exclusivamente brasileiras (MAGENTA, 2006; MAGENTA; PIRANI; MONDIN, 2010). Seus representantes são ervas a arbustos e pequenas árvores, com folhas alternas na porção superior e geralmente opostas na porção inferior (MAGENTA, 2006). Segundo Magenta (2006) as espécies de *Viguiera* ocorrem principalmente em regiões de inverno seco com eventos periódicos de queimada como o Cerrado. A adaptação a esses ambientes pode estar ligada ao comportamento sazonal destas espécies, o qual consiste na senescência dos ramos aéreos nos períodos de baixas temperaturas e seca (fase de dormência) e na formação de novos ramos nos períodos de disponibilidade hídrica e temperaturas favoráveis (fase de

floração), como observado em outras espécies de Asteraceae do Cerrado (HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2007; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008a).

O gênero *Viguiera* é composto por três subgêneros, sendo *Calanticaria* subdividido em sete seções. Inserida na seção *Paradosa* encontra-se a série *Bracteata* a qual inclui, dentre outras, as espécies *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (BLAKE, 1918).

Os indivíduos de *Viguiera arenaria* são ervas cespitosas a subarbustos (Figura 1A) com folhas alternas verdes claras, inteiras, ou muito esparsamente denteadas, sésseis ou pecioladas e capítulos radiados com 4,5 a 5,5cm de diâmetro (Figura 1B). O caule subterrâneo é espessado e as raízes adventícias apresentam tuberizações (Figura 1C). Seus representantes concentram-se principalmente no centro-leste do estado de São Paulo, com poucas ocorrências no sudoeste de Minas Gerais, em áreas de Cerrado (MAGENTA, 2006).

Os indivíduos de *Viguiera robusta* são ervas a subarbustos (Figura 1D) com folhas discolores a levemente discolores com a porção superior esparsamente denteada, serreada ou crenada. A filotaxia é alterna ou as folhas inferiores opostas e superiores alternas, sésseis ou pecioladas e os capítulos com 2 a 2,5cm de diâmetro (Figura 1E). O caule subterrâneo é espessado e as raízes adventícias são uniformemente tuberizadas (Figura 1F). É uma espécie bastante comum, ocorrendo no Distrito Federal, Goiás, Tocantins, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, em campos e Cerrados íntegros ou degradados, rodovias, na margem de rios e córregos (MAGENTA, 2006).

Segundo Magenta (2006) *V. arenaria* e *V. robusta* são facilmente confundidas em materiais herborizados, podendo ser distinguidas apenas por caracteres polínicos. Estudos como os de Zareh (2005), Adedeji e Jewoola (2008) e Fritz e Saukel (2011) têm demonstrado a importância de caracteres anatômicos na taxonomia de Asteraceae. O estudo anatômico de *V. arenaria* e *V. robusta* pode contribuir para o levantamento de caracteres diagnósticos, auxiliando no reconhecimento destas em materiais herborizados ou não.

Figura 1 – A-C. *Viguiera arenaria* Baker in Martius. A. Indivíduo em ambiente natural. B. Detalhe da inflorescência. C. Sistema subterrâneo constituído por xilopódio e raízes adventícias com porções tuberizadas e não tuberizadas. D-F. *Viguiera robusta* Gardner in Hook. D. Indivíduo em ambiente natural. E. Detalhe da inflorescência. E. Sistema subterrâneo constituído por xilopódio e raízes adventícias uniformemente tuberizadas. Barras: A = 5 cm; B = 2 cm; C, F = 10 cm; D = 8 cm; E = 1 cm

Viguiera arenaria e *V. robusta* são aromáticas em campo (obs. pessoal), devido possivelmente à biossíntese de óleos essenciais. Estudos fitoquímicos têm destacado o potencial farmacológico destas espécies, com base na atividade de terpenos de alto peso molecular como lactonas sesquiterpênicas e diterpenos (ARAKAWA et al., 2008; NICOLETE et al., 2009; CARVALHO et al., 2011). A literatura carece, porém, de estudos acerca da composição química dos óleos essenciais, os quais podem auxiliar, através da quimiotaxonomia, na distinção entre grupos vegetais, como relatado por Harbone e Turner (1984).

Com relação às estratégias de propagação, Ruggiero e Zaidan (1997) descrevem o comportamento germinativo de *V. robusta* sob diferentes temperaturas, porém a propagação de *V. arenaria* ainda não está esclarecida. Tais informações podem contribuir para o conhecimento sobre as condições favoráveis ao cultivo destas espécies visando uma possível exploração de seus princípios ativos, já que atualmente, elas ocorrem apenas em ambientes naturais de Cerrado.

O presente trabalho está apresentado na forma de capítulos. O capítulo 2 aborda a anatomia dos órgãos vegetativos de *V. arenaria* e *V. robusta* visando levantar caracteres distintivos entre estas. O capítulo 3 traz o rendimento e composição química dos óleos essenciais das duas espécies, visando compreender a biossíntese destes nas diferentes fases fenológicas (floração e dormência) e identificar substâncias exclusivas para ambas, contribuindo para a sua distinção. No capítulo 4 é abordada a germinação de *V. arenaria* e *V. robusta* sob diferentes faixas de temperatura, visando identificar a temperatura ideal para que este processo ocorra.

Referências

ADEDEJI, O.; JEWOOLA, O.A. Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v. 36, n. 2, p. 7-16, 2008.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CURY, G.; SOARES, M.K.M.; ROCHA, R.; HAYASHI, A.H. Underground systems of Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. **Journal of the Torrey Botanical Society**, London, v. 135, p. 103-113, 2008.

ARAKAWA, N.S.; SCHORR, K.; AMBRÓSIO, S.R.; MERFORT, I.; DA COSTA, F.B. Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift fur Naturforschung . C. A Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 63, p. 533-538, 2008.

BATALHA, M.A.; MANTOVANI, W.; MESQUITA JÚNIOR, H.N. Vegetation structure in Cerrado physiognomies in south-eastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 61, p. 475-483, 2001.

BLAKE, S.F. A revision of the genus *Viguiera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, Cambridge, v. 51, p. 1-205, 1918.

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

CARVALHO, T.C.; SIMÃO, M.R.; AMBRÓSIO, S.R.; FURTADO, N.A.; VENEZIANI, R.C.; HELENO, V.C.; DA COSTA, F.B.; GOMES, B.P.; SOUZA, M.G.; REIS, E.B.; MARTINS, C.H. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, Switzerland, v. 16, n. 1, p. 543-551, 2011.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981, 1262 p.

FRITZ, E.; SAUKEL, J. Secretory structures of subterranean organs of some species of the Cardueae, and their diagnostic value. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Krakow, v. 53, n. 1, p. 62-72, 2011.

HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. **Plant Chemosystematics**. London: Academic Press, 1984. 562 p.

HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 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.

JEFFREY, C. Compositae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**: flowering plants-eudicots. Berlin: Springer Verlag, 2007. v. 8, p. 61-77.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática vegetal:** um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

MAGENTA, M.A.G. ***Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil**. 2006. 353 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAGENTA, M.A.G.; PIRANI, J.R.; MONDIN, C.A. Novos táxons e combinações em *Viguiera* (Asteraceae - Heliantheae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 1, p. 1-11, 2010.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; FAGG, C.W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12356 espécies. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (Org.). **Cerrado:** ecologia e flora. Brasília: Embrapa Cerrados, 2008. v. 2, p. 421-442.

NICOLETE, R.; ARAKAWA, N.S.; RIUS, C.; NOMIZO, A.; JOSE, P.J.; DA COSTA, F.B.; SANZ, M.J.; FACCIOLI, L.H. Budlein a from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. **Phytomedicine**, Jena, v. 16, p. 904-915, 2009.

RUGGIERO, P.G.C.; ZAIDAN, L.B.P. Estudos de desenvolvimento de *Viguiera robusta* Gardner, uma Asteraceae do Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 1-9, 1997.

ZAREH, M.M. Systematic and anatomical studies of Inuleae and Plucheeae in Egypt. **Feddes Repertorium**, Weinheim, v. 116, p. 43-53, 2005.

2 ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE *Viguiera arenaria* BAKER IN MARTIUS E *Viguiera robusta* GARDNER IN HOOK

Resumo

Viguiera Kunth é um dos maiores gêneros da tribo Heliantheae (Asteraceae) e suas relações taxonômicas e filogenéticas não são bem definidas. Inseridas na seção *Paradosa*, *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook são confundidas em materiais herborizados, sendo distinguidas atualmente apenas por caracteres polínicos. Objetivou-se com este trabalho levantar caracteres anatômicos de valor diagnóstico entre estas espécies com base no estudo dos órgãos vegetativos aéreos e subterrâneos, além de identificar as estruturas secretoras presentes nestes órgãos. Os indivíduos de *V. arenaria* foram coletados na Estação Ecológica de Itirapina e os de *V. robusta* na Reserva Biológica de Mogi Guaçu, ambas são áreas de Cerrado do estado de São Paulo, Brasil. O material botânico foi herborizado e as exsicatas incorporadas ao acervo do Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. As amostras de folhas, caule aéreo, xilopódio e raízes foram fixadas em FAA_{50} (1:1:8 formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 50%), e infiltradas em historesina (Leica Historesin). Secções seriadas de 5µm de espessura, obtidas em micrótomo rotativo, foram coradas com azul de toluidina e as lâminas permanentes foram montadas em resina sintética. Também foram realizados testes histoquímicos em materiais frescos ou fixados. Para a análise da superfície foliar ao microscópio eletrônico de varredura as amostras foram fixadas em Karnovsky, desidratadas em série etílica e pelo método do ponto crítico de CO_2, afixados em suporte metálico e cobertas com ouro. Foi também realizada a dissociação da epiderme em solução de Jeffrey. Observou-se que *V. arenaria* e *V. robusta* diferem quanto à posição dos estômatos nas folhas e tipo e ocorrência de tricomas e espaços internos secretores em todos os órgãos analisados. Ambas as espécies apresentam hidatódios nas ornamentações do bordo e ápice foliares. O sistema subterrâneo é constituído por xilopódio e raízes adventícias. O xilopódio é revestido pela epiderme ou por células suberizadas resultantes de divisões periclinais de células parenquimáticas. As raízes adventícias de *V. arenaria* apresentam porções tuberizadas e não tuberizadas e em *V. robusta* são uniformemente tuberizadas. Embora o câmbio vascular participe do processo de tuberização das raízes adventícias, esta resulta principalmente da hipertrofia e hiperplasia de células da medula, em especial em *Viguiera arenaria*. As análises anatômicas permitiram a identificação de caracteres para a distinção entre *Viguiera arenaria* e *V. robusta* em materiais já herborizados ou não.

Palavras-chave: Asteraceae; *Viguiera* Kunth; Morfoanatomia; Estruturas secretoras

Abstract

Viguiera Kunth is one of the largest genera of the Heliantheae tribe (Asteraceae) and its taxonomic and phylogenetic relationships are not well defined. Inserted in *Paradosa* section, *Viguiera arenaria* Baker in Martius and *Viguiera robusta* Gardner in Hook are indistinguishable to herborized materials, being distinguished only by their pollen. The objective of this study is to identify anatomical characters of diagnosis value between these species based on the study of the vegetative organs and identify their secretory structures. Individuals of *V. arenaria* were collected at the Itirapina Ecological Station and *V. robusta* were collected at Biological Reserve of Mogi Guaçu, both are Cerrado areas in São Paulo State, Brazil. The samples were registered and added to the plant collection of the Herbarium (ESA) of the Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" of the Universidade de São Paulo. The samples of leaves, aerial stems, roots and xylopodium were fixed in FAA_{50} (1:1:8 formaldehyde, glacial acetic acid and ethyl alcohol 50%) and embedded in Historesin (Leica Historesin). Serial sections were cut at 5µm thickness on a rotary microtome, stained with toluidine blue O and the permanent slides were mounted in synthetic resin. Histochemical tests were performed on fresh or fixed material. For the analysis of the leaf surface by scanning electron microscopy, samples were fixed in Karnovsky, dehydrated in a graded ethanol series and critical point-dried with CO_2. Samples were attached to aluminium stubs and coated with gold. It was also performed the epidermis dissociation in Jeffrey's solution. It was observed that *V. arenaria* and *V. robusta* differ from each other by the position of the stomata in the leaves and by the type and occurrence of secretory trichomes and internal spaces in all organs analyzed. Both species have hydathodes in the margin ornamentation of the leaf and in its apex. The underground system consists of a xylopodium and adventitious roots. The xylopodium is covered by the epidermis or suberized cells resulting from periclinal divisions of parenchyma cells. The adventitious roots of *V. arenaria* have tuberous and non-tuberous portions, while *V robusta* has uniformly thickened tuberous roots. Although the vascular cambium is involved in the tuberization of the root, this process results mainly from the hypertrophy and hyperplasia of the pith cells, especially in *Viguiera arenaria*. The analysis allowed the identification of anatomical characters for the distinction between *Viguiera arenaria* and *V. robusta* in herborized materials or not.

Keywords: Asteraceae; *Viguiera* Kunth; Morfoanatomy; Secretory structures

2.1 Introdução

Viguiera Kunth é um gênero exclusivamente Neotropical, e um dos maiores da tribo Heliantheae (Asteraceae). Estudos apontam tratar-se de um grupo parafilético (SCHILLING; PANERO, 1991; SCHILLING et al., 2000; MAGENTA, 2006) e, segundo Magenta, Pirani e Mondin (2010), das 35 espécies ocorrentes no Brasil, 27 são endêmicas. Para Magenta (2006) as espécies sulamericanas aparentemente

descendem de grupos do Hemisfério Norte e o processo de dispersão das espécies do gênero estaria ainda em fase inicial no Hemisfério Sul.

As relações taxonômicas e filogenéticas do gênero *Viguiera* não são bem definidas e estudos têm sido realizados com o objetivo de auxiliar na circunscrição do grupo (PANERO; SCHILLING, 1988; SCHILLING; PANERO, 1996; SCHILLING et al., 2000; MAGENTA, 2006; MAGENTA, PIRANI; MONDIN, 2010). A revisão mais abrangente do gênero foi feita por Blake (1918), na qual o autor definiu grupos infra-genéricos com base em caracteres morfológicos e no hábito das espécies, porém para Magenta (2006) tais classificações são artificiais, necessitando maiores análises para o agrupamento ou separação das espécies. Segundo a autora, *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook, ambas inseridas na seção *Paradosa* por Blake (1918), são confundidas em materiais herborizados, sendo distinguidas atualmente apenas por caracteres polínicos.

Viguiera arenaria e *V. robusta* são ervas a subarbustos e possuem órgão subterrâneo espessado potencialmente gemífero, do qual partem raízes tuberizadas. Ambas ocorrem em áreas degradadas de Cerrado e beiras de estradas e apresentam desenvolvimento sazonal (MAGENTA, 2006). Tal desenvolvimento consiste na formação de ramos aéreos a partir das gemas subterrâneas na fase de floração e a senescência destes no período de dormência, durante o qual permanecem apenas os órgãos subterrâneos. Tais espécies são aromáticas em campo (obs. pessoal), devido provavelmente à presença de compostos voláteis, como óleos essenciais, provenientes do metabolismo secundário. A literatura carece de informações acerca dos sítios de biossíntese de tais metabólitos, embora trabalhos como os de Da Costa et al. (2001) e Porto et al. (2009) tenham demonstrado o potencial fitoquímico de tais espécies com base em compostos de alto peso molecular como lactonas sesquiterpênicas e diterpenos.

Segundo Fahn (1979) os terpenos de baixo peso molecular, são produzidos por tricomas e/ou canais. Estes e outros tipos de estruturas secretoras são amplamente distribuídos em espécie de Asteraceae (SOLEREDER, 1908; RAMAYYA, 1962; METCALFE; CHALK, 1979; CURY; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2009). A compreensão dos tipos, bem como da distribuição das estruturas secretoras no corpo

vegetal, são de grande importância no fornecimento de dados que permitam a exploração direcionada de órgãos que contenham compostos potencialmente bioativos, evitando o extrativismo desnecessário de estruturas que não possuam potencial fitoquímico. Além disso, o conhecimento das estruturas secretoras e de outros caracteres anatômicos e morfológicos tem sido de grande utilidade no levantamento de argumentos que auxiliam na delimitação taxonômica de Asteraceae, permitindo a distinção entre táxons (CASTRO; LEITAO-FILHO; MONTEIRO, 1997; ZAREH, 2005; ADEDEJI; JEWOOLA, 2008; FRITZ; SAUKEL, 2011). Dessa forma o estudo anatômico e morfológico de *V. arenaria* e *V. robusta* é importante para o fornecimento de caracteres distintivos entre estas, auxiliando no seu reconhecimento em herbários, bem como em ambientes naturais.

Diante do exposto acima objetivou-se com esse trabalho levantar caracteres anatômicos de valor diagnóstico entre *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook com base no estudo dos órgãos vegetativos aéreos e subterrâneos, além de identificar as estruturas secretoras presentes nestes órgãos, em ambas as espécies.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material botânico

A coleta dos indivíduos de *Viguiera arenaria* foi realizada na Estação Ecológica de Itirapina (22°14'S e 47°51'W) enquanto a de *V. robusta* foi feita na Reserva Biológica de Mogi Guaçu (Fazenda Campininha) (22°42'S e 47°37'W).

Parte do material foi submetida às técnicas usuais de herborização, identificada pela especialista no gênero Mara Angelina Galvão Magenta e as exsicatas incorporadas ao acervo do Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESA) da Universidade de São Paulo sob os números 111847 (*Viguiera arenaria*) e 114255 (*Viguiera robusta*).

2.2.2 Estudos anatômicos

Foram realizadas análises anatômicas de folhas, caule aéreo, caule subterrâneo espessado (xilopódio) e raízes adventícias de ambas as espécies. Na folha completamente expandida foram analisadas a região mediana da lâmina foliar (na porção da nervura central, área internevural e bordo) e o ápice. O caule aéreo foi analisado nas regiões do terceiro e do vigésimo entrenó e do entrenó mais próximo do solo. *Viguiera arenaria* possui raízes adventícias com regiões tuberizadas e não tuberizadas, e ambas foram analisadas. Em *V. robusta* como as raízes são uniformemente tuberizadas foi necessário analisar raízes com diferentes espessuras para comparar as estruturas primária e secundária.

As amostras foram fixadas em FAA_{50} (1:1:8 formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 50%) (JOHANSEN, 1940), submetidas à bomba de vácuo para retirada de ar contido nos tecidos, desidratadas em série etílica crescente e estocadas em álcool etílico 70%.

Parte do material foi desidratada em série etílica e infiltrada em resina plástica (Leica Historesin) para a obtenção de blocos, os quais foram seccionados em micrótomo rotativo entre 5-10 µm de espessura. Para a confecção de lâminas permanentes as secções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão citrato-fosfato em pH entre 4 e 6 (SAKAI, 1973) e montadas em resina sintética “Entellan”. Foram realizados também cortes em micrótomo de deslize (modelo Leica SN 2000 R) (60-90 µm) ou à mão livre com o auxílio de lâmina de barbear, os quais foram clarificados com hipoclorito de sódio 20%, lavados em água destilada, corados com safranina e azul de astra (BURGER; RICHTER, 1991) e as lâminas montadas em gelatina glicerinada.

Para a realização dos testes histoquímicos foram utilizados materiais frescos ou fixados em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), os quais foram seccionados nos micrótomos de deslize ou rotativo. Para verificar a presença de substâncias lipofílicas utilizou-se Sudan IV (JENSEN, 1962), reagente de Nadi (DAVID; CARDE, 1964) para terpenos, cloreto de zinco iodado (STRASBURGER, 1913) para amido, cloreto férrico para substâncias fenólicas (JOHANSEN, 1940), floroglucina em meio

ácido para lignina (JOHANSEN, 1940) e vermelho de rutênio para substâncias pécticas (JOHANSEN, 1940). As lâminas foram montadas com o próprio corante ou reagente ou em água destilada. Para a análise dos frutanos do tipo inulina amostras dos sistemas subterrâneos foram seccionadas à mão livre e mantidas em etanol 70% por quatro dias. Os cristais de inulina foram visualizados em luz polarizada e sua presença confirmada pelo teste com o reagente ácido de timol sulfúrico (JOHANSEN, 1940).

Para observação da superfície foliar foi realizada a técnica de dissociação de epiderme em solução de Jeffrey a 10% (JOHANSEN, 1940). Os fragmentos foram corados com safranina e azul de astra (BURGER; RICHTER, 1991) e montados em gelatina glicerinada.

As imagens digitais foram geradas através de microscópio trinocular Leica DM LB acoplado à câmera de vídeo Leica DC 300 F e capturadas no microcomputador pelo programa IM50. Os estômatos foram classificados segundo Metcalfe e Chalk (1979) e os tricomas glandulares segundo Castro, Leitão-Filho e Monteiro (1997).

Para análise micromorfológica da superfície foliar em microscopia eletrônica de varredura amostras do material foram fixadas em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e desidratadas em série etílica até etanol absoluto. Em seguida foram submetidas à secagem ao ponto crítico de CO_2 (HORRIDGE; TAMM, 1969), montadas sobre suportes de alumínio e cobertas com camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e elétron-micrografias foram feitas em microscópio eletrônico de varredura LEO modelo VP 435, operado a 20 kV, com as escalas diretamente impressas nas mesmas. Todo o preparo das amostras e as análises foram realizados no Núcleo Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

A morfologia dos órgãos subterrâneos foi documentada por meio de fotografias com máquina digital.

2.3 Resultados

2.3.1 Anatomia da Folha

Em vista frontal o contorno das células epidérmicas de *Viguiera arenaria* é reto na face adaxial (Figura 2.1A) e sinuoso na face abaxial (Figura 2.1B). Em *V. robusta* as células epidérmicas de ambas as faces possuem contorno sinuoso, o qual é mais pronunciado na face abaxial (Figuras 2.1C e D). Nas duas espécies o estômato é do tipo anomocítico (Figuras 2.1A, B e D) e há dois tipos de tricomas glandulares e um tipo de tricoma tector (Figuras 2.1E-I).

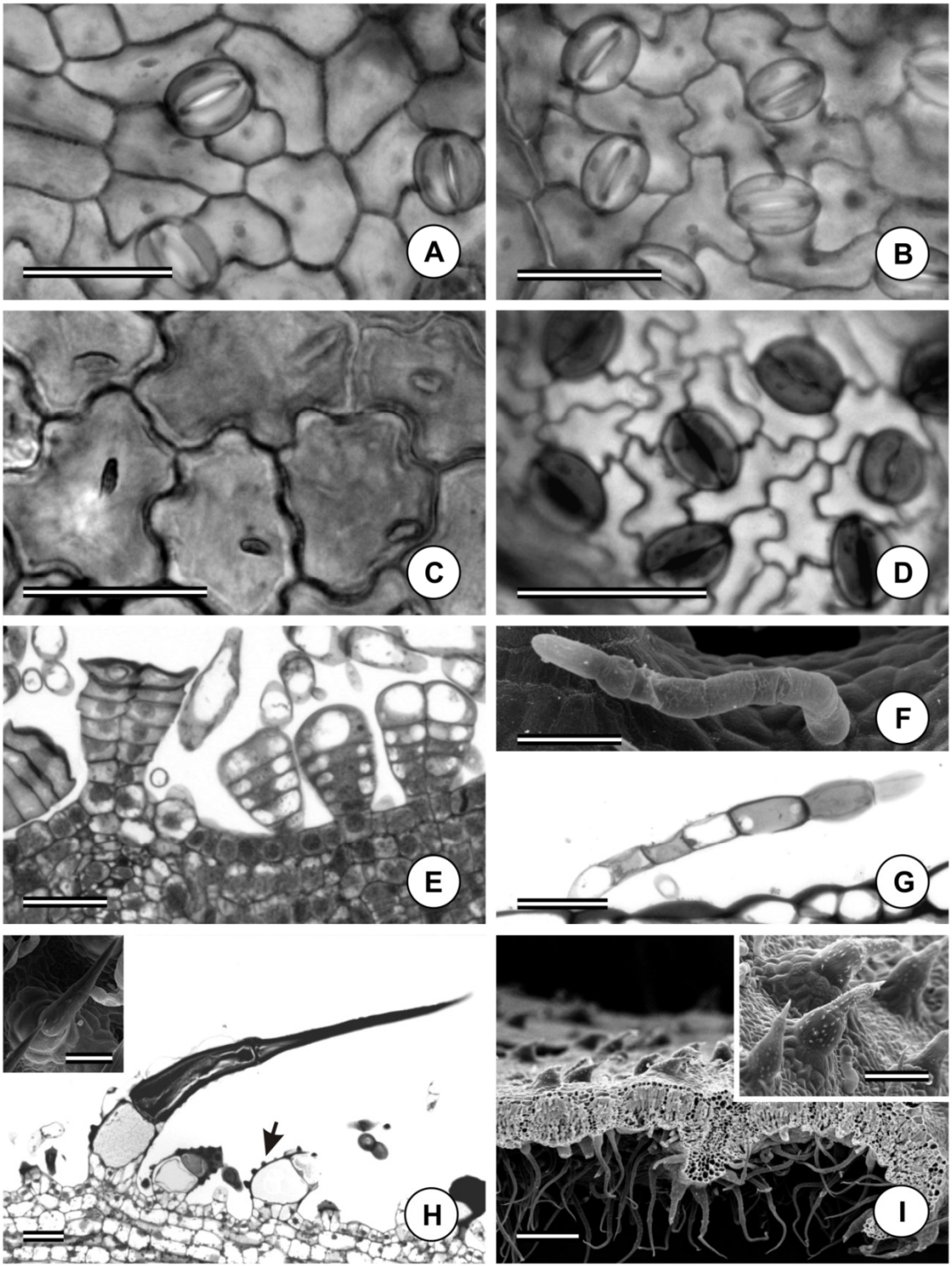

Figura 2.1 – Vista frontal da epiderme das faces foliares adaxial (A; C; detalhe em H; detalhe em I) e abaxial (B; D; F) de *Viguiera arenaria* Baker in Martius em microscopia de luz (A; B) e em microscopia eletrônica de varredura (detalhe em H) e *Viguiera robusta* Gardner in Hook em microscopia de luz (C; D) e em microscopia eletrônica de varredura (F; detalhe em I). Secções transversais da lâmina foliar de *V. robusta* (E; H; I) e *V. arenaria* (G). Seta em H indica ornamentações parietais do tipo bossa. Barras: A-E, G-I = 50 µm; F = 100 µm

Um dos tricomas glandulares é bisseriado, capitado, com 12 a 14 células (Figura 2.1E). A cabeça é formada por 10 células, tendo as distais conteúdo de aspecto denso e a secreção, de natureza lipofílica, acumula-se no espaço subcuticular. Este tricoma ocorre apenas na face abaxial sendo que, em *V. robusta*, distribui-se por toda a superfície, enquanto em *V. arenaria* estão concentrados principalmente nas regiões do bordo e ápice foliar. Esse tricoma corresponde ao tipo VI na classificação proposta por Castro, Leitão-Filho e Monteiro (1997). O outro tricoma glandular corresponde ao tipo II na classificação destes autores. O tricoma é unisseriado, filamentoso, recurvado ou não, e pode apresentar um número variável de células, sendo a célula distal em geral de formato globóide a espatulado (Figuras 2.1F e G). Em *V. arenaria* e *V. robusta* este tricoma ocorre em ambas as faces da folha.

O tricoma tector é pluricelular com base formada por número variável de células com disposição radiada, as quais podem formar um pedestal (Figura 2.1H). Sobre a base há três células formando uma única série cujas paredes são ornamentadas por estruturas verrucosas de natureza péctica (Figura 2.1H), denominadas bossas por Payne, (1978). A célula inferior é curta e dilatada enquanto a célula apical é pontiaguda podendo ser curta ou alongada (Figura 2.1I, detalhe). Nas folhas jovens estes tricomas acumulam mucilagem (Figura 2.1H). Em *V. arenaria* e *V. robusta* os tricomas ocorrem em ambas as faces da folha, porém em *V. robusta* estes são mais alongados na face abaxial (Figura 2.1I).

Na região mediana da lâmina foliar *Viguiera arenaria* e *V. robusta* a epiderme é uniestratificada, sendo as células da face adaxial mais volumosas que as da face abaxial, principalmente em *V. robusta* (Figuras 2.2A e C). Em ambas as espécies as paredes periclinais externas são espessadas em pectina. *Viguiera arenaria* é anfiestomática e os estômatos da face abaxial são projetados acima das demais células epidérmicas (Figura 2.2A). Em *V. robusta* os estômatos também são projetados, porém estes são restritos à face abaxial, pois essa espécie é hipoestomática (Figura 2.2C).

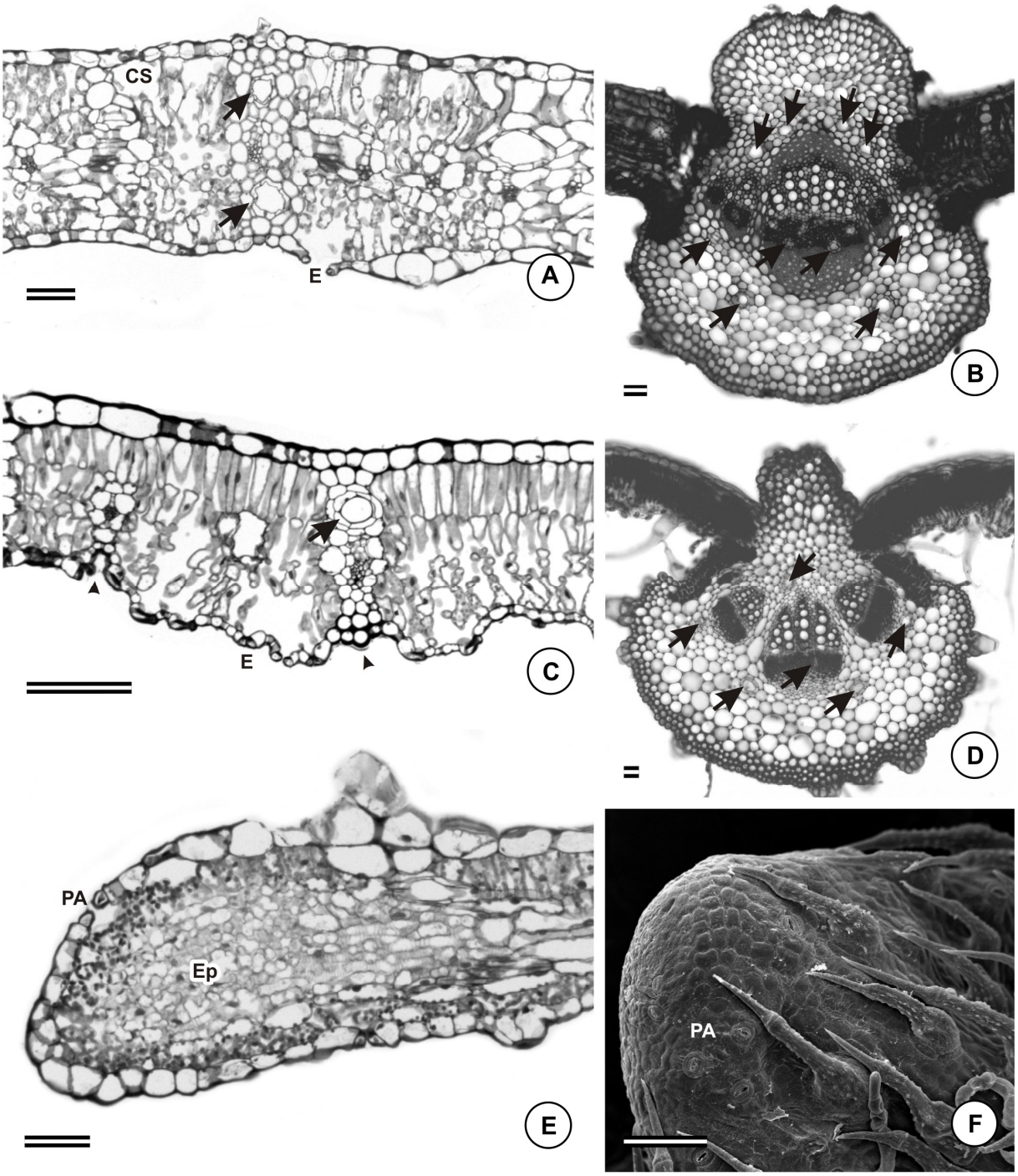

Figura 2.2 – Secções transversais da lâmina foliar de *Viguiera arenaria* Baker in Martius (A; B; E) e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (C; D), em microscopia de luz. F. Elétron-micrografia de varredura do ápice foliar de *V. robusta* evidenciando o hidatódio. Setas em A-D indicam canais secretores; pontas de seta em C indicam reentrâncias da epiderme da face abaxial da folha. E = estômato; Cs = câmara subestomática; PA = poro aquífero; Ep = epitema. Barras: A-E = 50 µm; F = 100 µm

A epiderme da face abaxial de *V. robusta* apresenta reentrâncias, as quais são correspondentes às regiões das nervuras (Figura 2.2C).

O mesofilo de ambas as espécies é do tipo heterogêneo dorsiventral (Figuras 2.2A e C) e as suas células apresentam gotas de natureza lipofílica. Em *V. arenaria* ocorrem três camadas de parênquima paliçádico interrompidas pelas câmaras subestomáticas (Figura 2.2A). Em *V. robusta* o parênquima paliçádico é composto por duas camadas de células. Na primeira camada as células são alongadas e justapostas, enquanto as células da segunda camada são mais curtas e possuem o arranjo mais frouxo (Figura 2.2C).

Na nervura central a epiderme é uniestratificada e apresenta tricomas. O colênquima é angular em ambas as faces da lâmina e a vascularização difere nas duas espécies (Figuras 2.2B e D). Em *V. arenaria* há um feixe colateral maior ladeado por um a dois feixes menores. Todos os feixes apresentam uma calota de fibras voltada para o floema, sendo que no feixe maior há fibras também voltadas para o xilema (Figura 2.2B). Em *V. robusta* há três feixes colaterais de tamanhos similares ou não, desprovidos de calotas de fibras (Figura 2.2D). Em ambas as espécies há canais secretores no floema primário (Figuras 2.2B e D), porém esses são mais evidentes e em maior número em *V. arenaria* (Figura 2.2B). Os feixes vasculares ficam imersos no parênquima fundamental, o qual apresenta quatro canais secretores voltados para a face abaxial (Figuras 2.2B e D). Na face adaxial há quatro canais em *V. arenaria* (Figura 2.2B), enquanto em *V. robusta* há apenas um (Figura 2.2D). Todos os canais presentes na nervura central secretam substâncias de natureza lipofílica.

Em *V. arenaria* e *V. robusta* os feixes laterais são do tipo colateral e podem apresentar extensão de bainha. Em *V. arenaria* as células da extensão da bainha do feixe, em geral, possuem paredes lignificadas e entre estas ocorrem canais secretores de óleos essenciais nas regiões voltadas tanto para a epiderme da face adaxial quanto abaxial (Figura 2.2A). Em *V. robusta* as células da extensão da bainha do feixe não possuem paredes lignificadas e os canais secretores localizam-se apenas entre as células voltadas para a face adaxial (Figura 2.2C).

Em *V. arenaria* e *V. robusta* ocorrem hidatódios tanto nas regiões de ornamentações do bordo foliar quanto no ápice (Figuras 2.2E e F). Estas estruturas

caracterizam-se pela presença de poros aquíferos semelhantes a estômatos, epitema, e elementos condutores exclusivamente xilemáticos e bainha parenquimática incompleta (Figura 2.2E).

2.3.2 Anatomia do caule aéreo

O caule jovem de *Viguiera arenaria* e *V. robusta* é revestido pela epiderme uniestratificada (Figuras 2.3A e B). Em *V. arenaria* ocorrem tricomas dos três tipos observados nas folhas (Figura 2.3C), enquanto em *V. robusta* não é observado o tricoma do tipo VI. O tricoma tector, em ambas as espécies, pode ser formado por até oito células encimadas no pedestal (Figura 2.3C).

A região cortical é constituída por colênquima (Figuras 2.3A e B), parênquima com canais secretores (Figura 2.3D) e endoderme, a qual possui estrias de Caspary e acúmulo de amido (Figura 2.3D).

No cilindro vascular as fibras das calotas opostas ao floema primário ainda não estão diferenciadas (Figuras 2.3A e B). Os feixes são do tipo colateral aberto. Há canais secretores entre as células isodiamétricas da medula parenquimática (Figuras 2.3A e B). Em *V. robusta* os canais concentram-se na região perimedular (Figura 2.3B), porém em *V. arenaria* distribuem-se por toda a medula, inclusive no centro desta (Figura 2.3A).

Os canais observados no caule são de origem esquizógena e o exsudato é de natureza lipofílica.

Durante o espessamento caulinar apenas em *V. arenaria* há instalação do felogênio, na camada subepidérmica (Figura 2.3E). Em ambas as espécies observa-se o alongamento periclinal das células do parênquima cortical (Figura 2.3E). Nas células da endoderme opostas às calotas de fibras pericíclicas ocorrem espessamentos parietais pouco conspícuos em suberina e o amido é consumido. No cilindro vascular as fibras pericíclicas já estão diferenciadas (Figuras 2.3E e F) e o floema primário apresenta canais secretores (Figura 2.3F). As porções fascicular e interfascicular do câmbio possuem atividades distintas. A porção fascicular produz floema e xilema secundários com todos os elementos do sistema axial, além de raios (Figura 2.3E).

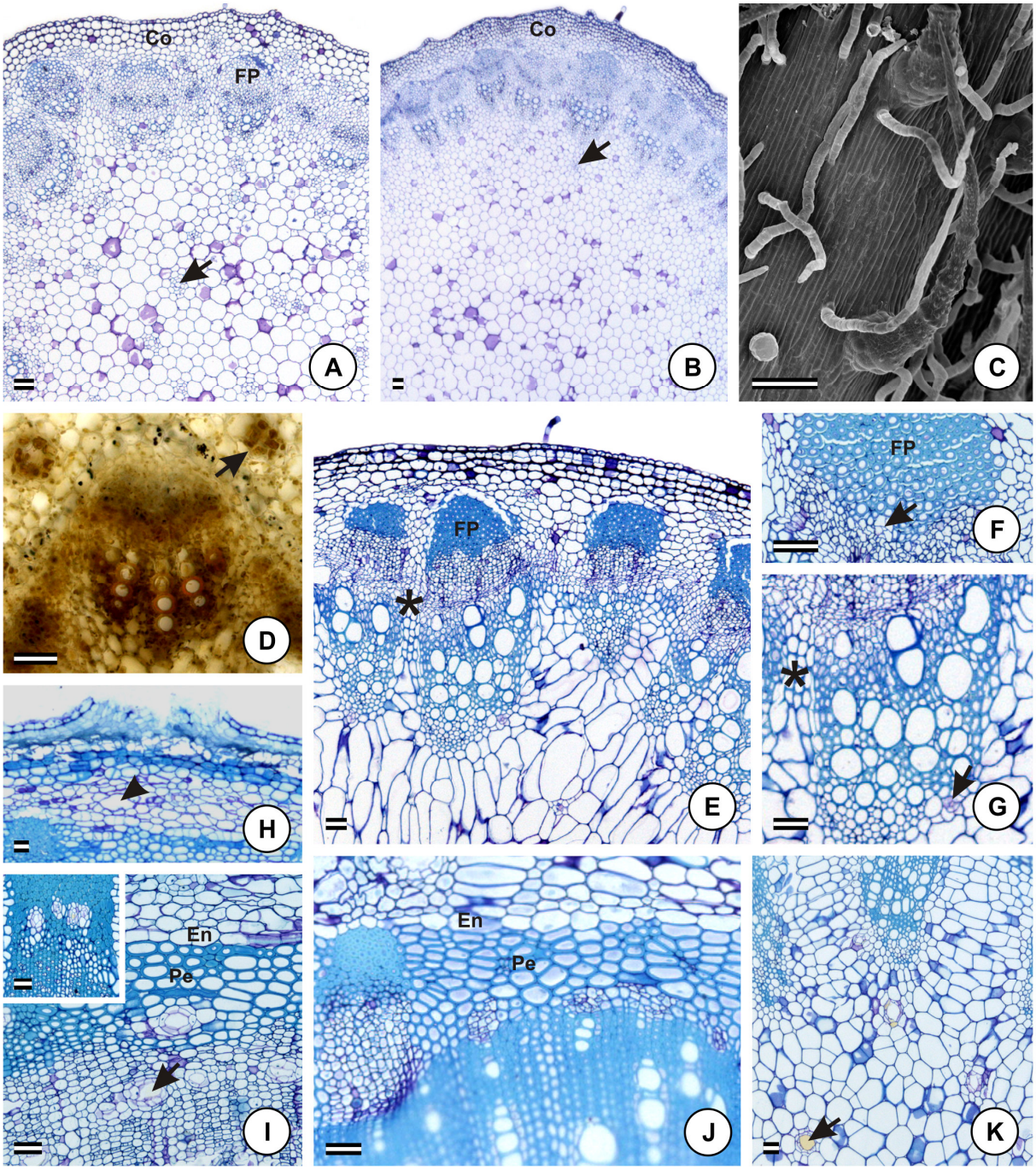

Figura 2.3 – Secções transversais do caule aéreo de *Viguiera arenaria* Baker in Martius (A; E; G; H; I) e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (B; D; F; J; K) em microscopia de luz. C. Elétron-micrografia do caule aéreo de *V. arenaria* mostrando os três tipos de tricoma. Setas em A; B; K indicam canais secretores na medula. Seta em D indica canal secretor cortical. Seta em F indica canal secretor do floema primário. Seta em G indica canal secretor formado no parênquima do feixe vascular. Ponta de seta em H indica espaços intercelulares corticais. Seta em I indica canal secretor do floema secundário. Co = córtex; FP = fibras pericíclicas; En = endoderme; Pe = periciclo; (*) = raio vascular. Barras: A; B; D-K = 50 µm; C = 100 µm

A porção interfascicular produz apenas raios cujas células podem lignificar (Figuras 2.3E e G). Na medula há o alongamento anticlinal das células na região perimedular (Figura 2.3E), posicionando os canais periféricos mais internamente e novos canais são formados no parênquima das proximidades do xilema dos feixes (Figura 2.3G).

No caule espessado de *V. arenaria* a epiderme é gradativamente substituída pela periderme com lenticelas (Figura 2.3H), enquanto no caule de *V. robusta* o revestimento é feito pela epiderme. Na região cortical ocorre a lignificação das células colenquimáticas em *V. arenaria* e a formação de espaços intercelulares no parênquima em ambas as espécies (Figura 2.3H). No cilindro vascular, as células do periciclo lignificam-se (Figuras 2.3I e J). Dada à lignificação do floema primário os canais secretores são observados entre as células esclerificadas em ambas as espécies (Figura 2.3I). Há a formação de canais secretores no floema secundário de *V. arenaria* (Figura 2.3I). Tais estruturas não foram observadas em *V. robusta* (Figura 2.3J). As células do parênquima interfascicular alongam-se no sentido periclinal afastando os feixes vasculares (Figura 2.3K). A medula parenquimática apresenta-se mais desenvolvida em função das divisões e do alongamento celular no sentido anticlinal em ambas as espécies (Figura 2.3K).

2.3.3 Anatomia do xilopódio

Viguiera arenaria e *V. robusta* possuem xilopódio lenhoso do qual partem raízes adventícias tuberosas (Figura 2.4A). O xilopódio ocorre nas camadas superficiais do solo e apresenta gemas, muitas delas axilares (Figura 2.4B) as quais correspondem às gemas presentes nas bases de ramos emitidos em períodos anteriores do desenvolvimento. Tais ramos se fundem gradativamente, num processo de auto-enxertia (Figura 2.4C), o qual é responsável pela estrutura complexa observada no xilopódio. O revestimento é feito em alguns setores pela epiderme (Figuras 2.4D e E) e, em outros, por células de paredes suberizadas formadas a partir de divisões periclinais das células subepidérmicas (Figura 2.4F).

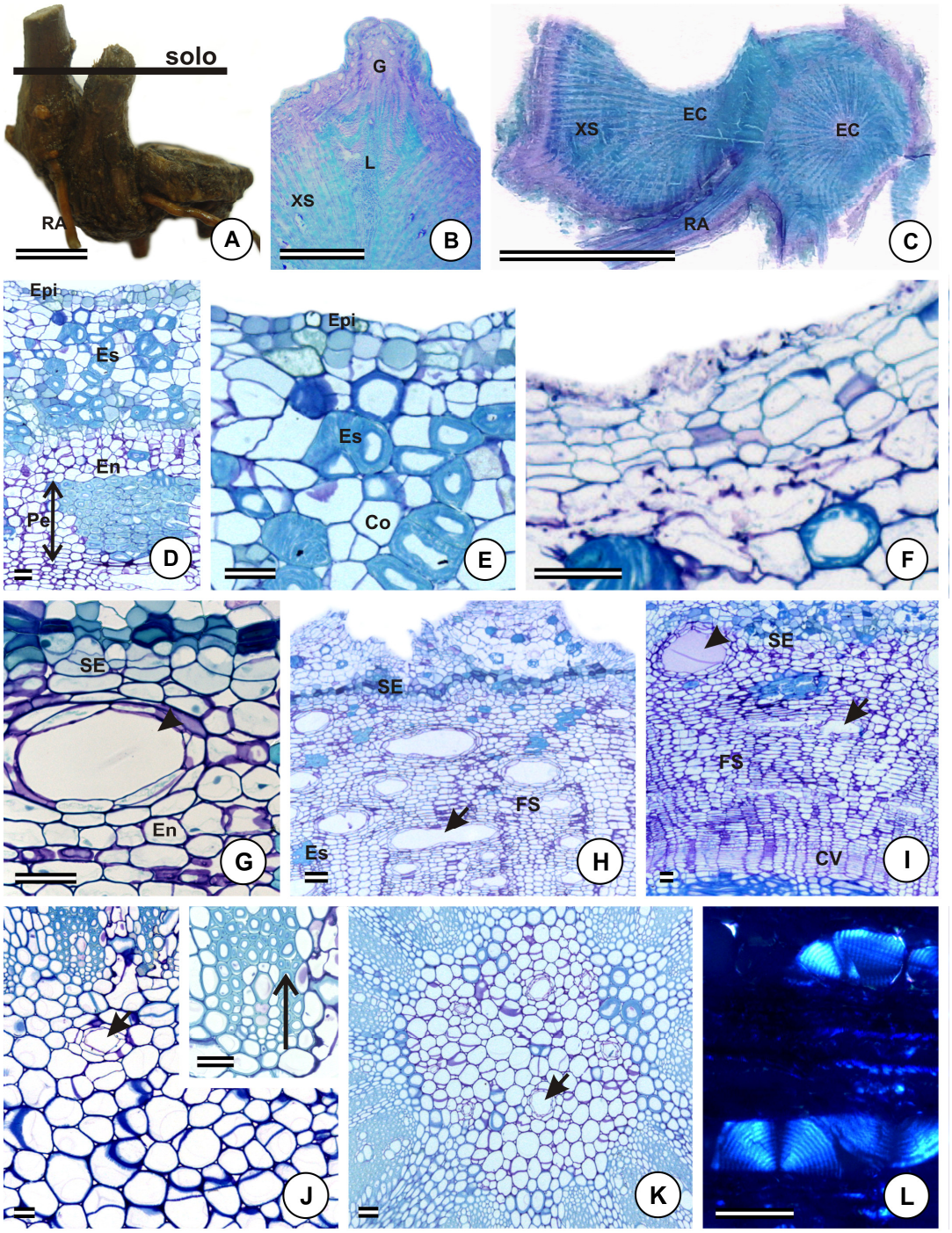

Figura 2.4 – Xilopódio de *Viguiera arenaria* Baker in Martius (A; B; F-H; K; L) e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (C-E; I; J). A. Morfologia externa. B-K. Secções transversais em microscopia de luz. L. Secção transversal em microscopia de luz polarizada. Seta em D indica o periciclo. Pontas de seta em G e I indicam cavidades secretoras. Setas em H-K indicam canais secretores. Seta no detalhe de J indica maturação centrífuga do xilema secundário. RA = raiz adventícias; G = gema; L = lacuna; X = xilema secundário; EC = eixo caulinar; Epi = epiderme; En = endoderme; Pe = periciclo; Co = córtex; SE = súber estratificado; FS = floema secundário; Es = esclereides; CV = câmbio vascular; Barras: A; C = 1cm; B = 0,25 cm; D-G; I; L = 50 µm; H; K = 100 µm

Entre as células do parênquima cortical há cavidades secretoras de substâncias lipofílicas (Figura 2.4G) e esclereides (Figuras 2.4D e E).

Nas últimas camadas do córtex observam-se, em alguns setores, divisões periclinais de células parenquimáticas adjacentes formando estratos (Figuras 2.4G e H), semelhantes a um súber estratificado. As células resultantes dessas divisões possuem paredes suberizadas e conteúdo lipofílico. Em algumas amostras foi possível verificar que tais células revestirão o órgão após a eliminação da epiderme e do restante do parênquima cortical (Figura 2.4H). A endoderme (Figura 2.4G) apresenta estrias de Caspary. No cilindro vascular o periciclo possui várias camadas de células sendo que há grupos de fibras em alguns setores (Figuras 2.4D). O floema secundário apresenta agrupamentos de esclereides em *V. arenaria* (Figura 2.4H) e canais secretores de substâncias lipofílicas em ambas as espécies, os quais são mais evidentes em *V. arenaria* (Figura 2.4H). Canais contíguos podem se unir, formando estruturas com o lume amplo. Na porção floemática os raios vasculares se ampliam. O xilema secundário ocupa a maior porção do xilopódio (Figura 2.4C) e o xilema primário apresenta maturação centrífuga (Figura 2.4J), a qual confirma a estrutura caulinar do xilopódio. No centro da estrutura a medula parenquimática possui canais secretores (Figuras 2.4J e K). Assim como na estrutura do caule aéreo, em *V. robusta* os canais são restritos à porção perimedular (Figura 2.4J) enquanto em *V. arenaria* estão distribuídos por toda a medula (Figura 2.4K). São observados frutanos do tipo inulina no cilindro vascular. Estes ocorrem no interior de células parenquimáticas, no lume dos canais floemáticos (Figura 2.4L), bem como no interior de elementos de vaso.

2.3.4 Anatomia da raiz

O sistema radicular de *Viguiera arenaria* e *V. robusta* é formado por raízes adventícias, as quais têm origem a partir do xilopódio.

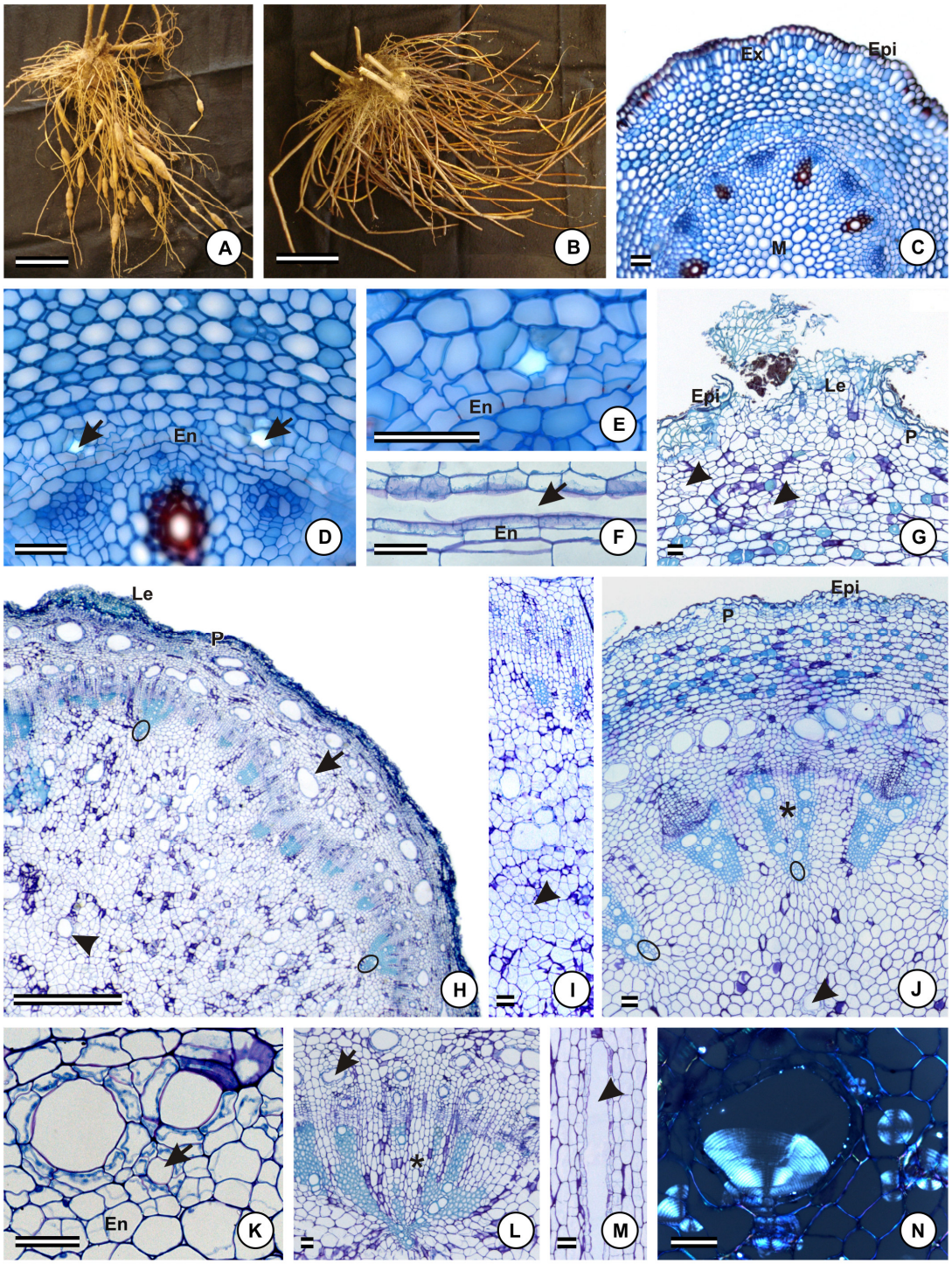

Figura 2.5 – Sistema subterrâneo de *Viguiera arenaria* Baker in Martius (A) e *V. robusta* Gardner in Hook (B). Secções transversais da raiz adventícia de *V. robusta* (C-E; G; J; K) e *V. arenaria* (H; I; L; N). Secções longitudinais das raízes de *V. arenaria* (F) e *V. robusta* (L). Setas em D, F, H, K e L indicam canais secretores. Pontas de seta em G, H, J e M indicam cavidades secretoras, sendo tubulares na medula de *V. robusta* (M). Ponta de seta em I indica divisões na medula. Os círculos em H e em J correspondem aos pólos de protoxilema. Epi = epiderme; Ex = exoderme; En = endoderme; Le = lenticela; P = periderme; (*) = raio vascular. Barras: A; B = 10 cm; C-G; I; J; M = 50 µm; H = 500 µm; I; K; L = 100 µm

Em *Viguiera arenaria* tais raízes apresentam porções tuberizadas e não tuberizadas (Figura 2.5A) enquanto em *V. robusta* a tuberização é discreta e uniforme (Figura 2.5B).

Em *V. arenaria* na mesma raiz as porções não tuberizadas apresentam estrutura primária enquanto as tuberizadas possuem estrutura secundária. Também em *V. robusta* as raízes tuberizadas apresentam estrutura secundária, sendo possível observar a estrutura primária apenas nas raízes que ainda não tuberizaram.

Em estrutura primária *V. arenaria* e *V. robusta* possuem epiderme uniestratificada (Figura 2.5C). O córtex apresenta exoderme com uma camada de células alongadas anticlinalmente (Figura 2.5C), cerca de nove camadas de parênquima com células isodiamétricas (Figuras 2.5C e D) e endoderme com estrias de Caspary (Figuras 2.5E e F). Há canais secretores de substâncias lipofílicas, os quais têm origem a partir de divisões periclinais de células endodérmicas (Figuras 2.5E e F). As células-filhas, que delimitam o lume dos canais, podem apresentar divisões periclinais e anticlinais, não sendo possível definir o número de células que compõem o epitélio destas estruturas (Figura 2.5E). Em *V. robusta* os canais estão posicionados apenas nas regiões opostas ao floema primário (Figura 2.5D), enquanto em *V. arenaria* ocorrem ao redor de todo o cilindro vascular. O cilindro vascular possui periciclo com uma camada de células (Figura 2.5D) e é oco, com medula parenquimática (Figura 2.5C).

Na estrutura secundária a periderme substitui gradativamente a epiderme nas raízes tuberosas de *V. arenaria* e *V. robusta* (Figuras 2.5G). Em ambas as espécies a periderme apresenta lenticelas (Figuras 2.5G e H) e tem origem a partir do felogênio, instalado na camada abaixo da exoderme. Tanto em *V. arenaria* quanto em *V. robusta* são observadas esclereides no córtex, porém estes são raros na primeira espécie (Figura 2.5H) e frequentes na segunda (Figuras 2.5J). São observadas cavidades posicionadas externamente aos canais endodérmicos, principalmente nas regiões abaixo das lenticelas (Figuras 2.5G). Estas estruturas têm origem no parênquima cortical durante o processo de tuberização radicular. Os canais previamente formados apresentam lume amplo e estão separados da endoderme por camadas de células parenquimáticas (Figura 2.5K), resultantes de divisões durante a tuberização. Além disso, novos canais são formados a partir de divisões da endoderme (Figura 2.5K). No

cilindro vascular as porções cambiais de origem procambial e pericíclica apresentam atividades distintas. A porção de origem pericíclica produz apenas raios (Figuras 2.5J e L). A porção de origem procambial por sua vez produz todos os elementos do sistema axial, além de raios (Figuras 2.5H, I e L). Em *V. arenaria* a porção do câmbio de origem procambial é mais extensa (Figura 2.5H), posicionando as estruturas vasculares primárias mais distantes entre si. O floema secundário apresenta canais, os quais são mais evidentes em *V. arenaria* (Figura 2.5H) e podem se unir formando estruturas com lume amplo. Tanto em *V. arenaria* quanto em *V. robusta* são observadas cavidades secretoras de substâncias lipofílicas na medula (Figuras 2.5H-J). Tais estruturas são menos frequentes em *V. robusta* e apresentam-se mais alongadas no sentido longitudinal do órgão (Figura 2.5M). Tanto em *V. arenaria* quanto em *V. robusta* a tuberização radicular é devida principalmente à hipertrofia e divisões das células da medula, sendo pequena a contribuição do câmbio neste processo (Figuras 2.5H-J). Em *V. arenaria*, as divisões celulares são mais intensas (Figura 2.5I) resultando em estruturas com tuberização mais acentuada (Figura 2.5A).

Em *V. arenaria* e *V. robusta* são observados cristais de inulina no córtex e no cilindro vascular. Estes ocorrem no interior de células parenquimáticas, principalmente do parênquima xilemático, no interior de elementos de vaso, além de no lume dos canais secretores (Figura 2.5N).

Tabela 2.1 – Resumo dos caracteres distintivos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook

Órgão	Caracter	*Viguiera arenaria*	*Viguera robusta*
Folha	Epiderme da face abaxial	Sem reentrâncias	Com reentrâncias
	Posição dos estômatos	Anfiestomática	Hipoestomática
	Ocorrência do tricoma glandular do tipo VI na face abaxial	Bordo e ápice	Em toda a lâmina
	Canais secretores nas extensões das bainhas dos feixes	Nas extensões voltadas para ambas as faces	Apenas na extensão voltada para a face adaxial
Caule aéreo	Distribuição dos canais secretores na medula	Por toda a estrutura	Perimedulares
	Lignificação das células colenquimáticas	Presente	Ausente
	Canais secretores no floema secundário	Presentes	Ausentes
Xilopódio	Canais secretores no floema secundário	Mais evidentes	Menos evidentes
	Distribuição de canais secretores na medula	Por toda a estrutura	Perimedulares
Raiz adventícia	Posição dos canais secretores de origem endodérmica	Ao longo de toda a endoderme	Opostos ao floema primário
	Ocorrência de esclereídes no córtex da estrutura secundária	Esporádica	Frequente
	Cavidades da medula	Isodiamétricas	Alongadas longitudinalmente

2.4 Discussão

A utilização de caracteres epidérmicos foliares tem sido de grande importância na taxonomia de espécies de Asteraceae (ADEDEJI; JEWOOLA, 2008). Os tipos de estômatos presentes na família, segundo Metcalfe e Chalk (1979), são anomocítico e anisocítico. Estudos como os de Alves e Neves (2003), Melo-de-Pinna (2004), Aguilera, Meira e Ferreira (2004), Milan, Hayashi e Appezzato-da-Glória (2006), Martins et al. (2006), Gregio e Moscheta (2006) e Budel e Duarte (2007) demonstraram que o tipo mais comum é o anomocítico, observado em *V. arenaria* e *V. robusta*.

Embora tais espécies possuam o mesmo tipo estomático, a posição destes pode ser utilizada como caracter diagnóstico em materiais herborizados, já que *V. arenaria* é anfiestomática enquanto *V. robusta* é hipoestomática.

Segundo Solereder (1908) e Metcalfe e Chalk (1979), os tipos, bem como a posição de estruturas secretoras no corpo vegetal, além da natureza do material secretado, são caracteres de valor diagnóstico entre grupos, permitindo o reconhecimento inclusive de espécies. Castro, Leitão-Filho e Monteiro (1997) propuseram uma chave de identificação de gêneros da família Asteraceae, dentre eles *Viguiera* Kunth, com base no tipo e posição de estruturas secretoras foliares. Tais caracteres também podem ser utilizados na distinção entre *V. arenaria* e *V. robusta*, considerando-se a ocorrência do tricoma do tipo VI e a presença dos canais secretores nas extensões das bainhas dos feixes.

Tanto *V. arenaria* quanto *V. robusta* apresentam hidatódios nas ornamentações do bordo e no ápice das folhas, assim como observado em outras espécies de Asteraceae por Lersten e Curtis (1985), Castro, Leitão-Filho e Monteiro (1997) e Milan, Hayashi e Appezzato-da-Glória (2006). Segundo Fahn (1979) tais estruturas estão relacionadas ao processo de gutação, o qual ocorre sob condições de capacidade de campo do solo e alta umidade relativa do ar, quando a taxa transpiratória é reduzida e a pressão radicular torna-se responsável pelo fluxo de água e sais das raízes até as folhas (STOCKING, 1956; FEILD et al., 2005). Embora o sistema subterrâneo de *V. arenaria* e *V. robusta* ocorra nas camadas superficiais do solo de ambientes de Cerrado, as quais apresentam menor disponibilidade hídrica, a presença dos órgãos aéreos e consequentemente dos hidatódios é coincidente com os períodos alta precipitação e umidade relativa do ar, condições ideais para a gutação. Durante os períodos de seca os indivíduos encontram-se na fase de dormência, quando ocorre a senescência dos órgãos aéreos.

A ocorrência de canais e cavidades secretores de substâncias lipofílicas é comum em órgãos vegetativos de espécies de Asteraceae e foi relatada por Solereder (1908), Fahn (1979), Lersten e Curtis (1986, 1988, 1989), Lotocka e Geszprych (2004), Milan, Hayashi e Appezzato-da-Glória (2006), Del-Vechio-Vieira et al. (2008), Appezzato-da-Glória et al. (2008b), Cury e Appezzato-da-Glória (2009) e Fritz e Saukel

(2011). Em *V. arenaria* e *V. robusta* tais estruturas secretam óleos essenciais e, enquanto os canais estão distribuídos por todos os órgãos vegetativos, as cavidades ocorrem apenas nos órgãos subterrâneos. Segundo Fahn (1979) os terpenos, componentes majoritários dos óleos essenciais, são secretados por tricomas e, ou canais, tendo os últimos origem a partir do meristema fundamental e, ou cambial. Em estrutura primária o caule aéreo de *V. arenaria* e *V. robusta* possui canais tanto corticais quanto no cilindro vascular (floema primário), evidenciando sua origem procambial.

Solereder (1908) ressalta que a ocorrência de canais secretores em tecidos secundários deve ser restrita aos órgãos subterrâneos. Em *V. arenaria*, porém tais estruturas ocorrem tanto no floema secundário do caule aéreo quanto dos órgãos subterrâneos. O autor destaca também que a ocorrência de canais na medula caulinar é restrita à periferia da estrutura. A posição perimedular destas estruturas em *V. robusta* corrobora tal padrão, porém em *V. arenaria* os canais estão distribuídos por toda a medula. A ocorrência de tais estruturas no floema secundário bem como em toda a extensão da medula parenquimática do caule aéreo apenas em *V. arenaria* pode ser utilizada como caráter diagnóstico entre esta e *V. robusta*.

Em órgãos subterrâneos de Asteraceae, em geral, ocorrem estruturas secretoras próximas à endoderme (SOLEREDER, 1908; MELO-DE-PINNA; MENEZES, 2003; MACHADO et al., 2004; LOTOCKA; GESZPRYCH, 2004; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008b; CURY; APPEZZATO-DA-GLÓRIA 2009; FRITZ; SAUKEL, 2011), as quais podem ser do tipo canal, cavidade ou células da própria endoderme. Segundo Solereder (1908), Lotocka e Geszprych (2004) e Fritz e Saukel (2011), tais canais e cavidades têm origem a partir de divisões da camada endodérmica e são formados posteriormente por esquizogenia. Appezzato-da-Glória et al. (2008b) e Cury e Appezzato-da-Glória (2009) relataram a ocorrência de canais e cavidades corticais em xilopódios e raízes de espécies de Asteraceae. Segundo as autoras o epitélio de tais estruturas é composto por células parenquimáticas e endodérmicas e, nas raízes, os canais posicionam-se opostos ao floema primário. No xilopódio de *V. arenaria* e *V. robusta* foram observadas cavidades próximas à endoderme, porém tal tecido não delimita o lume das estruturas secretoras. Nas raízes, o lume dos canais é delimitado por células do parênquima cortical e por células derivadas da endoderme. Tais canais,

porém, não foram considerados endodérmicos, como os classificados por Tetley (1925), já que o lume não é delimitado pela endoderme, e sim por derivadas desta. Em *V. robusta* os canais são opostos ao floema primário, enquanto em *V. arenaria* ocorrem ao redor de todo o cilindro vascular.

Na estrutura secundária das raízes de *V. arenaria* e *V. robusta* são observadas cavidades secretoras provenientes de divisões e separação de células parenquimáticas tanto no córtex quanto na medula. Cury e Appezzato-da-Glória (2009) relataram a origem similar de cavidades corticais em raízes de *Pterocaulon alopecuroides*. Nessa espécie, segundo as autoras, cavidades contíguas podem se unir formando estruturas alongadas longitudinalmente. Tal comportamento não foi observado em *V. arenaria* e *V. robusta*. As cavidades observadas na medula parenquimática de *V. robusta* são alongadas anticlinalmente, porém tais estruturas são mais curtas do que os canais, não constituindo uma estrutura contínua ao longo do órgão. Lersten e Curtis (1986) descreveram estruturas corticais semelhantes em raízes de *Eupatorium rugosum* e denominaram-nas cavidades tubulares.

O órgão subterrâneo espessado de *V. arenaria* e *V. robusta*, o qual é do tipo xilopódio, apresenta estrutura anatômica caulinar e gemas axilares. Este foi descrito pela primeira vez por Lindman (1906) e pode apresentar estrutura caulinar, radicular ou ambas (VILHALVA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006; HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2007; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008a; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CURY, 2011). O revestimento secundário do xilopódio de *V. arenaria* e *V. robusta* é constituído por estratos celulares cujas paredes são suberizadas e têm origem a partir de divisões periclinais de células adjacentes no parênquima cortical. Angyalossy (2006) observou revestimento semelhante no caule de *Eucalyptus paniculata* e comparou-o ao súber estratificado presente em monocotiledôneas. Embora tal revestimento não seja tão desenvolvido como o observado em espécies de monocotiledôneas, a utilização do termo súber estratificado é apropriada para definir o revestimento do xilopódio de *V. arenaria* e *V. robusta*. Segundo Fidelis, Appezzato-da-Glória e Pfadenhauer (2009) a principal função do xilopódio está relacionada ao seu potencial gemífero, o qual foi destacado por Vilhalva e Appezzato-da-Glória (2006), Alonso e Machado (2007), Appezzato-da-Glória et al. (2008a) e Appezzato-da-Glória e

Cury (2011). Tais estruturas bem como outros órgãos gemíferos compõem um banco de gemas subterrâneo, o qual influencia diretamente a dinâmica dos estratos herbáceos e subarbustivos do Cerrado, com a formação de novos ramos após a passagem de fogo e seca prolongada (APPEZZATO DA GLÓRIA et al., 2008a).

O processo de tuberização radicular de *V. arenaria* e *V. robusta* é resultante principalmente de divisões parenquimáticas da medula, as quais são mais intensas em *V. arenaria*, sendo pequena a contribuição do câmbio vascular. Artschwager (1918) e Hayward (1953) descreveram comportamento semelhante durante o crescimento secundário do tubérculo de *Solanum tuberosum*. Segundo tais autores o desenvolvimento do parênquima medular, bem como a instalação do felogênio nas camadas subepidérmicas, com consequente manutenção do córtex, estaria relacionado ao acúmulo de reserva por estes órgãos subterrâneos (SOLEREDER, 1908).

Tanto o xilopódio quanto as raízes tuberosas de *V. arenaria* e *V. robusta* acumulam frutanos do tipo inulina. Segundo Solereder (1908) tais compostos são característicos de espécies de Asteraceae, e já foi relatado para o gênero *Viguiera* Kunth por Isejima, Figueiredo-Ribeiro e Zaidan (1991), Tertuliano e Figueiredo-Ribeiro (1993), Itaya, Figueiredo-Ribeiro e Buckeridge (1999) e Van den Ende et al. (2005), bem como para outras espécies de Asteraceae do Cerrado por Vilhalva e Appezzato-da-Glória (2006), Portes e Carvalho (2006), Hayashi e Appezzato-da-Glória (2007), Appezzato-da-Glória et al. (2008a), Vilhalva et al. (2011), Appezzato-da-Glória e Cury (2011). Estudos demonstraram que os frutanos estão relacionados tanto com o provimento de energia para a formação dos órgãos aéreos entre os períodos de dormência e floração, quanto com a resistência dos indivíduos a condições de estresse, como a baixa disponibilidade hídrica nos períodos de dormência. Segundo Carvalho e Dietrich (1993) a variação na concentração de frutanos nos órgãos subterrâneos de *Vernonia herbacea* está relacionada ao comportamento sazonal desta espécie, característico também de *V. arenaria* e *V. robusta*. Durante a fase de floração a concentração de tais compostos é aumentada devido à presença dos órgãos fotossintetizantes, bem como de alta luminosidade e disponibilidade hídrica. Com a senescência dos órgãos aéreos na fase de dormência, os frutanos são mobilizados

destes para o sistema subterrâneo, aumentando gradativamente a sua concentração nestas estruturas. Entre as fases de dormência e floração ocorre a queda da concentração destes compostos no sistema subterrâneo devida, possivelmente, à utilização destes como fonte de energia para a formação dos órgãos aéreos.

Para Isejima, Figueiredo-Ribeiro e Zaidan (1991) e Figueiredo-Ribeiro (1993) os frutanos acumulados nos órgãos subterrâneos durante a fase de dormência conferem resistência a estas estruturas sob condições de seca, característica dos períodos de outono e inverno no Cerrado. Segundo Vijn e Smeekens (1999) e Valluru e Van den Ende (2008) os frutanos mantêm a integridade estrutural e funcional dos lipídeos da membrana plasmática celular em plantas submetidas a condições de déficit hídrico. Além disso, por serem moléculas osmoticamente ativas, os frutanos podem promover a queda do potencial hídrico no tecido xilemático, induzindo assim o fluxo de água do solo para o interior deste tecido (VALLURU; VAN DEN ENDE, 2008). Tal fenômeno explicaria a maior concentração destes compostos na região do xilema, inclusive no interior dos elementos de vaso, observada por Vilhalva et al. (2011) em *Campuloclinium chlorolepis* e no presente estudo em *V. arenaria* e *V. robusta*.

2.5 Conclusões

- As análises anatômicas permitiram a identificação de caracteres sólidos para a distinção entre *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta* em materiais já herborizados ou não;

- As espécies estudadas apresentam estruturas secretoras do tipo tricomas, canais e cavidades, cujo exsudato é de natureza lipofílica, caracterizada pela presença de óleos essenciais, conforme descrito no capítulo 3.

Referências

ADEDEJI, O.; JEWOOLA, O.A. Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v. 36, n. 2, p. 7-16, 2008.

AGUILERA, D.B.; MEIRA, R.M.S.A.; FERREIRA, F.A. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 483-489, 2004.

ALONSO, A.A.; MACHADO, S.R. Morphological and developmental investigations of the underground system of *Erythroxylum* species from Brazilian Cerrado. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 55, p. 749-758, 2007.

ALVES, V.F.G.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Revista Universidade Rural**, Itaguai, v. 22, n. 2, p. 1-8, 2003.

ANGYALOSSY, V. **O floema secundário em espécies arbóreas**. 2006. 135 p. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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, n. 3, p. 981-991, 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. **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.

ARTSCHWAGER, E.F. Anatomy of the potato plant, with special reference to the ontogeny of the vascular system. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 14, n. 6, p. 221-252, 1918.

BLAKE, S.F. A revision of the genus *Viguiera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, Cambridge, v. 51, p. 1-205, 1918.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R. Caracteres morfoanatômicos de partes vegetativas aéreas de *Baccharis coridifolia* DC. (Asteraceae-Astereae). **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 5, p. 723-731, 2007.

BURGER, L.M.; RICHTER, H.G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 154 p.

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

CASTRO, M.M.; LEITÃO-FILHO, H.F.; MONTEIRO, W.R. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 163-174, 1997.

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

DA COSTA, F.B.; SHORR, K.; ARAKAWA, N.S.; SHILLING, E.E.; SPRING, O. Infraspecific variation in the chemistry of glandular trichomes of two Brazilian *Viguiera* species (Heliantheae; Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 403-407, 2001.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 258, p. 1338-1340, 1964.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; BARBOSA, M.V.D.; LOPES, B.C.; SOUSA, O.V.; SANTIAGO-FERNANDES, L.D.R.; ESTEVES, R.L.; KAPLAN, M.A.C. Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, p. 769-776, 2008.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302 p.

FEILD, T.S.; SAGE, T.L.; CZERNIAK, C.; ILES, W.J.D. Hydathodal leaf teeth of *Chloranthus japonicas* (Chloranthaceae) prevent guttation-induced flooding of the mesophyll. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p.1179-1190, 2005.

FIDELIS, A.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; PFADENHAUER, J. A importância da biomassa e das estruturas subterrâneas nos campos sulinos. In: PILLAR, V.P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.S.; JACQUES, A.V.A. (Ed.). **Campos sulinos**: conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009. cap. 6, p. 88-100.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 203-208, 1993.

FRITZ, E.; SAUKEL, J. Secretory structures of subterranean organs of some species of the Cardueae, and their diagnostic value. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Krakow, v. 53, n. 1, p. 62-72, 2011.

GREGIO, S.J.D.; MOSCHETA, I.S. Anatomia de raiz, caule e folha e identificação de estruturas secretoras de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 327-334, 2006.

HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 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.

HAYWARD, H.E. **Estructura de las plantas utiles**. Buenos Aires: Acme, 1953. 667 p.

HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, Washington, v. 163, p. 817-818, 1969.

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

ITAYA, N.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BUCKERIDGE, M.S. Synthesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 435-442, 1999.

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

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 528 p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in eletron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

LERSTEN, N.R.; CURTIS, J.D. Distribution and anatomy of hydathodes in Asteraceae. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 146, n. 1, p. 106-114, 1985.

_____. Tubular cavities in white snakeroot, *Eupatorium rugosum* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 73, p. 1016–1021, 1986.

_____. Secretory reservoirs (ducts) of two kinds in giant ragweed (*Ambrosia trifida*; Asteraceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 75, p. 1313–1323, 1988.

_____. Foliar oil reservoir anatomy and distribution in *Solidago canadensis* (Asteraceae, tribe Astereae). **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 9, n. 3, p. 281-287, 1989.

LINDMAN C.A.M. **A vegetação do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Livraria Universal, 1906. 356 p.

LOTOCKA, B.; GESZPRYCH, A. Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 144, p. 207-233, 2004.

MACHADO, S.R.; OLIVIRA, D.M.T.; DIP, M.R.; MENEZES, N.L. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H.Robinson (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, p. 115-123, 2004.

MAGENTA, M.A.G. ***Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil**. 2006. 353 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAGENTA, M.A.G.; PIRANI, J.R.; MONDIN, C.A. Novos táxons e combinações em *Viguiera* (Asteraceae - Heliantheae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 1, p. 1-11, 2010.

MARTINS, L.R.R.; MOURÃO, K.S.M.; ALBIERO, A.L.M.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS-FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 42-52, 2006.

MELO-DE-PINNA, G.F.A. Anatomia foliar de *Richterago* Kuntze (Mutisieae, Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 18, n. 3, 591-600, 2004.

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

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**: systematic anatomy of leaf and stem with a brief history of the subject. Oxford: Claredon Press, 1979. v. 2, 294 p.

MILAN, P.; HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 135-144, 2006.

PANERO, J.L.; SCHILLING, E.E. Revision of *Viguiera* sect. Maculatae (Asteraceae: Heliantheae). **Systematic Botany**, Kent, v.13, p.371-406, 1988.

PAYNE, W.W. A glossary of plant hair terminology. **Brittonia**, Bronx, v. 30, n. 2, p. 239-255, 1978.

PORTES, M.T.; CARVALHO, M.A.M. Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different developmental phases. **Plant Science**, Amsterdam, v. 170, p. 624-633, 2006.

PORTO, T.S.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; MARTINS, C.H.G.; DA COSTA, F.B.; SEVERIANO, M.E.; SILVA, A.N.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial ent-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. **Fitoterapia**, Milano, v. 80, p. 432–436, 2009.

RAMAYYA, N. Studies on the trichomes of some Compositae I. General structure. **Bulletin Botanical Survey of India**, Calcutta, v. 4, p. 189-192, 1962.

SAKAI, W.S. Simple method for differential stainning of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-248, 1973.

SCHILLING, E.E.; PANERO, J.L. Evidence for a close relationship between *Iostephane* and *Viguiera* (Asteraceae-Heliantheae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 78, n. 8, p. 1054-1062, 1991.

_____. Phylogenetic reticulation in subtribe Helianthinae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 83, n. 7 p. 939-948, 1996.

SCHILLING, E.E.; DA COSTA, F.B.; LOPES, N.P.; HEISE, P.J. Brazilian species of *Viguiera* (Asteraceae) exhibit low levels of its sequence variation. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 57, n. 3, p. 323–332, 2000.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**: a handbook for laboratories of pure and applied botany. Oxford: Clarendon Press, 1908. v. 1, 1182 p.

STOCKING, R.C. Guttation and bleeding. In: RUHLAND, W. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: Springer Verlag, 1956, v. 3, p. 489-502.

STRASBURGER, E. **Handbook of practical botany**. London: George Allen, 1913. 527 p.

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

TETLEY, U. The secretory system of the roots of the Compositae. **New Phytologist**, Cambridge, v. 24, p. 138-162, 1925.

VALLURU, R.; VAN DEN ENDE, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 11, p. 2905-2916, 2008.

VAN DEN ENDE, W.; LAERE, A.V.; ROY, K.; VERGAUWEN, R.; BOOGAERTS, D.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; CARVALHO, M.A.M. Molecular cloning and characterization of a high DP fructan: fructan 1-fructosyl transferase from *Viguiera discolor* (Asteraceae) and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 125, p. 419-429, 2005.

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

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, n. 1, 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**, Melbourne, v. 59, p. 46-52, 2011.

ZAREH, M.M. Systematic and anatomical studies of Inuleae and Plucheeae in Egypt. **Feddes Repertorium**, Weinheim, v. 116, p. 43-53, 2005.

3 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Viguiera arenaria* BAKER IN MARTIUS E *Viguiera robusta* GARDNER IN HOOK

Resumo

Viguiera Kunth é um gênero exclusivamente americano e um dos mais representativos da família Asteraceae. Pouco se sabe acerca da sua utilização na medicina popular, porém estudos fitoquímicos têm demonstrado o potencial farmacológico de compostos como sesquiterpenos e diterpenos extraídos de espécies desse gênero. Dentre as espécies do gênero que mais se destacam no contexto fitoquímico são *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook. As duas espécies são aromáticas em campo e, em geral, confundidas em materiais herborizados. Seus representantes são ervas a subarbustos e apresentam desenvolvimento sazonal, com a presença dos órgãos vegetativos e reprodutivos aéreos durante os períodos de alta umidade e temperatura (fase de floração) e a senescência desses em períodos de seca e frio, quando permanecem apenas os órgãos vegetativos subterrâneos (fase de dormência). Em função do potencial aromático de *V. arenaria* e *V. robusta* objetivou-se realizar um estudo comparativo do óleos essenciais (OE's) dos órgãos vegetativos de ambas nas fases de floração e dormência. As amostras de *V. arenaria* foram coletadas na Estação Ecológica de Itirapina enquanto as de *V. robusta* na Reserva Biológica de Mogi Guaçu. A extração dos OE's foi realizada por hidrodestilação em sistema Clevenger a partir de amostras frescas de raízes, xilopódio, caule aéreo e folhas de ambas as espécies e a análise da composição química foi feita através de Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG/EM). Os resultados demonstraram que os OE's diferem quanto ao rendimento e composição química entre os órgãos vegetativos e entre as espécies estudadas, além de apresentarem variações entre as fases fenológicas. A ocorrência de compostos exclusivos nos OE's de *V. arenaria* e *V. robusta* pode ser usada como um caracter de distinção entre as espécies.

Palavras-chave: Asteraceae; *Viguiera* Kunth; Composição química; Quimiotaxonomia

Abstract

Viguiera Kunth is an exclusively American genus and one of the most representatives of the Asteraceae family. The knowledge about its use in the popular medicine is rare, but phytochemicals studies have shown the pharmacological potential of compounds such as sesquiterpenes and diterpenes extracted from species of this genus. Among the species of the genus that stand out in the phytochemical context are *Viguiera arenaria* Baker in Martius and *Viguiera robusta* Gardner in Hook. These two species are aromatic in the field and indistinguishable to herborized materials. Their representatives are herbs to subshrubs and have seasonal development, with the presence of vegetative and reproductive aerial organs during the periods of high humidity and temperature (flowering stage) and senescence of aerial organs in periods

of drought and cold, when only the vegetative underground organs remain (dormant phase). The aim of this study was to compare the essential oils (EO's) from the vegetative organs of both flowering and dormancy phases of *V. arenaria* and *V. robusta*. Samples of *V. arenaria* were collected at Itirapina Ecological Station and *V. robusta* were collected at Biological Reserve of Mogi Guaçu. The EO's was obtained by hydrodistillation in a Clevenger system from fresh samples of roots, xylopodium, aerial stem and leaves of both species, and chemical composition analysis were performed by GC/MS. The results showed that the EO's differ in yield and chemical composition among vegetative organs and between species, in addition they showed variations between the phenological phases. The occurrence of exclusive compounds in the EO's of *V. arenaria* and *V. robusta* can be used as a distinguishing character between species.

Keywords: Asteraceae, *Viguiera* Kunth, Chemical composition; Chemotaxonomy

3.1 Introdução

Viguiera Kunth é um gênero parafilético, exclusivamente americano e, com cerca de 180 espécies, é um dos mais representativos da família Asteraceae (BREMER, 1994; MAGENTA, 2006). Segundo Magenta (2006) seus representantes apresentam hábitos variados, desde ervas perenes ou anuais, arbustos e pequenas árvores.

Pouco se sabe a respeito da aplicação de espécies do gênero *Viguiera* na medicina popular. Nesse contexto destacam-se os trabalho de Canales et al. (2005) e Martínez et al. (2006). Os autores relataram a utilização de órgãos aéreos de *Viguiera dentata* por parturientes de populações mexicanas, além de sua aplicação em lesões causadas por picadas de formigas. Estudos fitoquímicos, no entanto têm destacado o potencial farmacológico de espécies de *Viguiera*, o qual é conferido pela biossíntese de compostos do metabolismo secundário, como terpenos. Taylor et al. (2008) ao estudarem lactonas sesquiterpênicas produzidas por *Viguiera sylvatica* relataram sua atividade anticâncer sobre linhagens de células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Canales et al. (2008) demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo essencial e a atividade antifúngica de diterpenos de *V. dentata*.

Além de auxiliar na elucidação do potencial farmacológico, estudos têm ressaltado a aplicabilidade de compostos como as lactonas sesquiterpênicas na filogenia e quimiotaxonomia do gênero *Viguiera* (SCHILLING et al., 2000; SPRING et

al., 2001; TIRAPELLI et al., 2004; AMBROSIO; SCHORR; DA COSTA, 2004; AMBRÓSIO et al., 2008).

Dentre as espécies de *Viguiera* que mais se destacam no contexto dos estudos fitoquímicos estão *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook. Em relação à *V. arenaria* a maior parte dos trabalhos demonstraram a atividade biológica de compostos radiculares. Ambrósio et al. (2008) relataram a eficiência da utilização de pimaranos no combate ao protozoário *Trypanosoma cruzi*. Tirapelli et al. (2004) e Hipólito et al. (2009) por sua vez demonstraram a ação vasodilatadora de diterpenos em ratos, enquanto a ação antimicrobiana de pimaranos sobre bactérias Gram-positivas foi relatada por Porto et al. (2009).

Os estudos fitoquímicos sobre *V. robusta* abordaram tanto o potencial farmacológico quanto quimiotaxonômico de seus compostos. Tirapelli et al. (2002) relataram a atividade inibidora do ácido caurenóico sobre a contração de carótidas em ratos. Valério et al. (2007) demonstraram a atividade antinflamatória e analgésica de lactonas sesquiterpênicas isoladas de folhas em experimentos realizados com ratos. Da Costa et al. (2001) ao comparar a composição química de secretados de tricomas glandulares de *V. robusta* classificaram-na como um táxon “quimioconsistente”, com um padrão químico similar entre diferentes populações.

Segundo Magenta (2006), *V. arenaria* e *V. robusta* são ervas a subarbustos com caule subterrâneo espessado e apresentam desenvolvimento sazonal. Esse desenvolvimento consiste na presença dos órgãos aéreos durante os períodos favoráveis de temperatura e umidade, quando as espécies florescem (fase de floração), e na senescência destes órgãos durante os períodos de seca e frio, quando permanecem apenas dos órgãos subterrâneos (fase de dormência). *V. arenaria* e *V. robusta* são facilmente confundidas em materiais herborizados, podendo ser separadas apenas com base em caracteres polínicos (MAGENTA, 2006). Ambas são fortemente aromáticas em campo (obs. pessoal), fato que pode estar ligado à presença de óleos essenciais.

Os óleos essenciais (OE’s) são misturas complexas de substâncias de baixo peso molecular, sendo em sua maioria mono e sesquiterpenos, além de fenilpropanóides. Em geral esses compostos desempenham importantes funções

ecológicas nas plantas (HARBONE; TURNER, 1984), estando relacionados a mecanismos de proteção contra microrganismos e herbívoros, atração de polinizadores, além de eventos de alelopatia (RYAN, 2001; WINK, 2009; ARIMURA; SHIOJIRI; KARBAN, 2010; CHAUVEAU et al., 2011). Dessa forma, a biossíntese e, consequentemente, a composição e rendimento dos OE's podem sofrer influência de fatores ambientais, sejam esses bióticos ou abióticos (MAROTTI; PICCAGLIA; GIOVANELLI, 1996; SANGWAN et al., 2001; DESCHAMPS et al., 2008). Neste contexto a composição química e o rendimento dos OE's podem apresentar variações entre órgãos de uma mesma planta e entre as fases fenológicas do desenvolvimento desta (MURARI et al., 2008; DESCHAMPS et al., 2008; STEFANELLO et al., 2010).

Embora os fatores ambientais possam influenciar a composição química e o rendimento OE's, alguns compostos são característicos de determinados grupos vegetais e podem, dessa forma, ser utilizados na quimiotaxonomia (GÖREN et al., 2002; CROTEAU et al., 2005). A ocorrência de alguns monoterpenos como α-pineno e β-pineno, por exemplo, é comum entre as angiospermas e a sua variação quantitativa pode constituir um caractere diagnóstico para a distinção entre espécies (HARBONE; TUNER, 1984).

Em função do potencial aromático de *V. arenaria* e *V. robusta*, objetivou-se realizar um estudo comparativo dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos de ambas, nas fases de floração e dormência, visando avaliar a composição química dos mesmos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material botânico

Para as análises quantitativas e qualitativas dos óleos essenciais (OE's) de *Viguiera arenaria* e *V. robusta* foram utilizadas amostras dos órgãos vegetativos de ambas as espécies nas fases de floração (folha, caule aéreo, xilopódio e raiz) e de dormência (xilopódio e raiz). As coletas de *V. arenaria* foram realizadas na Estação Ecológica de Itirapina (22°14'S e 47°51'W) enquanto as de *V. robusta* na Reserva

Biológica de Mogi Guaçu (Fazenda Campininha) (22°42'S e 47°37'W), ambas no estado de São Paulo. As exsicatas de *V. arenaria e V. robusta* foram incorporadas ao acervo do Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESA) da Universidade de São Paulo sob os números 111847 e 114255, respectivamente.

Folhas, caules aéreos, xilopódios e raízes foram separados entre si, embalados em jornais úmidos, acondicionados em sacos plásticos e mantidos em geladeira por dois dias até a extração dos OE's.

3.2.2 Obtenção dos óleos essenciais

A extração dos OE's foi realizada através do método de hidrodestilação por arraste a vapor em sistema do tipo Clevenger, sendo os sistemas montados separadamente, um para cada órgão analisado. As massas utilizadas de cada órgão bem como as massas dos OE's obtidos podem ser visualizadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Massa vegetal utilizada e massa de óleo essencial obtida de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook nas fases de floração e dormência

Espécie	**Órgão Vegetal**	**Fase de Floração**		**Fase de Dormência**	
		Massa vegetal (g)	**OE (g)**	**Massa vegetal (g)**	**OE (g)**
V. arenaria	Folha	603,0	1,395	-	-
	Caule aéreo	885,1	0,144	-	-
	Xilopódio	755,6	0,551	761,5	1,104
	Raiz	1068,0	1,988	552,1	1,792
V. robusta	Folha	334,0	0,695	-	-
	Caule aéreo	875,0	0,168	-	-
	Xilopódio	344,3	0,280	411,8	0,519
	Raiz	564,9	1,787	837,5	2,684

Foram utilizados em média 3L de água destilada em cada sistema, e o período de extração foi de três horas. Os óleos obtidos foram pesados em balança analítica e os rendimentos calculados. Foram transferidos então para frascos de vidro do tipo âmbar e armazenados em freezer até o momento das análises da composição química.

3.2.3 Análise da composição dos óleos essenciais por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas – CG/EM

Para as análises dos OE's, cerca de 20 mg de cada amostra foram diluídas em 1 mL de acetato de etila PA e injetadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 equipado com detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975, coluna capilar HP-5 (25 m de comprimento X 0,25 mm de diâmetro X 0,25 µm de espessura).

Os óleos essenciais foram analisados sob as seguintes condições:

- Temperatura do injetor: 220 °C
- Temperatura do detector: 250 °C
- Temperatura de coluna: 60 °C, 3 °C. min $^{-1}$, 240 °C
- Gás de arraste (He): 1,0 mL. min $^{-1}$
- Injeção split.

Para determinação do índice de Kovatz de cada composto, foi utilizada uma mistura de padrões de hidrocarbonetos injetada nas mesmas condições. A identificação dos compostos foi feita através da comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca NIST-05 e entre os Índices de Kovatz calculados e aqueles da literatura (ADAMS, 2007).

3.3 Resultados

3.3.1 Rendimento dos óleos essenciais

Os OE's dos órgãos vegetativos de *Viguiera arenaria* e *V. robusta* apresentaram diferenças quanto ao rendimento e os valores podem ser observados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Rendimento em porcentagem (%m/m) do óleo essencial de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook nas fases de floração e dormência

Estrutura	***Viguiera arenaria***		***Viguiera robusta***	
	Floração	**Dormência**	**Floração**	**Dormência**
Folha	0,23	-	0,21	-
Caule aéreo	0,02	-	0,02	-
Xilopódio	0,07	0,14	0,08	0,13
Raiz	0,19	0,33	0,32	0,32

Na fase de floração o OE das folhas de *V. arenaria* apresentou o maior rendimento, seguido das raízes e do xilopódio e o menor valor foi obtido a partir do caule aéreo. Na fase de dormência o OE do xilopódio aumentou 100% em relação à fase de floração, enquanto para as raízes esse aumento foi de 73%.

Em *V. robusta*, na fase de floração, as raízes apresentaram o maior rendimento do OE, seguidas das folhas e xilopódios e o menor rendimento foi observado no OE do caule aéreo. Na fase de dormência o OE do xilopódio aumentou 62% em relação à fase de floração enquanto o das raízes não apresentou variação.

3.3.2 Perfil químico e composição dos óleos essenciais

Os OE's dos órgãos vegetativos de *Viguiera arenaria* na fase de floração apresentaram diferenças quanto ao perfil químico e os resultados podem ser observados na figura 3.1. As porcentagens relativas de seus constituintes estão apresentadas na tabela 3.3.

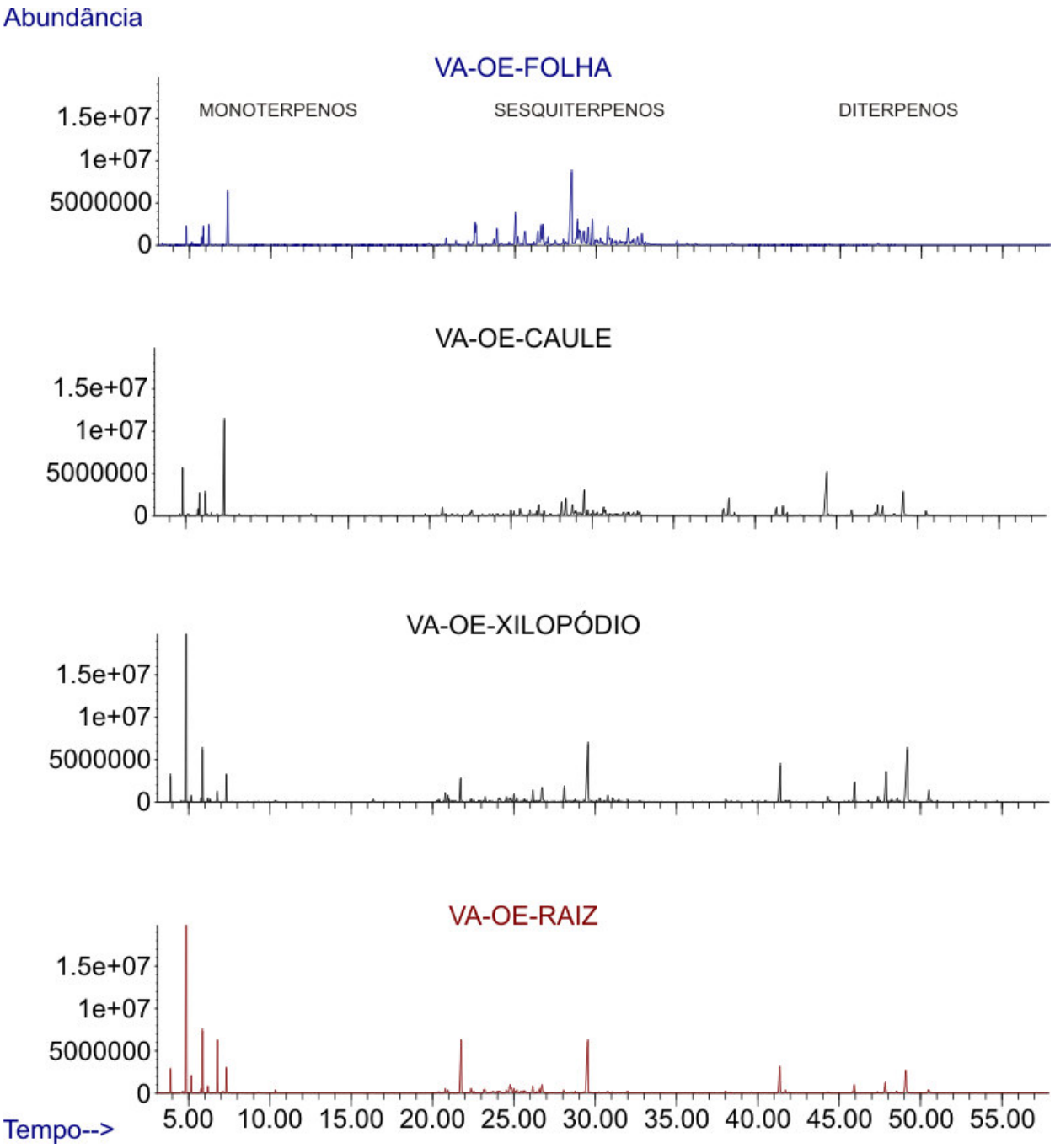

Figura 3.1 - Cromatogramas dos óleos essenciais (OE) dos órgãos vegetativos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius (VA) na fase de floração. Tempo em minutos

Tabela 3.3 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius na fase de floração. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(continua)

t_R (min)	Composto	$IK_{calculado}$	Área relativa (%)			
			Raiz	Xilopódio	Caule	Folha
4,88	α-pineno	933	40,72	31,44	4,05	1,14
5,22	canfeno	948	1,39	0,45	0,15	0,20
5,87	β-pineno	977	5,16	4,15	2,21	1,26
6,19	β-mirceno	991	0,59	0,33	2,43	1,41
6,78	δ-3-careno	1011	5,17	0,86	0,28	-
7,33	limoneno	1028	2,46	2,45	15,30	5,18
	MONOTERPENOS		55,49	39,68	24,42	9,20
21,77	cipereno	1395	9,50	3,22	0,37	-
22,52	cariofileno	1415	-	-	0,53	3,02
22,59	α-santaleno	1417	-	-	0,94	2,10
23,91	α-humuleno	1450	-	-	-	2,19
25,00	γ-muuroleno	1477	0,53	0,95	0,88	4,38
25,63	biciclogermacreno	1495	-	-	-	2,38
26,42	γ-cadineno	1513	-	-	-	2,32
26,63	ni	1518	-	-	-	3,13
26,72	δ-cadineno	1520	1,78	2,81	2,52	2,91
28,11	ni	1557	-	2,41	2,65	0,66
28,49	palustrol	1564	-	-	3,32	16,22
28,75	espatulenol	1573	-	-	2,26	4,52

Tabela 3.3 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius na fase de floração. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(conclusão)

28,96	óxido de cariofileno	1579	-	-	0,70	2,39
29,24	Ni	1586	-	-	0,44	3,40
29,50	carotol	1593	11,74	11,79	5,49	2,80
29,71	ledol	1598	-	-	1,01	3,79
30,73	ni	1626	-	0,84	0,91	3,29
31,93	ni	1660	-	-	0,82	2,76
32,88	ni	1835	-	-	0,58	2,17
38,40	ni	1845	-	-	3,20	0,31
	SESQUITERPENOS		23,55	22,02	26,60	64,72
41,35	ni	nc	5,08	6,55	1,76	-
44,41	ni	nc	-	-	14,13	-
45,92	ni	nc	1,51	3,37	1,11	-
47,83	ni	nc	2,08	5,08	2,01	-
49,10	ni	nc	4,46	12,80	5,45	-
	DITERPENOS		13,12	27,79	24,46	0,00
	TOTAL		92,16	89,49	75,48	73,92

Os OE's dos órgãos subterrâneos de *V. arenaria* são constituídos basicamente por monoterpenos, enquanto no caule aéreo as proporções de mono, sesqui e diterpenos são similares. Nas folhas, no entanto, os sesquiterpenos compõem a maior parte do OE e não foram detectados diterpenos.

Entre as fases de floração e dormência de *V. arenaria* o perfil químico dos OE's das raízes e xilopódio apresentaram diferenças, o que pode ser observado

nas figuras 3.2 e 3.3, respectivamente. As porcentagens relativas dos constituintes dos OE's estão apresentadas na tabela 3.4.

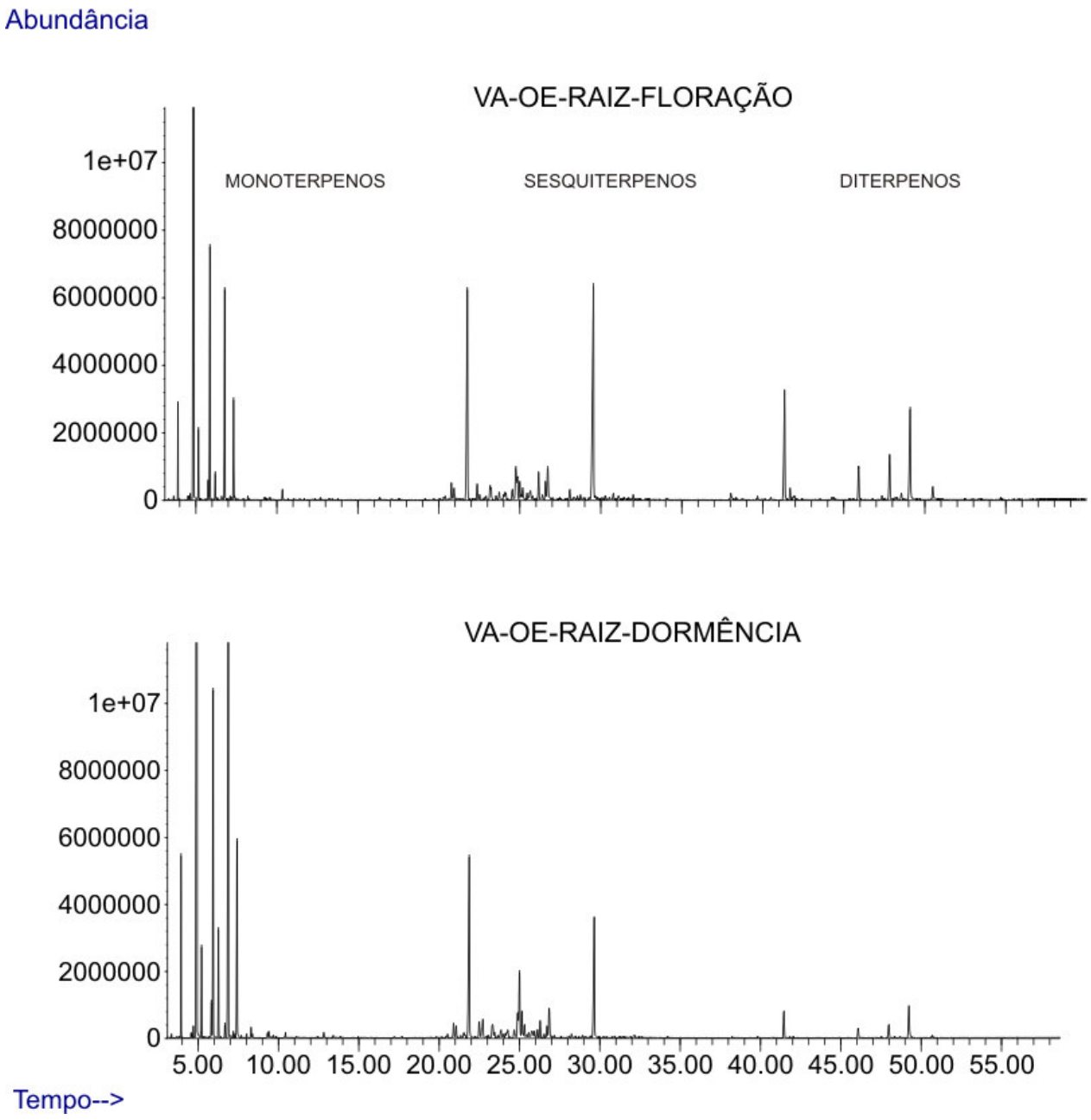

Figura 3.2 - Cromatogramas dos óleos essenciais (OE) das raízes de *Viguiera arenaria* Baker in Martius (VA) de floração e dormência . Tempo em minutos

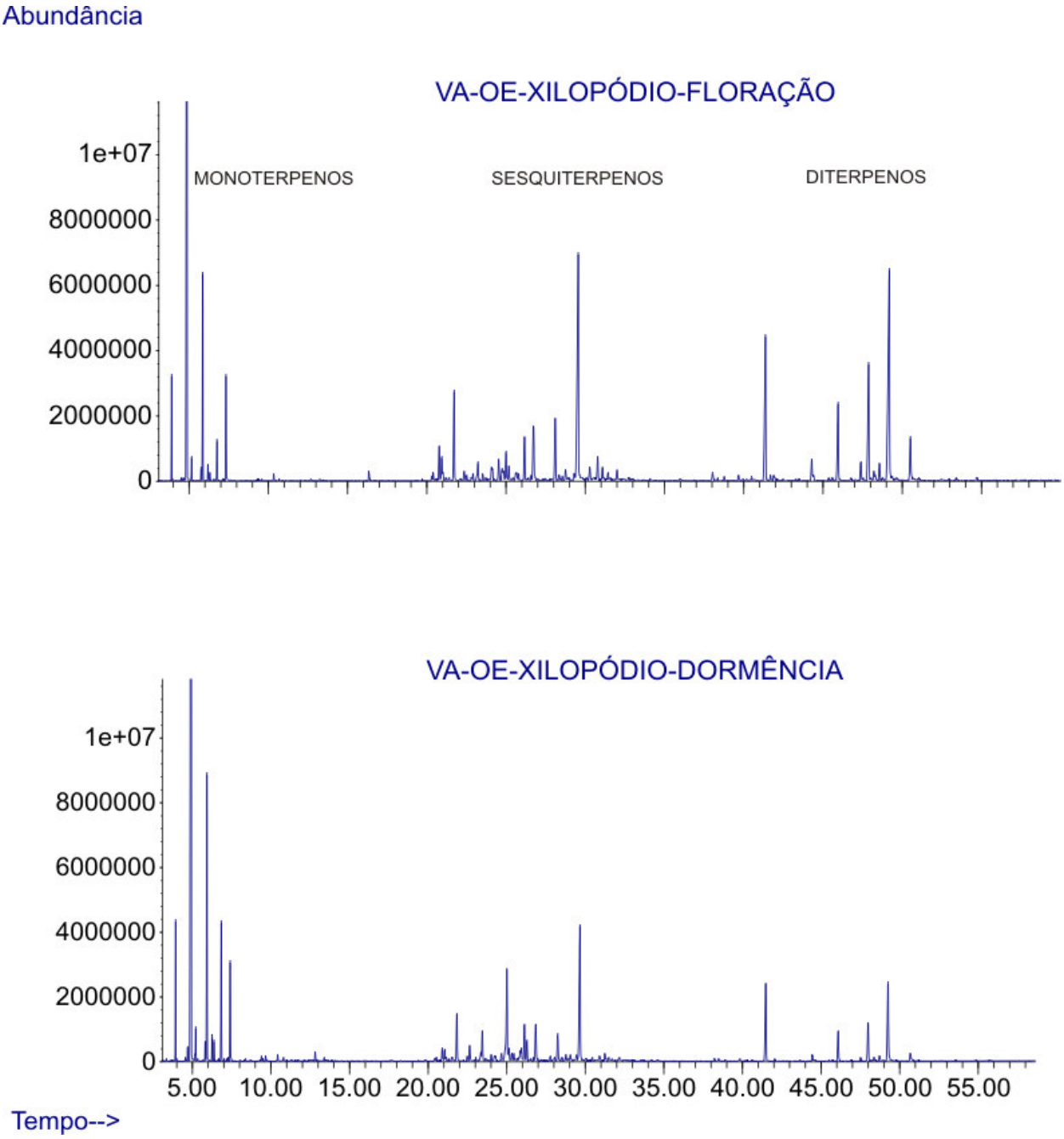

Figura 3.3 - Cromatogramas dos óleos essenciais (OE) do xilopódio de *Viguiera arenaria* Baker in Martius (VA) nas fases de floração e dormência. Tempo em minutos

Tabela 3.4 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos subterrâneos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius nas fases de floração e dormência. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(continua)

t_R (min)	Composto	$IK_{calculado}$	Área relativa (%)			
			Floração		Dormência	
			Raiz	Xilopódio	Raiz	Xilopódio
4,88	α-pineno	933	40,72	31,44	40,35	45,47
5,22	canfeno	948	1,39	0,45	1,74	1,56
5,87	β-pineno	977	5,16	4,15	8,05	7,85
6,19	β-mirceno	991	0,59	0,33	2,29	0,64
6,78	δ-3-careno	1011	5,17	0,86	13,58	3,82
7,33	limoneno	1028	2,46	2,45	5,19	2,94
	MONOTERPENOS		55,49	39,68	71,2	62,28
21,77	cipereno	1395	9,50	3,22	7,45	2,10
23,44	α-guaieno	1435	-	-	-	1,34
24,88	ni	1471	0,75	-	1,13	-
25,00	γ-muuroleno	1477	0,53	0,95	2,56	4,53
26,72	δ-cadineno	1520	1,78	2,81	1,30	2,04
28,11	ni	1557	-	2,41	-	1,35
29,50	carotol	1593	11,74	11,79	5,14	7,46
30,73	ni	1626	-	0,84	-	-
	SESQUITERPENOS		24,03	22,02	17,58	18,82
41,35	ni	nc	5,08	6,55	1,08	4,0

Tabela 3.4 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos subterrâneos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius nas fases de floração e dormência. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(conclusão)

45,92	ni	nc	1,51	3,37	-	1,51
47,83	ni	nc	2,08	5,08	0,55	1,90
49,10	ni	nc	4,46	12,80	1,39	4,40
DITERPENOS			13,12	27,79	3,02	11,10
TOTAL			92,64	89,49	91,8	92,2

Os monoterpenos compõem a maior fração dos OE's obtidos das raízes e do xilopódio tanto na fase de floração quanto na fase de dormência. Na fase de dormência esses compostos aumentaram em ambos, enquanto os sesqui e os diterpenos diminuíram.

Em *V. robusta* foram verificadas diferenças quanto ao perfil químico dos OE's entre os órgãos vegetativos na fase de floração e os resultados podem ser observados na figura 3.4. As porcentagens relativas dos constituintes dos OE's estão apresentadas na tabela 3.5.

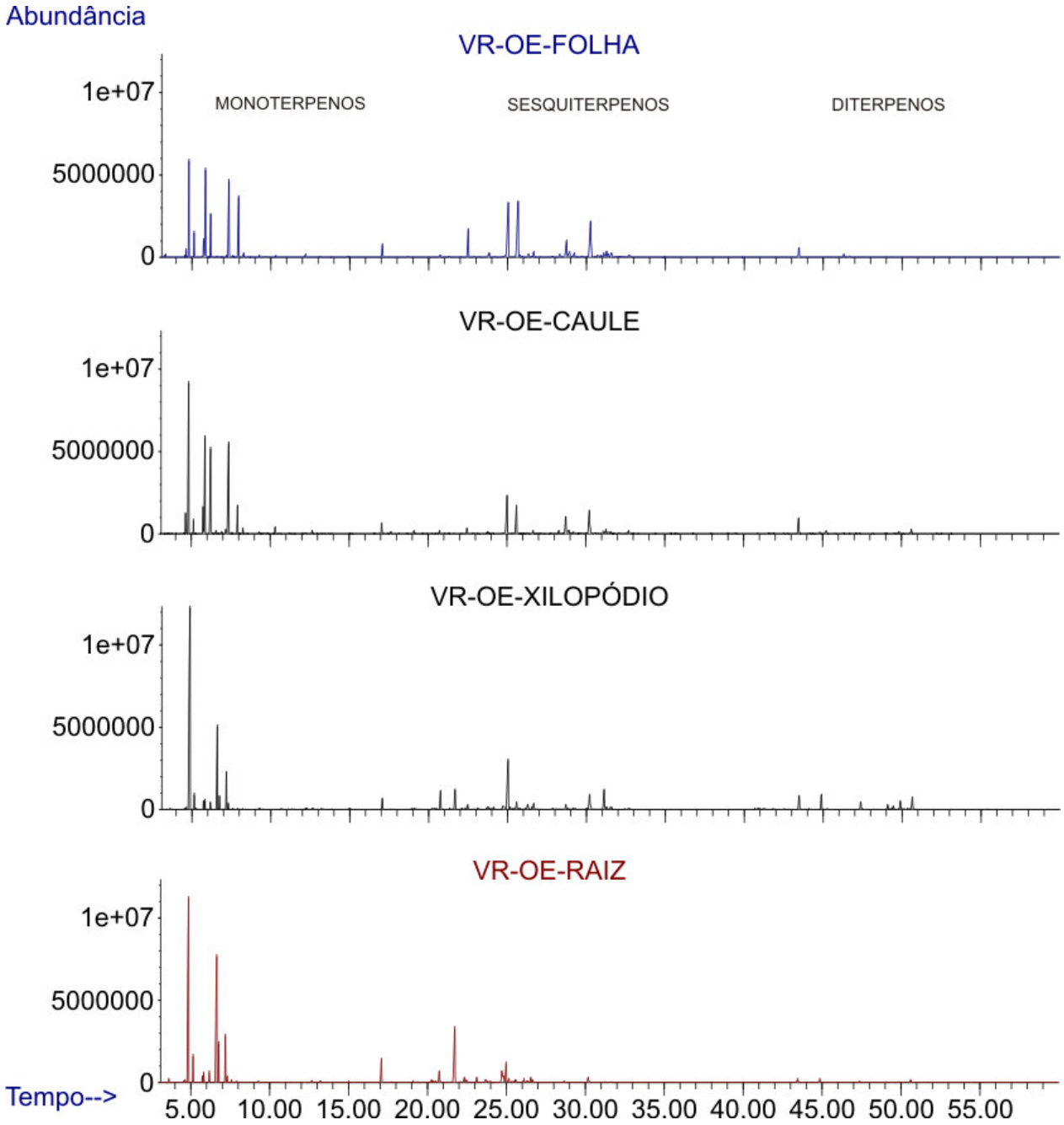

Figura 3.4 - Cromatogramas dos óleos essenciais (OE) dos órgãos vegetativos de *Viguiera robusta* Gardner in Hook (VR) na fase de floração . Tempo em minutos

Tabela 3.5 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos de *Viguiera robusta* Gardner in Hook na fase de floração. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(continua)

t_R (min)	Composto	$IK_{calculado}$	Área relativa (%)			
			Raiz	Xilopódio	Caule	Folha
4,86	α-pineno	936	31,57	39,03	19,64	9,02
5,15	canfeno	947	2,24	1,28	1,12	2,03
5,73	sabineno	972	0,60	0,70	3,01	1,95
5,83	β-pineno	976	0,87	0,83	11,59	9,82
6,18	β-mirceno	991	1,09	0,64	11,26	4,05
6,65	α-felandreno	1007	23,10	10,11	0,38	-
6,77	δ-3-careno	1012	3,91	1,16	-	-
7,20	p-cimeno	1025	5,31	3,72	0,51	-
7,31	limoneno	1028	0,78	0,71	15,84	11,16
7,93	trans-β-ocimeno	1047	-	-	2,96	7,92
17,08	acetato de bornila	1284	3,62	1,50	1,51	1,88
	MONOTERPENOS		73,08	59,68	67,82	47,82
20,74	α-copaeno	1373	1,92	2,81	0,44	-
21,73	cipereno	1397	11,66	3,19	-	-
22,46	cariofileno	1415	-	-	0,79	4,52
24,71	γ-gurjuneno	1471	2,72	1,13	-	-
24,98	germacreno D	1480	3,54	10,41	7,56	11,98
25,61	biciclogermacreno	1495	-	-	4,97	12,52
28,69	espatulenol	1575		0,89	3,08	3,29

Tabela 3.5 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos de *Viguiera robusta* Gardner in Hook na fase de floração. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(conclusão)

30,17	ni	1614	1,04	3,28	5,23	8,97
31,12	ni	1639	-	3,34	-	0,86
	SESQUITERPENOS		20,88	25,03	22,08	42,13
43,45	óxido de manoíla	nc	0,59	2,26	2,86	1,49
44,88	manool	nc	0,56	2,67	-	-
50,65	ni	nc	-	2,26	0,67	-
	DITERPENOS		1,15	7,19	3,53	1,49
	TOTAL DE COMPOSTOS		95,11	91,89	93,42	91,44

Os OE's dos órgãos subterrâneos, assim como do caule aéreo de *V. robusta* são compostos basicamente por monoterpenos, enquanto nas folhas os mono e sesquiterpenos apresentaram porcentagens semelhantes. Em relação aos diterpenos todos os órgãos apresentaram baixa porcentagem.

Entre as fases de floração e dormência de *V. robusta* o perfil químico dos OE's das raízes e xilopódio apresentaram diferenças, o que pode ser observado nas figuras 3.5 e 3.6, respectivamente. As porcentagens relativas dos constituintes dos OE's estão apresentadas na tabela 3.6.

Os monoterpenos compõem a maior fração dos OE's das raízes e do xilopódio de *V. robusta* tanto na fase de floração quanto na fase de dormência. Na fase de dormência esses compostos aumentaram em ambos, enquanto os sesqui e os diterpenos diminuíram. Nas raízes por sua vez os diterpenos não foram detectados na fase de dormência.

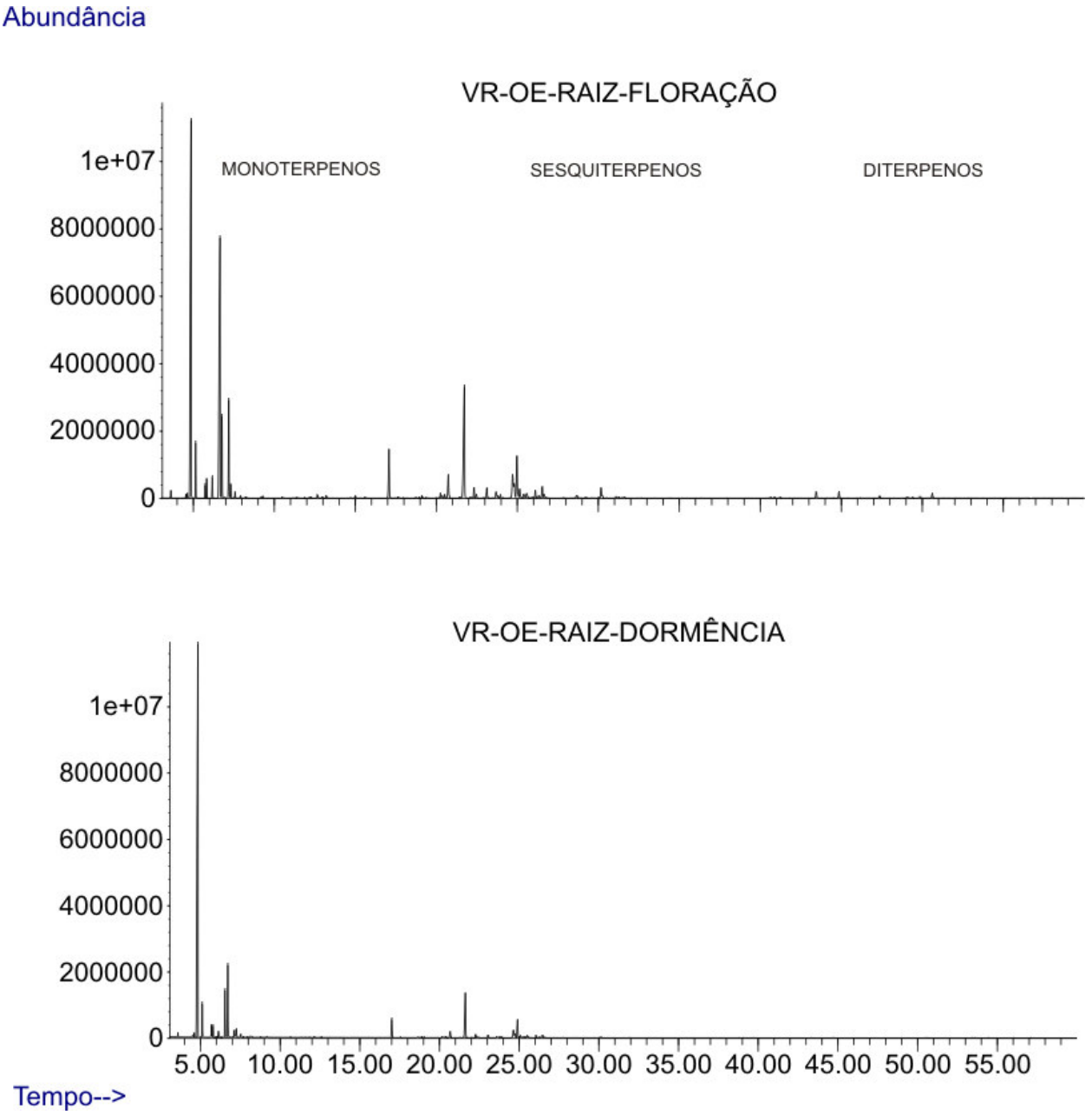

Figura 3.5 - Cromatogramas dos óleos essenciais (OE) das raízes de *Viguiera robusta* Gardner in Hook (VR) nas fases de floração e dormência. Tempo em minutos

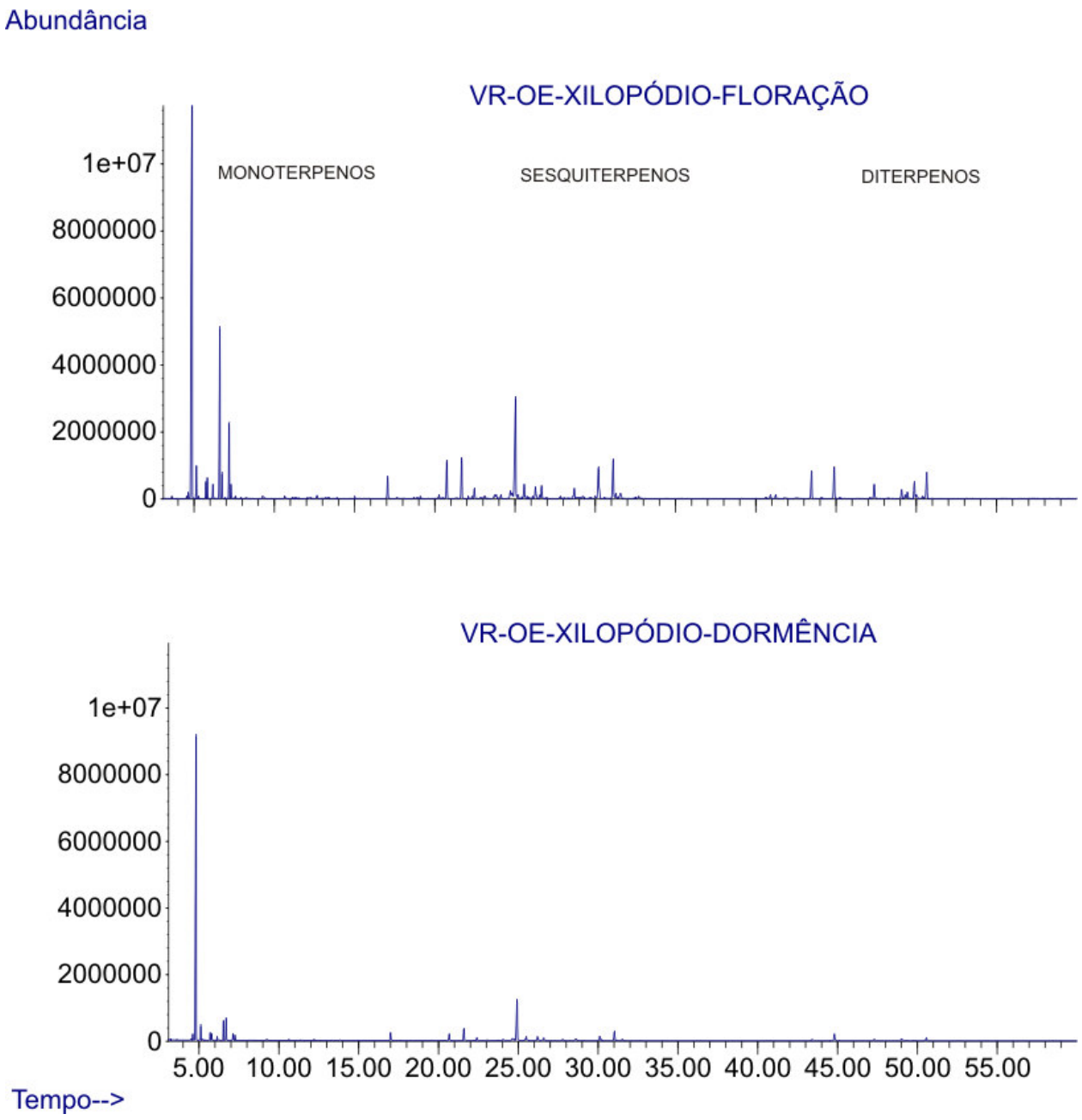

Figura 3.6 - Cromatogramas dos óleos essenciais (OE) do xilopódio de *Viguiera robusta* Gardner in Hook (VR) nas fases de floração e dormência. Tempo em minutos

Tabela 3.6 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos subterrâneos de *Viguiera robusta* Gardner in Hook nas fases de floração e dormência. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(continua)

t_R (min)	Composto	$IK_{calculado}$	Área relativa (%)			
			Floração		Dormência	
			Raiz	Xilopódio	Raiz	Xilopódio
4,86	α-pineno	936	31,57	39,03	69,0	65,9
5,15	canfeno	947	2,24	1,28	2,8	2,10
5,73	sabineno	972	0,60	0,70	1,00	1,00
5,83	β-pineno	976	0,87	0,83	1,10	1,00
6,18	β-mirceno	991	1,09	0,64	-	-
6,65	α-felandreno	1007	23,10	10,11	4,80	3,10
6,77	δ-3-careno	1012	3,91	1,16	7,60	3,5
7,20	p-cimeno	1025	5,31	3,72	-	-
7,31	limoneno	1028	0,78	0,71	-	-
17,08	acetato de bornila	1284	3,62	1,50	2,89	2,0
	MONOTERPENOS		73,09	59,68	89,19	78,6
20,74	α-copaeno	1373	1,92	2,81	-	1,6
21,73	cipereno	1397	11,66	3,19	7,79	3,10
24,71	γ-gurjuneno	1471	2,72	1,13	-	-
24,98	germacreno D	1480	3,54	10,41	3,0	11,30
28,69	espatulenol	1575	-	0,89	-	-
30,17	ni	1614	1,04	3,28	-	-
31,12	ni	1639	-	3,34	-	2,70

Tabela 3.6 - Composição química (% relativa) dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos subterrâneos de *Viguiera robusta* Gardner in Hook nas fases de floração e dormência. t_R = tempo de retenção, IK= Índice de Kovatz, ni = não identificado, nc = não calculado, (-) = composto ausente

(conclusão)

	SESQUITERPENOS		20,88	25,05	10,79	18,7
43,45	óxido de manoíla	nc	0,59	2,26	-	-
44,88	manool	nc	0,56	2,67	-	2,1
50,65	ni	nc	-	2,26	-	-
	DITERPENOS		1,15	7,19	0,00	2,1
	TOTAL DE COMPOSTOS		95,12	91,92	100	99,40

Os compostos identificados nos OE's dos órgãos vegetativos de *V. arenaria* e *V. robusta* podem ser observados na tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Compostos exclusivos dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook. (-) = composto ausente, (+) = composto presente

(continua)

Composto	***V. arenaria***				***V. robusta***			
	Raiz	**Xilopódio**	**Caule**	**Folha**	**Raiz**	**Xilopódio**	**Caule**	**Folha**
sabineno	-	-	-	-	+	+	+	+
α-felandreno	-	-	-	-	+	+	+	-
p-cimeno	-	-	-	-	+	+	+	-
trans-β-ocimeno	-	-	-	-	-	-	+	+
acetato de bornila	-	-	-	-	+	+	+	+
MONOTERPENOS								
α-copaeno	-	-	-	-	+	+	+	-
α-santaleno	-	-	+	+	-	-	-	-
α-humuleno	-	-	-	+	-	-	-	-
γ-gurjuneno	-	-	-	-	+	+	-	-
germacreno D	-	-	-	-	+	+	+	+
γ-muuroleno	+	+	+	+	-	-	-	-
γ-cadineno	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabela 3.7 - Compostos exclusivos dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook. (-) = composto ausente, (+) = composto presente

(conclusão)

δ-cadineno	+	+	+	+	-	-	-	-
palustrol	-	-	+	+	-	-	-	-
óxido de cariofileno	-	-	+	+	-	-	-	-
carotol	+	+	+	+	-	-	-	-
ledol	-	-	+	+	-	-	-	-
SESQUITERPENOS								
óxido de manoíla	-	-	-	-	+	+	+	+
manool	-	-	-	-	+	+	-	-
DITERPENOS								

3.4 Discussão

Os OE's dos diferentes órgãos de *Viguiera arenaria* e *V. robusta* apresentaram diferenças tanto no rendimento quanto na composição química. Em *V. arenaria* o OE das folhas apresentou o maior rendimento e em *V. robusta* o maior valor foi observado no OE radicular. Murari et al. (2008) ao estudar o OE de folhas, caules aéreo e subterrâneo de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus* (Asteraceae) também observaram diferenças no rendimento e composição química entre os órgãos. Essa variação é comum (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007) e pode estar relacionada às diferentes pressões ambientais às quais cada órgão está submetido, além do aparato bioquímico e fisiológico de cada um, refletindo na biossíntese e composição do OE (GERSHENZON; MCCONKEY; CROTEAU, 2000).

Embora nas porções tuberizadas das raízes de *V arenaria* ocorram visualmente mais estruturas secretoras do que em *V. robusta* (cap. 2) o rendimento do OE de ambas foi semelhante. Tal rendimento pode estar relacionado ao fato de que nas porções não tuberizadas de *V. arenaria* ocorrem menos estruturas secretoras, enquanto no sistema radicular de *V. robusta* a ocorrência de canais é constante em toda a extensão radicular, embora em menor número. Alguns autores, porém afirmam que a biossíntese de óleos essenciais deve estar mais relacionada com a atividade bioquímica das estruturas secretoras do que com a frequência destas (GERSHENZON;

MCCONKEY; CROTEAU, 2000; TURNER; GERSHENZON; CROTEAU, 2000; SANGWAN et al., 2001; DESCHAMPS et al., 2008).

Os OE's dos órgãos subterrâneos de *V. arenaria* e *V. robusta* são ricos em monoterpenos na fase de floração. Em *V. robusta*, no entanto foi observada maior variedade de compostos desse grupo. Em relação aos sesquiterpenos, o cipereno foi majoritário nas raízes de ambas as espécies e foi observado também no xilopódio. Segundo Harbone e Turner (1984) esse composto é amplamente distribuído entre as angiospermas, porém estudos como os de Heinrich et al. (2002), Wang, Kong e Zhang (2006), Carreira (2007), Urzúa, Santander e Echeverría (2007) e Maia et al. (2010) não detectaram a sua presença nos OE's de espécies de Asteraceae.

O OE do caule aéreo de *V. robusta* apresentou-se rico em monoterpenos, enquanto o de *V. arenaria* apresentou as mesmas proporções de mono, sesqui e diterpenos, com maior variedade de compostos no grupo dos sesquiterpenos. Em ambas as espécies o limoneno foi um dos compostos majoritários do OE do caule aéreo. Canales et al. (2008) atribuíram a atividade antimicrobiana do OE dos órgãos aéreos de *Viguiera dentata* à presença de componentes como limoneno, acetato de bornila e espatulenol, cujas concentrações foram de 13,27, 4,38 e 7,05%, respectivamente. No OE do caule aéreo de *V. robusta* os três compostos aparecem nas concentrações de 15,84, 1,51 e 3,08%, respectivamente. Em *V. arenaria* não foi detectado acetato de bornila e as concentrações do limoneno e espatulenol foram de 15,30 e 2,26%, respectivamente.

Os OE's das folhas de *V. arenaria* e *V. robusta* apresentaram comportamentos distintos quanto à composição química. Enquanto em *V. arenaria* o OE apresentou uma alta porcentagem e variedade de sesquiterpenos, em *V. robusta* as porcentagens de mono e sesquiterpenos foram semelhantes. Em *V. arenaria* o OE apresentou alta porcentagem de palustrol, além da presença de α-humuleno. Já em *V. robusta* o germacreno D foi um dos compostos majoritários. Estudos com *Cordia verbenacea* têm demonstrado a atividade antinflamatória do α-humuleno e (-)-*trans*-cariofileno (FERNANDES et al., 2007; PASSOS et al., 2007). Segundo Murari et al. (2008) o α-humuleno pode apresentar ainda, atividade citotóxica e inseticida enquanto o germacreno D apresenta atividade antimicrobiana.

Os OE's dos órgãos subterrâneos de *V. arenaria* e *V. robusta* apresentaram variações entre as fases de floração e dormência tanto no rendimento quanto na composição química. Em *V. arenaria* raízes e xilopódio aumentaram o rendimento do OE na fase de dormência, enquanto em *V. robusta* apenas o xilopódio apresentou esse comportamento. Nas duas espécies as porcentagens de monoterpenos das raízes e xilopódio aumentaram. Os sesquiterpenos apresentaram uma leve redução, enquanto os diterpenos reduziram drasticamente suas porcentagens na fase de dormência. Nessa fase os órgãos subterrâneos estão submetidos a condições de baixa disponibilidade hídrica e baixas temperaturas. Sob tais condições *V. arenaria* e *V. robusta* parecem investir na biossíntese de compostos de defesa de baixo peso molecular e alta volatilidade sob baixas temperaturas, principalmente monoterpenos (BARTRAM et al., 2006).

Segundo Loomis e Croteau (1973) os sesquiterpenos são metabolicamente ativos no crescimento vegetal. Dessa forma os indivíduos de *V. arenaria* e *V. robusta* investiriam mais na biossíntese desses compostos durante a fase de floração, quando as estruturas aéreas estão sendo formadas. Na fase de dormência por sua vez, apenas os órgãos subterrâneos estão presentes.

Os diterpenos são compostos de cadeias carbônicas maiores (C20) do que os mono (C10) e sesquiterpenos (C15). O carbono utilizado na sua biossíntese é provido pelo metabolismo primário, que desvia esse elemento fixado na fotossíntese em direção às vias do metabolismo secundário. Na fase de dormência os indivíduos não realizam fotossíntese e, portanto a disponibilidade de carbono nos órgãos subterrâneos é menor, fato que justificaria a redução da porcentagem de diterpenos nessa fase.

Alguns compostos foram exclusivos para *Viguiera arenaria* e *V. robusta*, permitindo a distinção entre estas. O sesquiterpeno carotol, por exemplo, foi identificado apenas em *V. arenaria*. Esse composto apresenta atividade antifúngica (JASICKA-MISIAK et al., 2004) e segundo Harbone e Turner (1984) sua distribuição é restrita entre os grupos vegetais, ocorrendo em alguns representantes da família Apiaceae.

3.5 Conclusões

- O rendimento e a composição química dos óleos essenciais de *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta* apresentam diferenças entre os órgãos e entre as espécies estudadas na fase de floração;

- Os órgãos subterrâneos de *V. arenaria* e *V. robusta* produzem óleo essencial tanto na fase de floração quanto na fase de dormência, porém a sua composição química varia entre estas fases;

- *Viguiera arenaria* e *V. robusta* apresentam compostos exclusivos a cada uma delas, os quais podem contribuir na distinção entre essas espécies.

Referências

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography /mass spectrometry**. Illinois: Allured Publ., 2007. 804 p.

AMBROSIO, S.R.; SCHORR, K.; DA COSTA, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 32, p. 221–224, 2004.

AMBRÓSIO, S.R.; ARAKAWA, N.S.; ESPERANDIM, V.R.; ALBUQUERQUE, S.; DA COSTA, F.B. Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, London, v. 22, p. 1423-1415, 2008.

ARIMURA, G.I.; SHIOJIRI, K.; KARBAN, R. Acquired immunity to herbivory and allelopathy caused by airborne plant emissions. **Phytochemistry**, New York, v. 71, p. 1642–1649, 2010.

BARTRAM, S.; JUX, A.; GLEIXNER, G.; BOLAND, W. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 67, p. 1661–1672, 2006.

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

CANALES, M.; HERNÁNDEZ, T.; CABALLERO, J.; VIVAR, A.R.; AVILA, G.; DURAN, A.; LIRA, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, p. 429–439, 2005.

CANALES, M.; HERNÁNDEZ, T.; RODRÍGUEZ-MONROY, M.A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; FLORES, C.M.; HERNÁNDEZ, L.B.; GIJÓN, I.C.; QUIROZ, S.; GARCÍA, A.M.; AVILA, G. Antimicrobial activity of the extracts and essential oil of *Viguiera dentata*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 46, n. 10/11, p. 719-723, 2008.

CARREIRA, R.C. ***Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.** 2007. 191 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, São Paulo, 2007.

CHAUVEAU, O.; EGGERS, L.; RAQUIN, C.; SILVÉRIO, A.; BROWN, S.; COULOUX, A.; CRUAUD, C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; YOCKTENG, R.; SOUZA-CHIES, T.T.; NADOT, S. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. **Annals of Botany**, London, v. 107, p. 1287–1312, 2011.

CROTEAU, R.B.; DAVIS, E.; RINGER, K.L.; WILDUNG, M.R. (–)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, Halle, v. 92, n. 12, p. 562-577, 2005.

DA COSTA, F.B.; SHORR, K.; ARAKAWA, N.S.; SHILLING, E.E.; SPRING, O. Infraspecific variation in the chemistry of glandular trichomes of two Brazilian *Viguiera* species (Heliantheae; Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 403-407, 2001.

DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J.L.; BIZZO, H.R.; OLIVEIRA, M.C.; ROSWALKA, L.C. Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de menta. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 725-730, 2008.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, p. 228–236, 2007.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M.E.; CROTEAU, R.B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 205-213, 2000.

GÖREN, A.C.; TOPÇU, G.; BILSEL, G.; BILSEL, M.; YDOGˇMUS, Z.; PEZZUTO, J.M. The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. stoechas. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 57, p. 797-800, 2002.

HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. **Plant chemosystematics**. London: Academic Press, 1984. 562 p.

HEINRICH, G.; PFEIFHOFER, H.W.; STABENTHEINER, E.; SAWIDIS, T. Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oil. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 459-469, 2002.

HIPÓLITO, U.V.; RODRIGUES, G.J.; LUNARDI, C.N.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, A.M.; BENDHACK, L.M.; DA COSTA, F.B.; TIRAPELLI, C.R. Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent-8(14),15-pimaradien-3β-ol in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 612, p. 183-191, 2009.

JASICKA-MISIAKA, I.; LIPOK, J.; NOWAKOWSKA, E.M.; WIECZOREK, P.P.; MŁYNARZ, P.; KAFARSKI, P. Antifungal activity of the carrot seed oil and its major sesquiterpene compounds. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 59, p. 791-796, 2004.

LOOMIS, W.D.; CROTEAU, R.B. Biochemistry and physiology of lower terpenoids. In: RUNECKLES, V.C.; MABRY, T.J. (Ed.). **Terpenoids**: structure biogenesis and distribution. New York: Academic Press, 1973. p. 147-186.

MAGENTA, M.A.G. ***Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil.** 2006. 353 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAIA, A.I.V.; TORRES, M.C.M.; PESSOA, O.D.L.; MENEZES, J.E.S.A.; COSTA, S. M. O.; NOGUEIRA, V.L.R.; MELO, V.M.M.; SOUZA, E.B.; CAVALCANTE, M.G.B.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliana*: composição química e atividade biológica. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 584-586, 2010.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morfological characteristics. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 12, p. 3926- 3929, 1996.

MARTÍNEZ, M.C.; DELGADO, T.H.; NIETO, J.C.; ROMO, A.R.V.; DÍAZ, A.D.; SAADE, R.L. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle De Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. **Acta Botanica Mexicana**, México, v. 75, p. 21-43, 2006.

MURARI, A.L.; CARVALHO, F.H.; HEINZMANN, B.M.; MICHELOT, T.M.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C.A. Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1081-1084, 2008.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 110, p. 323–333, 2007.

PORTO, T.S.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; MARTINS, C.H.G.; DA COSTA, F.B.; SEVERIANO, M.E.; SILVA, A.N.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial ent-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bactéria. **Fitoterapia**, Milano, v. 80, p. 432–436, 2009.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. **Biologia vegetal**. Tradução de J.E. Kraus. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

RYAN, C.A. Night moves of pregnant moths. **Nature**, London, v. 410, p. 530-531, 2001.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Amsterdam, v. 34, p. 3–21, 2001.

SCHILLING, E.E.; DA COSTA, F.B.; LOPES, N.P.; HEISE, P.J. Brazilian species of *Viguiera* (Asteraceae) exhibit low levels of its sequence variation. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 57, n. 3, p. 323–332, 2000.

SPRING, O.; ZIPPER, R.; REEB, S.; VOGLER, B.; DA COSTA, F.B. Sesquiterpenes lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, New York, v. 57, p. 267-272, 2001.

STEFANELLO, M.E.A.; CERVI, A.C.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E.L. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. obtecta, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.

TAYLOR, P.G.; LOO, O.A.D.; BONILLA, J.A.; MURILLO, R. Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thieleanin isolated from *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. **Fitoterapia**, Milano, v. 79, p. 428-432, 2008.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; DA COSTA, F.B.; OLIVEIRA, A.M. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, p. 56-62, 2002.

_____. Evidence for the Mechanisms underlying the effects of pimaradienoic acid Isolated from the roots of *Viguiera arenaria* on rat aorta. **Pharmacology**, Basel, v. 70, p. 31-38, 2004.

TURNER, G.W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R.B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, p. 655–663, 2000.

URZÚA, A.; SANTANDER, R.; ECHEVERRÍA, J. Analysis of surface and volatile compounds of flower heads of *Flourensia thurifera* (Mol) D.C. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 1244-1245, 2007.

VALÉRIO, D.A.R.; CUNHA, T.M.; ARAKAWA, N.S.; LEMOS, H.P.; DA COSTA, F.B.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A. Anti- inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 562, p. 155-163, 2007.

WANG, P.; KONG, C.; ZHANG, C.X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida L.* **Molecules**, Switzerland, v. 11, p. 549-555, 2006.

WINK, M. **Annual plant reviews**: biochemistry of plant secondary metabolism. New York: Wiley-Blackwell, 2009. 464p.

4 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE DUAS ESPÉCIES DE *Viguiera* KUNTH (ASTERACEAE) DO CERRADO PAULISTA

Resumo

Cerrado é o segundo bioma brasileiro, composto por um mosaico vegetacional de espécies cujas características adaptativas, como a presença de sistemas subterrâneos espessados, permitiram o estabelecimento destas sob condições de fogo e seca, além de pH ácido e deficiência de nutrientes. A família Asteraceae é a segunda dentre as fanerógamas com maior número de espécies no Cerrado sendo o gênero *Viguiera* Kunth um dos mais representativos. *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *V. robusta* Gardner in Hook podem ocorrer em áreas degradadas de Cerrado e beiras de estradas. Ambas as espécies apresentam potencial medicinal e o sistema subterrâneo espessado, apesar de formar gemas, não se constitui numa unidade de propagação vegetativa. Dessa forma, a manutenção das populações depende exclusivamente da germinação de sementes. Visando contribuir para a manutenção dessas espécies, esse estudo analisou o efeito de diferentes temperaturas sobre a germinação das sementes. Os frutos de *V. arenaria* foram coletados na Estação Ecológica de Itirapina e os de *V. robusta* na rodovia entre Batatais e Altinópolis, áreas de Cerrado no Estado de São Paulo. A germinação das sementes foi avaliada em temperaturas constantes de 20°C, 25°C, 30°C e alternadas de 15-35°C, 20-30°C e 20-35°C com fotoperíodo diário de 8h. As sementes não germinadas foram avaliadas quanto à viabilidade do embrião. Apesar de ser comum a produção de sementes sem embrião em espécies de Asteraceae, essa característica não foi marcante nas espécies estudadas, com a taxa de 7,16% para *V. arenaria* e 8,33% para *V. robusta*. Com base nos resultados de germinação, IVG e tempo médio de germinação, é possível concluir que a temperatura ótima para a germinação das sementes dessas duas espécies é 25°C.

Palavras-chave: *Viguiera arenaria* Baker in Martius; *Viguiera robusta* Gardner in Hook; Propagação; Temperatura

Abstract

Cerrado is the second Brazilian biome in extension formed by a mosaic of plant species. Adaptive features such as the presence of thickened underground systems allowed the establishment of these species under specific conditions, like fire and drought events, acid pH and nutrient deficiency in soil. Asteraceae is the second largest family in number of species among the phanerogans that occur in Cerrado and *Viguiera* is one of the most representative genus in this family. *Viguiera arenaria* Baker in Martius and *V. robusta* Gardner in Hook occur in degraded areas of Cerrado and roadsides and present medicinal potencial. Both have a thickened underground system represented by a xylopodium incapable of vegetative propagation despite forming buds. Thus, the maintenance of these populations depends exclusively on seed germination.

To contribute to the maintenance of these species, the aim of this work was to study the effects of different temperature conditions on seed germination. *V. arenaria* fruits were collected at Itirapina Ecological Station and *V. robusta* fruits in an area on the road between Batatais and Altinópolis, both Cerrado areas in São Paulo. Seed germination was evaluated at constant temperatures of 20°C, 25°C, 30°C and alternating temperatures 15-35°C, 20-30°C e 20-35°C with an eight-hour photoperiod. Although the production of embryoless seeds is common in Asteraceae species, this was not a noticeable feature to the species of this study that presented an embryoless seed rate of 7.16% for *V. arenaria* and 8.33% for *V. robusta*. Based on germination rate, germination speed index and the average time to germination, we concluded that the optimum temperature for the seed germination of these species is 25°C.

Keywords: *Viguiera arenaria* Baker in Martius; *Viguiera robusta* Gardner in Hook; Propagation; Temperature

4.1 Introdução

O Cerrado é o segundo bioma brasileiro em termos de área, estendendo-se por 1,5 milhões de Km^2 (COUTINHO, 2002). Segundo o autor o solo apresenta reduzido teor de matéria orgânica, baixa capacidade de retenção hídrica e pH ácido. Além disso, o clima é do tipo tropical sazonal com período seco de 3-4 meses. A disponibilidade de água e nutrientes, além da passagem periódica do fogo foram fatores determinantes, ao longo da evolução, para o estabelecimento do mosaico vegetacional observado hoje nesse bioma (COUTINHO, 2002; DURIGAN, 2003; SIMON et al., 2009). Dentre as adaptações morfológicas das plantas adaptadas ao Cerrado destacam-se os sistemas subterrâneos espessados os quais, além de compor um banco de gemas podem promover a propagação vegetativa dos indivíduos (HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2007; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008), aumentando as chances de manutenção das populações em condições desfavoráveis à germinação de sementes.

A família Asteraceae é a segunda dentre as fanerógamas com maior número de espécies no Cerrado (MENDONÇA et al., 2008) e seus representantes podem se propagar tanto vegetativamente, através dos variados tipos de sistema subterrâneo espessado (HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2007; APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 2008), quanto sexuadamente através de sementes (ZAIDAN; CARREIRA, 2008; CURY; NOVEMBRE; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2010). Estudos têm demonstrado que os fatores que mais afetam a formação das sementes nessa família

estão relacionados à apomixia e partenocarpia (WERPACHOWSKI; VARASSIN; GOLDENBERG, 2004; BERTASSO-BORGES; COLEMAN, 2005), além de cruzamentos incompatíveis, os quais podem causar a formação de sementes sem embrião ou ao aborto prematuro dessas (HISCOCK, 2000; MARZINEK, 2008). Já os principais fatores que podem influenciar a taxa de germinação de sementes completamente formadas são dormência, temperatura e luminosidade, estando esses combinados ou não (MARCOS FILHO; KOMATSU; BARZAGHI, 1987; FERREIRA et al., 2001; GOMES; FERNANDES, 2002; JUSAITIS; POLOMKA; SORENSEN, 2004; VELTEN; GARCIA, 2005).

O gênero *Viguiera* Kunth é um dos mais representativos da família Asteraceae e suas espécies podem apresentar sistema subterrâneo composto por um caule espessado do qual partem raízes adventícias com variados graus de tuberização (MAGENTA, 2006). Dentre essas espécies destacam-se *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook, cujas populações podem ocorrer em áreas degradadas de Cerrado e beiras de estradas (MAGENTA, 2006). Ambas as espécies apresentam potencial medicinal (HIPÓLITO et al., 2009; VALÉRIO et al., 2007) e o sistema subterrâneo espessado apesar de formar gemas não se constitui numa unidade de propagação vegetativa.

Apesar do crescente número de estudos sobre o processo germinativo de sementes de Asteraceae, pouco se sabe sobre a germinação de espécies nativas do Cerrado (MALUF; WIZENTIER, 1998; SASSAKI et al., 1999; SOUZA et al., 2003; VELTEN; GARCIA, 2005; GARCIA; BARROS; LEMOS FILHO, 2006; ZAIDAN; CARREIRA, 2008; CURY; NOVEMBRE; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2010). Além disso, a literatura carece de informações acerca da germinação das sementes de espécies do gênero *Viguiera* e apenas a pesquisa de Ruggiero e Zaidan (1997) tem informações sobre esse assunto.

Visando contribuir para a manutenção das populações de *Viguiera arenaria* e *V. robusta* essa pesquisa teve por objetivo estabelecer as condições ideais de temperatura para a germinação das sementes destas duas espécies.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta, seleção e armazenamento dos frutos

Para a realização dos ensaios de germinação foram utilizadas sementes de *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta*. Os frutos foram coletados em áreas de Cerrado do estado de São Paulo. *Viguiera arenaria* na Estação Ecológica de Itirapina (22°14'S e 47°51'W), em março de 2009 e *Viguiera robusta* no Km 34 da rodovia entre Batatais e Altinópolis (20°59'S e 47°27'W), em junho de 2010. Na coleta foram selecionados os capítulos cujos frutos eram facilmente removidos com as mãos. Logo após os mesmos foram deixados para secar à temperatura ambiente no laboratório (18 a 22ºC) e, em seguida, selecionados com o auxílio de lupa (modelo Opton XTB/3AT). Os frutos predados ou com aspecto murcho foram descartados, porém não foi possível com essa análise verificar a presença ou ausência de embrião no interior das sementes. Os frutos selecionados de *V. arenaria* foram armazenados em tubos Falcon durante 16 meses, enquanto os de *V. robusta* permaneceram em placa de Petri, por 30 dias, ambos em temperatura ambiente no laboratório.

4.2.2 Instalação do experimento e acompanhamento do processo germinativo

Segundo Marzinek, De-Paula e Oliveira (2008) os frutos de Asteraceae são do tipo cipsela e no presente estudo foram denominados sementes.

Para a realização dos experimentos de germinação as sementes foram distribuídas aleatoriamente sobre duas folhas de papel filtro embebidas com 13 mL de água destilada em caixas plásticas previamente esterilizadas. Essas foram acondicionadas em seis germinadores (modelo Marconi MA 402) com temperaturas constantes 20°C, 25°C e 30°C e alternadas 15-35°C, 20-30°C e 20-35°C e fotoperíodo diário de 8 horas, fornecido por lâmpada fluorescente, com irradiância de 40.32 $mmol.m^{-2}$ s^{-1}. Cada caixa plástica foi considerada uma repetição e para cada temperatura havia cinco repetições. Para *V. arenaria* foram utilizadas 20 sementes por repetição e para *V. robusta* 16 sementes.

O processo de germinação foi verificado diariamente e, quando necessário, o papel filtro foi umedecido, garantindo o suprimento de água para as sementes durante o experimento. Em cada análise foram consideradas germinadas as sementes que deram origem a uma plântula normal, ou seja, as que possuíam dois cotilédones, hipocótilo e raiz primária (BRASIL, 2009). Também foram contabilizadas as sementes não germinadas.

O processo de germinação teve a duração de 32 dias e, com base nos resultados obtidos, foram calculados a porcentagem de germinação, o tempo médio (t) (LABOURIAU, 1983a) e o índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962).

4.2.3 Análise das sementes não germinadas

Após a última avaliação do experimento as sementes foram mantidas sob as mesmas condições em um período adicional de sete dias, garantindo a estabilização do processo. Após esse período, as sementes que não germinaram foram seccionadas transversalmente abaixo do pápus. As sementes, nas quais foi verificada a presença do embrião com aparência normal, tiveram o mesmo extraído e imerso em solução 0,5% de tetrazólio contida em copos plásticos, cobertos com papel alumínio e mantidos por 4 horas em estufa a 30°C. O embrião cujo tecido foi corado pela solução de tetrazólio foi considerado viável (BRASIL, 2009).

As sementes desprovidas de embrião foram classificadas como não formadas e aquelas com embriões não viáveis como mortas.

4.2.4 Análises estatísticas

Foram realizadas as análises estatísticas dos dados obtidos a partir das sementes germinadas e não germinadas. Os parâmetros em porcentagem que não apresentavam valores iguais a zero foram transformados em arc sen $\sqrt{(x/100)}$ enquanto os que apresentavam valores iguais a zero foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$ e então submetidos à análise de variância. Posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% utilizando o programa SAS (SAS/STAT, 2003).

4.3 Resultados

4.3.1 Teste de germinação

A germinação das sementes de *Viguiera arenaria* iniciou-se aos três dias da implantação do teste de germinação, enquanto em *V. robusta* iniciou aos quatro dias.

Em *V. arenaria* das 600 sementes avaliadas 80% germinaram, enquanto em *V. robusta* das 480 sementes germinaram 76% (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Germinação (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e tempo médio de germinação (t) de sementes de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook sob diferentes temperaturas. Para cada espécie, na mesma coluna, letras iguais não diferem estatisticamente. n = total de sementes

Espécie	Temperaturas (°C)	Germinação (%)	IVG	t (dias)
V. arenaria (n=600)	20	92 a	2,70 bc	7,24 bc
	25	88 ab	3,81 a	5,01 a
	30	74 ab	2,69 bc	6,29 abc
	15-35	73 b	1,52 d	10,86 d
	20-30	82 ab	2,93 b	6,07 ab
	20-35	71 b	1,95 cd	8,02 c
V. robusta (n=480)	20	97 a	2,01 a	7,99 ab
	25	95 ab	2,21 a	7,55 a
	30	67 c	1,14 c	10,56 ab
	15-35	17 d	0,12 d	24,71 d
	20-30	97 a	1,68 b	10,96 b
	20-35	85 bc	0,89 c	17,72 c

A germinação das sementes de *V. arenaria* a 20°C superou estatisticamente a das sementes avaliadas a 15-35°C e a 20-35°C. Em relação ao IVG o resultado obtido no teste de germinação a 25°C foi estatisticamente superior aos demais. O tempo requerido para a germinação das sementes foi inferior para a temperatura de 25°C, que diferiu estatisticamente ao das sementes germinadas a 20°C, 15-35°C e 20-35°C.

Para as sementes de *V. robusta*, a germinação foi superior nas temperaturas de 20°C e 20-30°C que diferiram estatisticamente a das sementes avaliadas a 30ºC, 15-35°C e 20-35°C. No entanto, os resultados do IVG e do tempo requerido para a germinação indicaram que a temperatura de 25°C superou estatisticamente os valores obtidos com as temperaturas alternadas, além do tratamento de 30°C para o IVG, mas não diferindo significativamente das demais.

4.3.2 Análises das sementes não germinadas

Das 600 sementes de *Viguiera arenaria* 4,83% originaram plântulas anormais, 7,16% não estavam formadas, 7% estavam mortas e 1% viáveis (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Plântulas anormais (PA), sementes viáveis (SV), sementes mortas (SM) e sementes não formadas (SNF) de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook sob diferentes temperaturas. Para cada espécie, na mesma coluna, letras iguais não diferem estatisticamente

Espécie	Temperaturas (°C)	PA (%)	SV (%)	SM (%)	SNF (%)
V. arenaria	20	0 c	0 b	3 a	5 a
	25	1 bc	0 b	6 a	5 a
	30	14 a	0 b	9 a	3 a
	15-35	4 abc	6 a	9 a	8 a
	20-30	1 bc	0 b	8 a	9 a
	20-35	9 ab	0 b	7 a	13 a
V. robusta	20	0 b	0 b	0 b	3 b
	25	0 b	0 b	0 b	5 ab
	30	0 b	3 b	19 a	11 ab
	15-35	18 a	23 a	25 a	17 a
	20-30	0 b	0 b	0 b	3 b
	20-35	3 b	1 b	0 b	11 ab

A temperatura de 30°C superou estatisticamente as demais com relação à porcentagem de plântulas anormais, enquanto em relação à taxa de sementes não formadas e mortas não foram observadas diferenças estatísticas entre as sementes

avaliadas nas diferentes temperaturas. A porcentagem de sementes viáveis foi significativamente superior no tratamento de 15-35°C.

Com relação às sementes de *V. robusta*, 3,33% originaram plântulas anormais e 8,33% originaram sementes não formadas, 7,29% mortas e 4,37% foram consideradas viáveis. O tratamento de 15-35°C superou estatisticamente os demais com relação à porcentagem de plântulas anormais, sementes não formadas, sementes viáveis e, juntamente com o tratamento de 30°C apresentou a maior porcentagem de sementes mortas.

4.4 Discussão

Estudos realizados com espécies de Asteraceae demonstraram que estas podem diferir quanto ao intervalo ideal de temperatura para a germinação das sementes (FERREIRA et al., 2001; GOMES; FERNANDES, 2002; VELTEN; GARCIA, 2005; CURY; NOVEMBRE; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2010). O comportamento germinativo semelhante de *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta* pode estar relacionado ao fato de ambas ocorrerem naturalmente em áreas de Cerrado cujas características ambientais são similares, com temperatura média anual ao redor de 20,6°C (TANNUS; ASSIS; MORELLATO, 2006; CEPAGRI, 2011).

Segundo Ferreira et al. (2001) o tempo médio, assim como a velocidade de germinação (SANTANA; RANAL, 2000), são índices adequados para determinar o período em que uma espécie ocupa uma determinada área, e consideraram que as espécies podem ser classificadas em lentas, intermediárias ou rápidas. Espécies que apresentam alto valor de IVG e baixo valor de tempo médio tendem a se estabelecer de forma rápida no ambiente, aproveitando ao máximo as condições favoráveis como água e temperatura para o desenvolvimento das futuras plântulas (VELTEN; GARCIA, 2005). Com base nesses parâmetros *Viguiera arenaria* e *V. robusta* podem ser classificadas como espécies de germinação intermediária a lenta. Ruggiero e Zaidan (1997) classificaram *Viguiera robusta* como lenta com base no início da germinação, que ocorreu no 50º dia, diferente do observado nesse trabalho, onde as sementes iniciaram sua germinação no 4º dia.

Considerando-se a porcentagem de sementes germinadas, IVG e o tempo médio de germinação o tratamento de 25°C foi o mais favorável para o processo germinativo de *Viguiera arenaria* e *V. robusta*. Ruggiero e Zaidan (1997) ao estudarem a germinação de sementes de *Viguiera robusta* em diferentes temperaturas observaram as maiores taxas para as temperaturas de 20°C e 20-30°C, resultados similares aos obtidos nesse trabalho. Segundo Mayer e Poljakoff-Mayber (1989) a temperatura ideal ou ótima para a germinação das sementes de uma determinada espécie é aquela em que a taxa de germinação é máxima em um mínimo espaço de tempo. Em contrapartida temperaturas mínimas e máximas podem reduzir esses valores e até inibir esse processo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Esse fato poderia justificar os menores valores de IVG e porcentagem de germinação assim como os maiores valores de tempo médio observados nos tratamentos com as temperaturas alternadas de 15-35°C.

Nos tratamentos que apresentaram os maiores valores de tempo médio de germinação e os menores valores de IVG também foram encontradas as maiores porcentagens de plântulas anormais e sementes viáveis não germinadas nas duas espécies estudadas. Segundo Brasil (2009), plântulas anormais são aquelas que, mesmo sob condições favoráveis não apresentam potencial para continuar seu desenvolvimento e originar plantas normais. As sementes viáveis são aquelas que sob condições favoráveis de germinação são capazes de originar uma plântula normal. Para *Viguiera robusta* as temperaturas alternadas de 15-35°C além de reduzir a germinação de sementes viáveis proporcionaram uma maior formação de plântulas anormais.

A produção de sementes sem embrião, característica comum em espécies de Asteraceae pode afetar a taxa de germinação total (SASSAKI et al., 1999; VELTEN; GARCIA; 2005, MARZINEK, 2008). Bertasso-Borges e Coleman (2005) ao analisar 3632 sementes de *Eupatorium laevigatum* Lam. observaram que 28,2% continham embrião. Em *Lessingianthus bardanoides* e *Chresta sphaerocephala* a porcentagem de sementes não formadas foi de 54 e 85%, respectivamente (CURY; NOVEMBRE; APPEZZATO-DA-GLÓRIA 2010). As autoras relacionaram a elevada porcentagem de sementes não formadas em *C. sphaerocephala* com o fato de esta espécie propagar-se vegetativamente, enquanto *L. bardanoides* propaga-se apenas por sementes. Em *Viguiera arenaria* e *V. robusta* a baixa porcentagem de sementes não

formadas de 7,16% e 8,33%, respectivamente, pode estar relacionada com o fato de que ambas as espécies não se propagam vegetativamente.

4.5 Conclusões

- A germinação das sementes de *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta* é influenciada pela temperatura;
- A temperatura ideal para a germinação das sementes de *V.arenaria* e *V. robusta* é 25 °C.

Referências

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CURY, G.; SOARES, M.K.M.; ROCHA, R.; HAYASHI, A.H. Underground systems of Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. **Journal of the Torrey Botanical Society**, London, v. 135, p. 103-113, 2008.

BERTASSO-BORGES, M.S.; COLEMAN, J.R. Cytogenetics and embryology of *Eupatorium laevigatum* (Compositae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 123-128, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análises de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes:** ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA. Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br/index.html>. Acesso em 17 ago. 2011.

COUTINHO, L.M. O bioma do cerrado. In: KLEIN, A.L. (Org.). **Eugen Warming e o Cerrado brasileiro:** um século depois. São Paulo: Editora Unesp, 2002. pt. 2, p. 77-91.

CURY, G.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Seed germination of C*hresta sphaerocephala* DC. and *Lessingianthus bardanoides* (Less.) H. Rob. (Asteraceae) from Cerrado. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 6, p. 1299-1308, 2010.

DURIGAN, G. O Cerrado como formação vegetal e bases para sua sustentabilidade. In: UIEDA, W.; PALEARE, L.M. (Org.). **Flora e fauna:** um dossiê ambiental. São Paulo: Editora Unesp, 2003. cap. 12, p. 173-178.

FERREIRA, A.G.; CASSOL, B.; ROSA, S.G.T.; SILVEIRA, T.S.; STIVAL, A.L.; SILVA, A.A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Feira de Santana, v. 15, n. 2, p. 231-242, 2001.

GARCIA, L.C.; BARROS, F.V.; LEMOS FILHO, J.P. Comportamento germinativo de duas espécies de canga ferrífera: *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae) e *Tibouchina multiflora* Cogn. (Melastomataceae). **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 20, n. 2, p. 443-448, 2006.

GOMES, V.; FERNANDES, G.W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasilica**, Feira de Santana, v. 16, n. 4, p. 421-427, 2002.

HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 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.

HIPÓLITO, U. V.; RODRIGUES, G.J.; LUNARDI, C.N.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, A.M.; BENDHACK, L.M.; DA COSTA, F.B.; TIRAPELLI, C.R. Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the Pimarane ent-8(14),15-pimaradien-3β-ol in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 612, p. 183-191, 2009.

HISCOCK, S.J. Self-incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 85, Suppl. A, p. 181-190, 2000.

JUSAITIS, M.; POLOMKA, L.; SORENSEN, B. Habitat specificity, seed germination and experimental translocation of the endangered herb *Brachycome muelleri* (Asteraceae). **Biological Conservation**, Essex, v. 116, p. 251-266, 2004.

LABOURIAU, L.G. **A germinação de sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos,1983. 171 p.

MAGENTA, M.A.G. ***Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e Sistemática das Espécies do Brasil.** 2006. 353 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.

MALUF, A.M.; WIZENTIER, B. Aspectos fenológicos e germinação de sementes de quatro populações de *Eupatorium vauthierianum* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 247-257, 1998.

MARCOS FILHO, J.; KOMATSU, Y.H.; BARZAGHI, L. Métodos para superar a dormência de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 9, n. 2, p. 65-74, 1987.

MARZINEK, J. **Aspectos estruturais de órgãos reprodutivos de seis espécies de Eupatorieae (Asteraceae), com ênfase na ontogênese das cipsela e sementes**. 2008. 81 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2008.

MARZINEK, J.; DE-PAULA, O.C.; OLIVEIRA, D.M.T. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 549-553, 2008.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 1989. 270 p.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; FAGG, C.W. Flora Vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12356 espécies. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (Org.). **Cerrado:** ecologia e flora. Brasília: Embrapa Cerrados, 2008. v. 2, p. 421-442.

RUGGIERO, P.G.C.; ZAIDAN, L.B.P. Estudos de desenvolvimento de *Viguiera robusta* Gardner, uma Asteraceae do Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 1-9, 1997.

SANTANA, D.G.; RANAL, M. Análise estatística da germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 205-237, 2000.

SAS INSTITUTE. **SAS system:** SAS/STRAT version 9.1 (software). Cary, 2003.

SASSAKI, R.M.; RONDON, J.N.; ZAIDAN, L.B.P.; FELIPPE, G.M. Germination of seeds from herbaceous plants artificially stored in Cerrado soil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 2, p. 271-279, 1999.

SIMON, M.F.; GRETHER, R.; QUEIROZ, L.P.; SKEMA, C.; PENNINGTON, R.T.; HUGHES, C.E. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by *in situ* evolution of adaptations to fire. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 48, p. 20359-20364, 2009.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, ed. esp., p. 1532-1538, 2003.

TANNUS, J.L.S.; ASSIS, M.A.; MORELLATO, L.P.C. Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de Cerrado no sudeste do Brasil, Itirapina-SP. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 6, n. 3, p. 1-27, 2006.

VALÉRIO. D.A.R.; CUNHA, T.M.; ARAKAWA, N.S.; LEMOS, H.P.; DA COSTA, F.B.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A. Anti- inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 562, p. 155-163, 2007.

VELTEN, S.B.; GARCIA, Q.S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Feira de Santana, v. 19, n. 4, p. 753-761, 2005.

WERPACHOWSKI, J.S.; VARASSIN, I.G.; Goldenberg, R. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 607-613, 2004.

ZAIDAN, L.B.P.; CARREIRA, R.C. Seed germination in Cerrado species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 20, n. 3, p. 167-181, 2008.