

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ALINE BERTOLOSI BOMBO

Anatomia, análise do óleo essencial e germinação de sementes de três espécies de *Viguiera* Kunth (Asteraceae - Heliantheae)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Aline Bertolosi Bombo

Beatriz Appezzato da Glória
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória
Co-Orientadora: Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B639a Bombo, Aline Bertolosi, 1985-
Anatomia, análise do óleo essencial e germinação de
sementes de três espécies de *Viguiera* Kunth
(Asteraceae - Heliantheae) / Aline Bertolosi Bombo. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Beatriz Appezzato da Glória.
Coorientador: Vera Lúcia Garcia Rehder.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Viguiera filifolia*. 2. *Viguiera linearifolia*. 3.
Viguiera trichophylla. 4. Estruturas secretoras. 5.
Quimiotaxonomia vegetal. I. Appezzato-da-Glória,
Beatriz. II. Rehder, Vera Lúcia Garcia. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Anatomy, analysis of the essential oil and seed germination of
three species of *Viguiera* Kunth (Asteraceae - Heliantheae)

Palavras-chave em Inglês:

Viguiera filifolia

Viguiera linearifolia

Viguiera trichophylla

Secretory structures

Plant chemotaxonomy

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Beatriz Appezzato da Glória [Orientador]

Juliana Marzinek

Juliana Lischka Sampaio Mayer

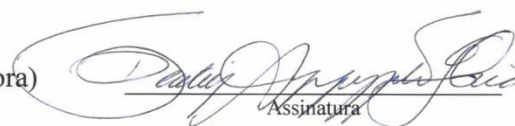
Data da defesa: 16-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 16 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

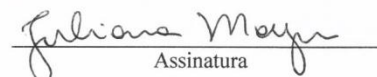
Profa. Dra Beatriz Appezzato da Glória (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Juliana Marzinek


Assinatura

Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer


Assinatura

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira


Assinatura

Dra. Graziela Cury


Assinatura

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Tânia e Luis, e à minha irmã Camila,
com todo meu amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, primeiramente pela confiança em mim depositada desde a Iniciação Científica, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pelas discussões, sugestões e críticas sempre muito construtivas, pelo exemplo de profissional que é para mim, por toda a amizade e companheirismo, e por permitir mais alguns anos de convivência e ensinamentos que virão durante o doutorado.

À Profa. Vera Lúcia Garcia Rehder por me receber como orientada e pela confiança em mim deposita nesse período, pelos ensinamentos transmitidos em uma área até então desconhecida por mim, pelo apoio e amizade.

Ao Programa de Biologia Vegetal da Pós-graduação do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, por ter possibilitado a realização do presente trabalho, em especial à secretária Maria Roseli, por sua eficiência profissional em todos os auxílios prestados e pelo apoio nos assuntos acadêmicos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento pela concessão da minha bolsa de estudos, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo período de bolsa concedido através do processo nº 2010/01931-0 e também pelo Projeto Temático nº 2010/51454-3.

À equipe do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), em especial à Adriana da Silva Santos de Oliveira pelo apoio técnico e nas análises químicas.

À equipe do Laboratório de Sementes da ESALQ/USP, em especial à Profa. Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre pelo auxílio na condução dos experimentos de germinação e por suas sugestões e contribuições para elaboração do capítulo 4, e à Helena Pescarin Chamma, pelo apoio na realização dos experimentos de germinação de sementes.

À toda equipe e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal da ESALQ/USP, Graça, Makeli, Magda, João Paulo, Tuane, Michelly, Elaine e Marta, pela ótima convivência, pela contribuição direta e indireta ao meu trabalho e pelo companheirismo e amizade. Em especial, gostaria de agradecer à farmacêutica Marli K. M. Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela forma impecável como mantém a organização do laboratório facilitando a prática laboratorial, por todo apoio técnico e amizade.

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

À administração do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, pela disponibilização de funcionário e automóvel para a coleta e transporte de material botânico nas dependências do Parque.

À Aline Redondo Martins, por ter sido uma grande amiga e companheira de coleta.

À todos os colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Unicamp. Em especial à Mayara Caddah, que me ajudou muito antes mesmo de me conhecer pessoalmente.

À minha família, pelo incentivo de sempre para que eu me dedique à carreira acadêmica, por todo apoio para a execução desse estudo e principalmente, pelo apoio emocional e por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Denilson, por apoiar sempre em todos os momentos, por eu poder compartilhar todos os meus sentimentos e por seu meu grande amigo.

Às minhas amigas Cigana, Kçarola, Meio-a-meio, Gasparzinho, Relva e Keini, por estarem sempre presentes, por me darem força nas horas de desânimo e pela eterna amizade.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma com a execução desse trabalho, meu sinceros agradecimentos!

*“Livros imortalizam pensamentos, sentimentos e
aspirações.
O tempo pode amarelar suas páginas, mas não
apagar sua essência”
Claudio Ravanini*

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
Referências bibliográficas	16
Capítulo 1: Anatomia dos órgãos vegetativos de três espécies de <i>Viguiera</i> (Asteraceae – Heliantheae) como subsídio para a taxonomia.....	20
1. Introdução.....	21
2. Material e métodos.....	22
2.1 <i>Material botânico</i>	22
2.2 <i>Estudos anatômicos</i>	22
3. Resultados	24
3.1 <i>Anatomia foliar</i>	24
3.2 <i>Anatomia do caule aéreo</i>	28
3.3 <i>Anatomia do sistema subterrâneo</i>	31
4. Discussão	38
5. Referências Bibliográficas	43
Capítulo 2: Composição química do óleo essencial dos órgãos vegetativos de três espécies de <i>Viguiera</i> (Asteraceae – Heliantheae).....	50
1. Introdução.....	51
2. Material e métodos	53
2.1 <i>Material vegetal</i>	53
2.2 <i>Extração do óleo essencial</i>	53
2.3 <i>Análise da composição química dos óleos essenciais</i>	54
3. Resultados	54
4. Discussão	63
5. Referências bibliográficas.....	66
Capítulo 3: Germinação de sementes de três espécies de <i>Viguiera</i> Kunth (Heliantheae – Asteraceae)	72
1. Introdução.....	74
2. Material e métodos	75
2.1 <i>Coleta e armazenamento das cipselas</i>	75
2.2 <i>Instalação do experimento e acompanhamento da germinação das sementes</i>	76

2.3 <i>Análise das sementes não germinadas</i>	77
2.4 <i>Teste de sanidade das sementes</i>	77
3. Resultados	77
3.1 <i>Experimento de germinação de sementes</i>	77
3.2 <i>Análise das sementes não germinadas</i>	78
3.3 <i>Teste de sanidade de sementes</i>	80
4. Discussão	80
5. Referências bibliográficas	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

RESUMO

Anatomia, análise do óleo essencial e germinação de sementes de três espécies de *Viguiera* Kunth (Heliantheae – Asteraceae)

A família Asteraceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com ampla distribuição e hábitos muito variados. O gênero *Viguiera* pertence à subtribo Heliantheae e conta com aproximadamente 180 espécies. No Brasil ocorrem 35 espécies e 27 dessas são endêmicas. Por se tratar de um gênero com muitos representantes, as relações filogenéticas não estão bem estabelecidas e estudos morfológicos e moleculares têm sido realizados com o objetivo de auxiliar a circunscrição do gênero. As espécies de *Viguiera* possuem potencial resinífero e as contempladas neste estudo são aromáticas em seu ambiente natural. Diversos estudos fitoquímicos têm destacado o potencial farmacológico de espécies do gênero, atribuído principalmente, à atividade das lactonas sesquiterpênicas e dos diterpenos. No entanto, estudos sobre a composição química dos óleos essenciais são escassos. A ocorrência das espécies do gênero *Viguiera* no Brasil se dá, principalmente, em regiões com inverno seco, devido à presença de um sistema subterrâneo espessado. O sistema subterrâneo das espécies incluídas neste estudo, *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*, consiste em um xilopódio, que apesar da capacidade gemífera, não possui capacidade de propagação vegetativa. As três espécies são muito semelhantes morfológicamente em estado vegetativo sendo diferenciadas principalmente por caracteres reprodutivos. Há registros na literatura de confusões na delimitação das mesmas. Além disso, *V. filifolia* e *V. trichophylla* constam na lista vermelha das espécies brasileiras como criticamente em perigo. Assim, os estudos anatômicos visaram contribuir com o levantamento de caracteres diagnósticos entre as três espécies. Os dados referentes à composição dos óleos essenciais também podem ser úteis do ponto de vista taxonômico, auxiliando na delimitação das espécies e ainda, no levantamento de possíveis compostos bioativos. Por fim, o estudo da germinação das sementes visou fornecer dados para futuros estudos de cultivo dessas espécies.

Palavras-chave: *Viguiera filifolia*, *Viguiera linearifolia*, *Viguiera trichophylla*, caracteres diagnósticos, quimiotaxonomia, propagação sexuada.

ABSTRACT

Anatomy, analysis of the essential oil and seed germination of three species of *Viguiera* Kunth (Heliantheae – Asteraceae)

Asteraceae is one of the largest families of angiosperms with wide distribution and habits varied. *Viguiera* genus is included in the Heliantheae subtribe and has approximately 180 species. In Brazil, there are 35 species and 27 are endemic. Given that this genus has many representatives, phylogenetic relationships are not well established and morphological and molecular studies have been conducted to help limit the genus. *Viguiera* species have resin potential and the species used in this study are aromatic in their natural environment. Several phytochemical studies have shown the pharmacological potential to *Viguiera* species, attributed mainly to the activity of sesquiterpene lactones and diterpenes. However, studies on the chemical composition of essential oils are rare. In Brazil, the *Viguiera* species occurs mainly in regions of dry winter, due the presence of a thickened underground system. The underground system of the species used in this study, *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* and *V. trichophylla* is represented by a xylopodium, incapable of vegetative propagation despite forming buds. The three species are morphologically very similar in vegetative state and could be differentiated only by reproductive features. In the literature, there is confusion in individuating them. In addition, *V. filifolia* and *V. trichophylla* are classified in the Brazilian Species list as critically endangered. Thus, anatomical studies aimed at contributing to obtain diagnostic features among the three species. The essential oil composition data could help in chemosystematics and in the identification of possible chemotherapeutic compounds. Finally, the study of seed germination aimed to provide information for future studies for the cultivation of these species.

Key-words: *Viguiera filifolia*, *Viguiera linearifolia*, *Viguiera trichophylla*, diagnostic characters, chemotaxonomy, sexual propagation.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae Bercht. & J.Presl (Compositae) é a maior família de plantas com 1620 gêneros e cerca de 23600 espécies (Stevens, 2001). Trata-se de uma família monofilética, caracterizada por plantas de hábitos variados, podendo ser ervas, subarbustos, árvores e raramente epífitas e lianas (Magenta, 2006), com flores arranjadas em um receptáculo e cercadas por brácteas, constituindo os capítulos e também pela presença de cipselas frequentemente portadoras de pápus (Funk et al., 2005; Bremer, 1994). Possui distribuição cosmopolita e é subdividida em 12 subfamílias, entre elas Asteroideae, a qual inclui a tribo Heliantheae (APG III, 2009; Panero & Funk, 2008; Bremer, 1994).

Heliantheae é a segunda maior tribo da família Asteraceae (Spring & Buschman, 1996), subdivide-se em 35 subtribos com 189 gêneros e aproximadamente 2500 espécies (Funk et al., 2005). Seus representantes são predominantemente americanos (Funk et al. 2005), com maior centro de diversificação no México central (Magenta, 2006; Cronquist, 1977).

Entre os maiores gêneros da tribo encontra-se *Viguiera* Kunth, com aproximadamente 180 espécies (APG III, 2009; Magenta, 2006; Bremer, 1994), exclusivamente americano e centros de diversidade no México, nos Andes e em planaltos brasileiros (Schilling et al., 2000). Trata-se de um grupo parafilético (Schilling et al., 2000; Schilling & Panero, 1991) e das 35 espécies que ocorrem no Brasil, 27 são endêmicas (Magenta et al., 2010).

O gênero se caracteriza por representantes perenes, sendo ervas anuais ou arbustos, com folhas opostas ou alternas, simples ou algumas vezes, pinatissectas com capítulos corimbiformes, paniculados ou solitários, radiados, envolvidos por brácteas involucrais em duas a sete camadas. As flores do raio podem ser femininas ou neutras, amarelas, cremes ou laranjas; as flores do disco geralmente são amarelas. Os frutos são cipselas obovada-oblongas coroadas por pápus com duas aristas intercaladas por escamas paleáceas (Bremer, 1994).

Entre as espécies brasileiras estão as contempladas nesse estudo, sendo elas *Viguiera filifolia* Sch. Bip. Ex Baker, *V. linearifolia* Chod. & Hassl. e *V. trichophylla* Dusén. Essas espécies, segundo classificação proposta por Blake (1918) estão incluídas no subgênero *Calanticaria*, série *Bracteatae*, seção *Trichophylla*. Seus representantes são ervas perenes delicadas virgadas, com hastes longas sem ramificações, com muitas folhas lineares a linear-

filiformes, revolutas e com brácteas involucrais em três séries, fortemente costadas na parte inferior, foliáceas na superior (Magenta 2006).

Indivíduos de *Viguiera filifolia* são ervas perenes cespitosas de 0,6 a 2 m altura, com resina odorífera e caule subterrâneo moderadamente espessado e raízes adventícias tuberosas (Figuras 1A-C). Podem ser encontrados no Brasil na região de Goiás, especificamente em Alto do Paraíso, em campo arenoso ou pedregoso (Magenta, 2006) em região de Cerrado. Flores e frutos ocorrem de dezembro a fevereiro (Bringel Jr. & Cavalcanti, 2009). Trata-se de uma espécie vulnerável de distribuição restrita e de tamanho populacional reduzido podendo ser afetada por atividades antrópicas ou eventos estocásticos em período muito curto de tempo, podendo se tornar uma espécie criticamente em perigo ou ainda extinta (Magenta, 2006).

Viguiera linearifolia possui representantes subarbuscivos de ramos aéreos eretos, de 1 a 2 m de altura, caule cilíndrico, glabro ou esparsamente estrigiloso, caule subterrâneo fortemente espessado e raízes adventícias com tuberosidades fusiformes na porção central e/ou na extremidade (Figuras 1D-F). A espécie pode ser encontrada no Brasil apenas na região de Ponta Porã, no Mato Grosso do Sul. Sua floração se dá no final da primavera e verão e a frutificação ocorre em novembro (Magenta, 2006).

Os indivíduos de *Viguiera trichophylla* são arbustos perenes de 1,2 a 2 m altura, resiníferos, portadores de ramos aéreos flexíveis, cilíndricos, estreitamente canaliculados, com caule subterrâneo fortemente espessado e raízes adventícias com tuberosidade fusiforme próxima a extremidade e às vezes na porção central (Magenta, 2006) (Figuras 1D-F). Floresce e frutifica de fevereiro a março ou raramente até junho. Ocorre em campos e bordas de capões preferencialmente úmidos, dos estados do Paraná e Santa Catarina (Magenta, 2006).

Devido às suas semelhanças morfológicas, *Viguiera trichophylla* já foi considerada conspecífica com *V. linearifolia* sob o nome de *Rhysolepis linearifolia* (Robinson & Moore, 2004) e *V. linearifolia* também foi confundida por Baker (1884) e Blake (1918) com *V. filifolia*.

Os poucos registros referentes à estrutura anatômica das espécies do gênero *Viguiera* estão contemplados em Magenta (2006) que realizou a revisão das espécies brasileiras. Já estudos sobre a composição química de diversas espécies são abundantes (Ambrósio et al., 2004; Spring et al., 2003; Marquina et al., 2001; Da Costa et al., 1996). Além disso, são encontrados trabalhos referentes ao acúmulo de frutanos em raízes tuberosas de espécies de *Viguiera* (Itaya et al., 2005; Figueiredo-Ribeiro, 1993; Isejima et al., 1991).

Diversos estudos apontam a importância de caracteres anatômicos para a taxonomia de espécies de Asteraceae (Fritz & Saukel, 2011; Adedeji & Jewoola, 2008; Castro et al., 1997). O estudo anatômico dos órgãos vegetativos de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* pode contribuir para a identificação de caracteres diagnósticos entre as espécies e assim, auxiliar na correta delimitação das mesmas.

Apesar de estudos a respeito da fitoquímica de diversas espécies de *Viguiera* serem comuns, estes reportam a utilização de extratos vegetais e relacionam a importância farmacológica do gênero principalmente às lactonas sesquiterpênicas e aos diterpenos (Carvalho et al., 2011; Nicolete et al., 2009; Arakawa et al., 2008; Ambrosio et al., 2004; Spring et al., 2003; Marquina et al., 2001; Da Costa et al., 1996). Não são encontrados estudos na literatura sobre a caracterização ou até mesmo utilização farmacológica dos óleos essenciais. O estudo da composição química dos óleos essenciais das espécies aqui apresentadas se faz importante, pois podem ser úteis do ponto de vista quimiotaxonômico para a delimitação das espécies e ainda, no levantamento de possíveis compostos bioativos.

A respeito das estratégias de propagação de espécies do gênero *Viguiera*, apenas para a espécie brasileira *Viguiera robusta* foi descrito o comportamento germinativo (Ruggiero & Zaidan 1997). Existe uma preocupação quanto à propagação das espécies nativas do gênero, pois *V. filifolia* e *V. linearifolia* constam na lista das espécies da flora brasileira como criticamente em perigo (Site Cria, 2011; Brasil, 2008) e apesar de *V. trichophylla* não constar na lista, a literatura referente a essa espécie também é escassa. Com isso, estudos sobre a reprodução de espécies vegetais são importantes para auxiliar na proposta de estratégias que garantam o desenvolvimento sustentado (Gomes & Fernandez, 2002) e a conservação dessas espécies.

Pelas razões apresentadas, o presente trabalho objetivou descrever a morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* a fim de levantar caracteres anatômicos diagnósticos entre elas, avaliar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais dos órgãos vegetativos das três espécies e comparar o perfil químico a fim de determinar se existem diferenças que permitam caracterizar quimicamente as espécies e, por fim, estudar o comportamento germinativo e determinar a faixa ideal de temperatura para a germinação das sementes das três espécies.

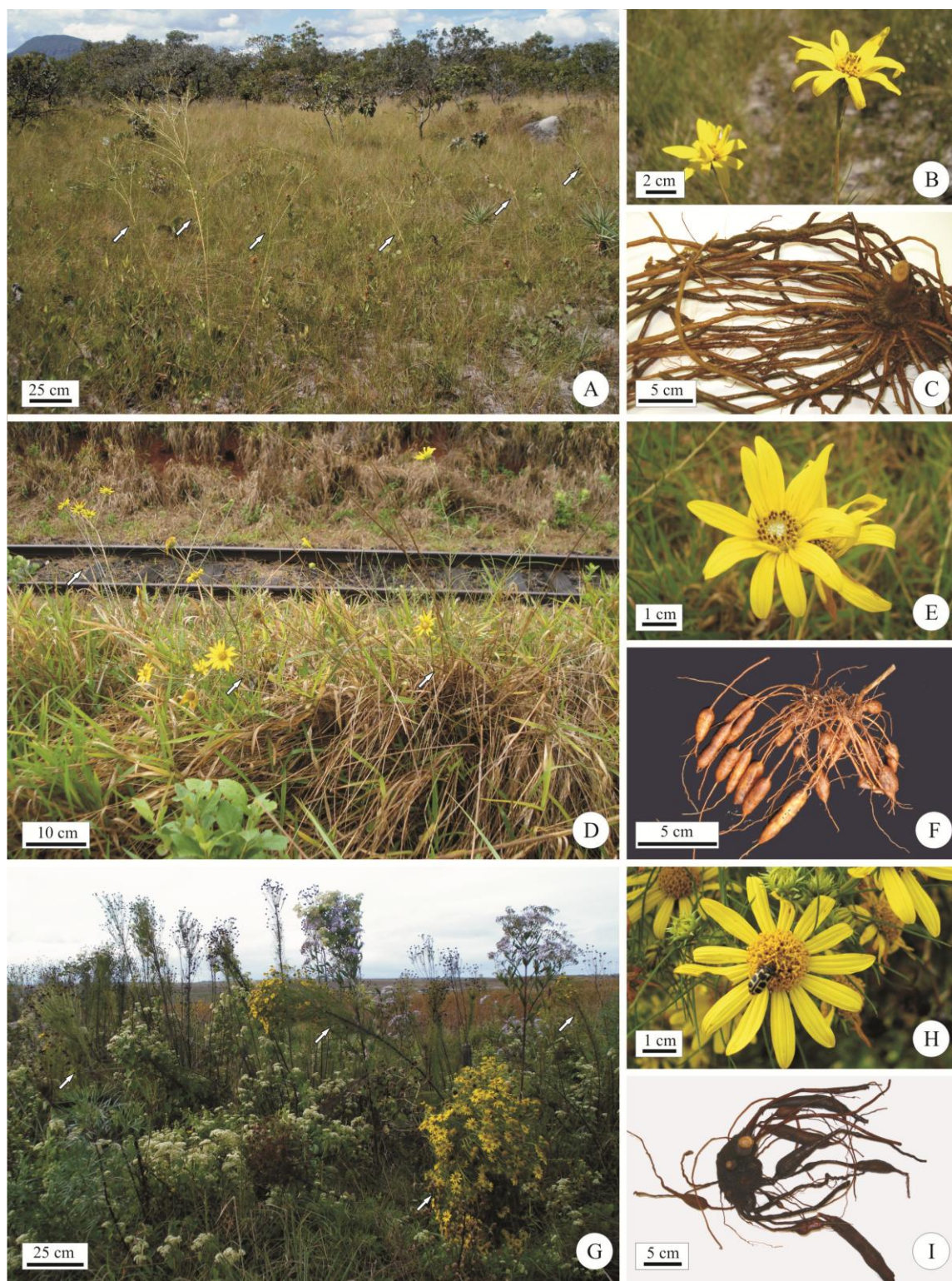


Figura 1. A-C. *Viguiera filifolia*. D-F. *Viguiera linearifolia*. G-I. *Viguiera trichophylla*. A, D, G. Visão geral da planta no ambiente natural. B, E, H. Detalhe da inflorescência em capítulo. C, F, I. Visão geral do sistema subterrâneo constituído por xilopódio e raízes adventícias. As setas em A, D e G indicam os indivíduos de cada espécie.

Referências bibliográficas

- Ambrosio, S.R.; Schoor, K. & Da Costa, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 221-224. 2004.
- Adedeji, O. & Jewoola, O.A. Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 36(2): 7-16. 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. A journal of biosciences* 63: 533-538. 2008.
- Baker, J.G. Compositae IV: Helianthoideae. In C.F.P. Martius & A.W. Eichler (Eds.) *Flora Brasiliensis Monachii. Typografia Regia* 6(3): 135-268. 1884.
- Blake, S.F. A revision of the genus *Viguiera*. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* 51: 1-205. 1918.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa nº 6. Setembro de 2008.
- Bremer, K. *Asteraceae: cladistics and classification*. Portland: Timber Press, 1994, 752p.
- Bringel Jr., J.B. De A. & Cavalcanti, T.B. Heliantheae (Asteraceae) na Bacia do Rio Paraná (Goiás, Tocantins), Brasil. *Rodriguésia* 60(3): 551-580. 2009.
- 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* 16(1): 543-551. 2011.
- 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* 20: 163-174. 1997.
- Cronquist, A. The Compositae revisited. *Brittonia* 29: 137-153. 1977.
- Da Costa, F.B.; Vichnewski, W. & Herz, W. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. *Biochemical Systematics and Ecology* 24(6): 585-587. 1996.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 5(2): 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* 53(1): 62-72. 2011.

Funk, V.A., Bayer, R.J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., Garcia-Jacas, N., Susanna, A. & Jansen, R.K. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biologiske Skrifter* 55: 343-374. 2005.

Gomes, V. & Fernandez, G.W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica* 16: 421-427. 2002.

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* 119: 149-154. 1991.

Itaya, N.M.; Vaz, A.P.A.; Kerbauy, G.B.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas *in vitro* de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica* 19(3): 579-586. 2005.

Magenta, M.A.G. *Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da USP. 2006.

Magenta, M.A.G.; Pirani, J.R. & Mondin, C.A. Novos táxons e combinações em *Viguiera* (Asteraceae - Heliantheae). *Rodriguésia* 61(1): 1-11. 2010.

Marquina, S.; Maldonado, N.; Garduño-Ramírez, M.L.; Aranda, E.; Villarreal, M.L.; Navarro, V.; Bye, R.; Delgado, G. & Alvarez, L. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. *Pytochemistry* 56: 93-97. 2001.

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* 16: 904-915. 2009.

Panero, J.L. & Funk, V.A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 757-782. 2008.

Robinson, H. & Moore, A.J. New species and new combinatios in *Rhysolepis* (Heliantheae – Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 117(3): 423-446. 2004.

Ruggiero, P.G.C. & Zaindan, L.B.P. Estudos de desenvolvimento de *Viguiera robusta* Gardn., uma Asteraceae do Cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 20: 1-9. 1997.

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* 57(3): 323–332. 2000.

Schilling, E.E. & Panero, J.L. Evidence for a close relationship between *Iostephane* and *Viguiera* (Asteraceae-Heliantheae). *American Journal of Botany* 78(8): 1054-1062. 1991.

Site Cria. Centro de Referência de Informação Ambiental. Disponível em: <http://names.cria.org.br/>. Acesso em 18-07-2011.

Spring, O. & Buschmann, H. A chemotaxonomiv survey of sesquiterpene lactones in the Helianthinae (Compositae). *Compositae: Systematics* 1: 307-316. 1996.

Spring, O.; Zipper, R.; Conrad, J.; Vogler, B.; Klaiber, I. & Da Costa, F.B. Sesquiterpene lactones from glandular trichomes of *Viguiera radula* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry* 62: 1185-1189. 2003.

Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007 [and more or less continuously updated since]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. (Accessed jan, 30, 2012).

Capítulo 1:
Anatomia dos órgãos vegetativos de três espécies de
***Viguiera* (Asteraceae – Heliantheae) como subsídio para**
a taxonomia

Anatomia dos órgãos vegetativos de três espécies de *Viguiera* (Asteraceae – Heliantheae) como subsídio para a taxonomia

Resumo: O gênero *Viguiera* é um dos maiores da tribo Heliantheae, com aproximadamente 180 espécies. No Brasil, 27 espécies são endêmicas. As relações filogenéticas dentro do gênero não estão bem estabelecidas e estudos baseados apenas na morfologia externa muitas vezes são insuficientes. *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* são muito semelhantes em estado vegetativo, sendo diferenciadas principalmente por caracteres reprodutivos. O objetivo desse estudo foi descrever a morfoanatomia dos órgãos vegetativos aéreos e subterrâneos a fim de levantar caracteres anatômicos de valor diagnóstico entre as espécies. Indivíduos de *V. filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* foram coletados em Alto Paraíso de Goiás/GO, em Ponta Porã/MS e em Palmeira/PR, respectivamente. As amostras de folhas, caules aéreos, xilopódios e raízes foram fixadas em FAA₅₀ (1:1:18 formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 50%), infiltradas em historresina, seccionadas em micrótomo rotativo, coradas e 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 desidratadas em série etílica e secas pelo método do ponto crítico de CO₂, afixadas em suporte metálico e cobertas com ouro. Em todos os órgãos analisados foi possível estabelecer um grupo de caracteres que podem auxiliar na delimitação das espécies, principalmente os relacionados à ocorrência e posição das estruturas secretoras. As espécies *V. filifolia* e *V. trichophylla* são muito semelhantes tanto na morfologia externa quanto na morfologia interna, principalmente em relação aos caracteres foliares, porém foi possível estabelecer caracteres únicos para cada uma delas. *V. linearifolia* se confirma como um táxon bem definido pelas diferenças anatômicas aqui apresentadas.

Palavras-chave: *Viguiera filifolia*, *Viguiera linearifolia*, *Viguiera trichophylla*, caracteres diagnósticos, morfoanatomia, estruturas secretoras.

1. Introdução

O gênero *Viguiera* é um dos maiores da tribo Heliantheae, com aproximadamente 180 espécies. No Brasil, é representado por 35 espécies (Magenta et al., 2010a) e 27 dessas são endêmicas (Magenta, 2006). O gênero caracteriza-se por plantas perenes, ervas anuais ou arbustos, folhas opostas ou alternas, simples ou algumas vezes, pinatissectas, capítulos corimbiformes, paniculados ou solitários, radiados, envolvidos por brácteas involucrais em duas a sete camadas. As flores do raio podem ser femininas ou neutras, amarelas, cremes ou laranjas; as flores do disco geralmente são amarelas. Os frutos são cipselas obovada-oblongas coroadas por pápus com duas aristas intercaladas por escamas paleáceas (Bremer, 1994).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer as relações filogenéticas dentro do gênero, principalmente relacionados à caracteres morfológicos (Magenta et al., 2010a; Magenta, 2006; Panero & Schilling, 1988; Robinson, 1977) e moleculares (Schilling et al., 2000, 1994; Schilling & Panero, 1996, 1991; Schilling & Jansen, 1989), os quais têm demonstrado que *Viguiera* trata-se de um gênero parafilético. No entanto, Schilling & Panero (1996) ressaltam que estudos baseados apenas na morfologia externa muitas vezes são insuficientes.

As espécies contempladas nesse estudo, *Viguiera filifolia* Sch. Bip. Ex Baker, *V. linearifolia* Chod. & Hassl. e *V. trichophylla* Dusén pertencem a seção Trichophylla, segundo a classificação proposta por Blake (1918), que se caracteriza por ervas perenes delicadas virgadas, resiníferas e aromáticas, com hastes longas sem ramificações, com muitas folhas lineares a linear-filiformes, revolutas e com brácteas involucrais em três séries, fortemente costadas na parte inferior, foliáceas na superior (Blake, 1918; Magenta, 2006). Em estado vegetativo, essas espécies são muito semelhantes, sendo diferenciadas principalmente por caracteres reprodutivos (Magenta et al., 2010b; Magenta, 2006). Robinson & Moore (2004) considerou *V. trichophylla* co-específica com *V. linearifolia* sob o nome de *Rhysolepis linearifolia* (Cav.) H. Rob & AJ Moore. *Viguiera linearifolia* foi também confundida por Baker (1884) e Blake (1918) com *V. filifolia*. Dessa forma, os estudos anatômicos dos órgãos vegetativos podem trazer dados adicionais às características morfológicas, podendo auxiliar na resolução de problemas taxonômicos (Metcalf & Chalk, 1983).

Estudos anatômicos em espécies da família Asteraceae têm apontado sua importância para a taxonomia dessas espécies (Fritz & Saukel, 2011; Adedeji & Jewoola, 2008; Castro et al., 1997;

Wagenitz, 1976; Metcalfe & Chalk, 1950; Solereder, 1908). Além disso, as estruturas secretoras amplamente distribuídas em espécies dessa família (Lotocka & Osinska, 2010; Cury & Appezzato-da-Glória, 2009; Appezzato-da-Glória et al., 2008b; Gregio & Moschetta, 2006; Lersten & Curtis, 1988) também possuem grande valor diagnóstico. Tais estruturas variam amplamente quanto à sua morfologia e anatomia e também apresentam considerável constância quanto à posição em que ocorrem nas espécies (Fahn, 2000; Castro et al., 1997; Kelsey, 1984; Metcalfe & Chalk, 1950; Solereder, 1908).

Os poucos registros referentes à estrutura anatômica das espécies do gênero *Viguiera* estão contemplados em Magenta (2006), que realizou a revisão das espécies brasileiras, porém ainda há dúvidas na correta delimitação das mesmas. Assim, o objetivo desse trabalho foi descrever a morfoanatomia dos órgãos vegetativos aéreos e subterrâneos de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* a fim de levantar caracteres anatômicos de valor diagnóstico entre as espécies.

2. Material e métodos

2.1 Material botânico

As amostras de *Viguiera filifolia* e *V. linearifolia* foram coletadas em Alto Paraíso de Goiás-GO (maio/2010) (S 25°22'53,4" e W 49°48'24,0") e Ponta Porã/MS (22°21'52,7"S e 55°43'58,1"W) (outubro/2010), respectivamente, ambas em região de Cerrado. Já *V. trichophylla* foi coletada em Palmeira/PR (abril/2010) (S 25°22'53,4" e W 49°48'21,0"), em região de campo úmido. Apenas a espécie *V. filifolia* foi coletada em região preservada (dentro do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros). As outras espécies foram encontradas em áreas de vegetação que sofrem frequentes alterações por ações antrópicas.

As espécies foram identificadas pela especialista Profa. Dra. Mara Angelina Galvão Magenta e as exsicatas foram registradas e incorporadas ao acervo do Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESA) da Universidade de São Paulo sob os números ESA111848, ESA113164 e ESA111850.

2.2 Estudos anatômicos

As análises anatômicas das espécies foram realizadas com os órgãos vegetativos, sendo que para cada órgão foram realizadas três repetições. Os órgãos analisados foram as folhas completamente expandidas, caules aéreos, xilopódios e raízes.

Todo material proveniente do campo foi fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18) (Johansen, 1940) por dois dias e levado à bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Posteriormente, foi desidratado em série etílica crescente até etanol 70%, no qual foi estocado.

Como todo material coletado se encontrava em fase reprodutiva, para a análise das folhas foram escolhidas folhas das regiões nodais localizadas abaixo da ramificação das inflorescências. Para isso, regiões do terço mediano e ápice foliar foram seccionadas transversal e longitudinalmente.

Para o caule aéreo foram escolhidas três regiões correspondentes à região mais jovem (caule fino), região mediana e região próxima ao solo (caule espesso), de acordo com o tamanho do indivíduo estudado.

Para o sistema subterrâneo foram analisados o xilopódio e as raízes adventícias emitidas por esse órgão. Para o sistema radicular, raízes laterais e raízes adventícias com diferentes diâmetros foram seccionadas a fim de analisar o processo de tuberização desses órgãos. Essas raízes foram seccionadas transversal e longitudinalmente.

As amostras de todos os órgãos foram desidratadas até etanol 100% e incluídas em hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin®) para a obtenção de blocos. Esses foram seccionados transversal e longitudinalmente a 6 µm de espessura em micrótomo rotatório. O material foi corado com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico pH 4,5 (Sakai, 1973) e as lâminas montadas em resina sintética “Entellan®” (Merck®).

Para as amostras de folhas foram realizadas também secções transversais à mão livre com auxílio de lâmina de barbear e para caules e raízes em micrótomo de deslize, com 30-40 µm de espessura. Essas secções foram utilizadas para os testes histoquímicos e para confecção de lâminas semipermanentes e permanentes. Para as lâminas semipermanentes, as secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 20% (v/v) da solução comercial à 2,5% (p/p), lavadas em água destilada, coradas com safranina e azul de astra (Bukatsch, 1972) e montadas em gelatina glicerizada. Para as lâminas permanentes, após a coloração, as secções foram desidratadas em série etílica, acetato de butila 50% e 100% e montadas em resina sintética “Entellan®”.

Os testes histoquímicos foram realizados utilizando-se cortes obtidos a partir de material incluído em historesina e a partir de material cortado à mão e em micrótomo de deslize. Foram empregados os seguintes reagentes e corantes: Sudan IV para substâncias lipofílicas (Jensen,

1962), Sudan black B para lipídeos totais (Pearse, 1968); cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen, 1940), vermelho de rutênio para substâncias pécicas, polissacarídeos e mucilagem ácida (Johansen, 1940), cloreto de zinco iodado para detecção de grãos de amido (Strasburger, 1913), floroglucina em meio ácido para detecção de lignina (Johansen, 1940) e reagente de Nadi, para detecção de essências e óleos resínicos (David & Carde, 1964). Para detecção dos cristais de inulina as amostras foram analisadas sob luz polarizada em microscopia óptica.

Os registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio trinocular (modelo Leica DMLB) com câmera de vídeo (modelo Leica DC 300 F) e microcomputador acoplados.

Para a análise da superfície, amostras de folhas e caule aéreo das três espécies foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica até etanol absoluto, secas pelo método do ponto crítico de CO₂ (Horridge & Tamm, 1969) no equipamento Balzers modelo CPD 030, montadas sobre suportes de alumínio e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm no equipamento Balzers modelo SCD 050. As observações e eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura LEO modelo VP 435, operado a 20 kV, com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

3. Resultados

3.1 Anatomia foliar

As folhas das três espécies são simples, sésseis e lineares. As folhas de *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla* apresentam contorno cilíndrico em secção transversal com uma reentrância na face adaxial em *V. filifolia* e na face abaxial em *V. trichophylla*, não sendo possível distinguir o limite entre as faces adaxial e abaxial (Figuras 1A, 1C). A folha de *V. linearifolia* em secção transversal possui margem revoluta, em formato de “T” (Figura 1B). Ao contrário das outras duas espécies, nessa podemos identificar claramente as faces adaxial e abaxial do limbo foliar.

A lâmina foliar das três espécies possui apenas uma nervura central aparente, porém quando examinadas ao estereomicroscópio observa-se que em *Viguiera trichophylla* e *V. linearifolia* a formação de ramificação é intensa enquanto em *V. filifolia* ocorrem poucas ramificações. Essa diferença também pode ser observada em secções paradérmicas da lâmina foliar (Figuras 1D-F).

Em vista frontal, a epiderme de *Viguiera filifolia* (Figura 1G) apresenta células com paredes levemente sinuosas enquanto *V. linearifolia* (Figura 1H) e *V. trichophylla* possuem células de

paredes retas. Os estômatos para as três espécies são do tipo anomocítico, restritos às regiões do mesofilo (Figuras O-Q) e situados no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 1P). Em *V. linearifolia* os estômatos ocorrem em ambas as faces, sendo que apenas na face abaxial as células-guarda estão projetadas em relação às demais células da epiderme (Figuras 1O-Q). A epiderme das folhas das três espécies é uniestratificada, recoberta por cutícula delgada e algumas células apresentam conteúdo fenólico. As paredes das células epidérmicas possuem espessamento parietal em pectina, evidenciado pelo vermelho de rutênio (dados não ilustrados), principalmente nas paredes periclinais externas. Apenas a face abaxial de *V. linearifolia* apresenta células de paredes delgadas (Figura 1P).

O indumento das folhas é composto por dois tipos de tricomas tectores, aqui denominados tipos I e II, e por tricomas glandulares. Para as três espécies foram visualizados tricomas tectores de três células (tipo I) (Figuras 1I-L), sendo as duas basais maiores em formato cônico e a célula terminal com ápice agudo, com paredes contendo ornamentações verrucosas chamadas bossas. Em *Viguiera filifolia* (Figura 1J) esses tricomas são observados nas margens das folhas, em *V. trichophylla* (Figura 1L) na região da nervura central e em *V. linearifolia* (Figuras 1I,K) estão distribuídos por toda a lâmina foliar (Figura 1M). O tricoma tector tipo II está presente nas folhas das três espécies. Esses são unisseriados, multicelulares e filamentosos (Figuras 1M-N). Em *V. linearifolia* estão presentes em grande quantidade recobrimdo as criptas formadas pelas margens revolutas das folhas (Figura 1B) e suas paredes são lignificadas. Em *V. filifolia* e *V. trichophylla* esses tricomas são escassos e aparecem murchos e, ou sem todas as células na região da nervura central em folhas adultas.

Os tricomas glandulares são encontrados apenas em *Viguiera linearifolia*, na face abaxial da folha (Figuras 1M-N). São capitados, bisseriados, formados por cinco pares de células secretoras que correspondem à cabeça e duas células basais. O exsudato de natureza lipofílica apresenta óleos essenciais e acumula-se no espaço subcuticular, restrito às duas células distais da cabeça.

O mesofilo é homogêneo composto por duas a três camadas de parênquima paliçádico de células alongadas em *Viguiera filifolia* (Figura 1O) e três a cinco camadas de células mais curtas em *V. trichophylla* (Figura 1Q). Já em *V. linearifolia* (Figura 1P) o mesofilo é dorsiventral, apresentando quatro camadas de células de parênquima paliçádico e duas a três camadas de

parênquima lacunoso, sendo que o parênquima paliçádico prolonga-se até as laterais da nervura central (Figura 1S).

Na região da nervura central (Figuras 1R-T) as células epidérmicas são quadrangulares e menores que as demais, e o espessamento parietal em pectina se mantêm nas três espécies. Abaixo da epiderme em ambos os lados observam-se de duas a três camadas de colênquima, sendo que em *Viguiera linearifolia* é possível observar uma projeção na face adaxial (Figura 1B).

A nervura central de *Viguiera filifolia* (Figura 1R) apresenta um único feixe vascular, do tipo colateral, envolto por bainha com 4-5 camadas mais internas de células esclerificadas e 2-3 camadas externas de células parenquimáticas. Dois canais secretores de grande porte estão localizados no parênquima próximos ao feixe vascular central. *V. trichophylla* (Figura 1T) difere de *V. filifolia* por possuir a bainha de células esclerificadas do feixe central descontínua, por apresentar canais secretores no floema primário e pelo número de canais secretores no parênquima próximo ao feixe central ser igual a três. Em *V. linearifolia* (Figura 1S) visualiza-se um feixe colateral central maior e dois feixes colaterais de menor calibre. No parênquima há três canais secretores de pequeno porte, sendo um voltado para a face adaxial e dois para a face abaxial.

Para as três espécies são observados feixes colaterais menores posicionados lateralmente à nervura central, imersos no mesofilo, que podem apresentar bainha de células parenquimáticas com extensão que interrompem o parênquima paliçádico (Figuras 1O-Q). A essas extensões de bainha estão associados canais secretores, que em *V. filifolia* são vistos apenas voltados para a face adaxial, em *V. trichophylla*, próximos às duas faces e em *V. linearifolia*, as extensões da bainha atingem ambas as faces da epiderme, mas os canais secretores são vistos apenas próximos a face adaxial.

A natureza do exsudato dos canais secretores das três espécies é lipofílica, confirmada pelo Sudan IV e se caracteriza principalmente pela presença de óleos essenciais, confirmada pelo reagente de Nadi.

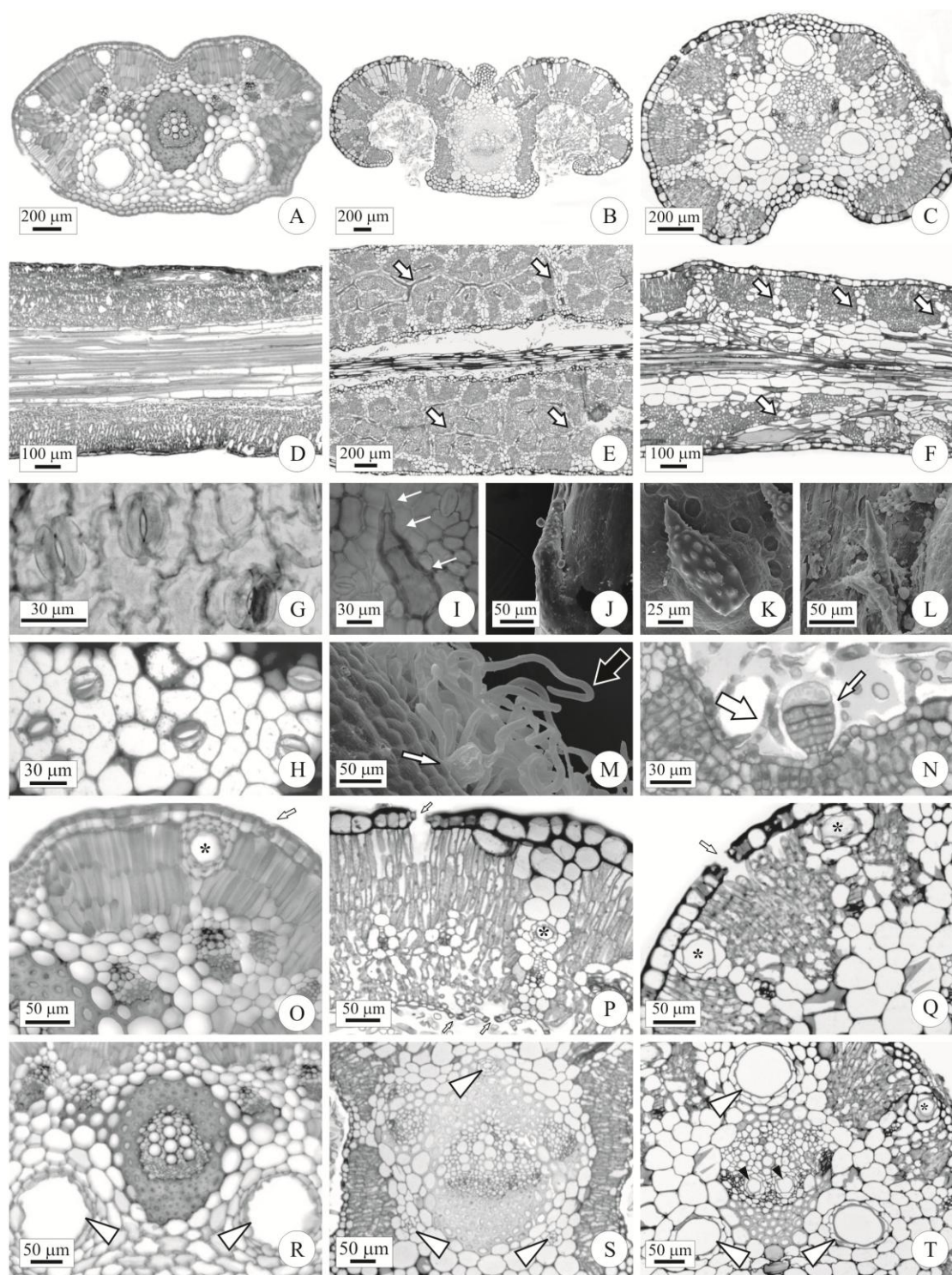


Figura 1. A,D,G,J,O,R. *Viguiera filifolia*. B,E,H,I,K,M,N,P,S. *V. linearifolia*. C,F,L,Q,T. *V. trichophylla*. A-C. Contorno da folha em secção transversal. D-F. Secção paradérmica da folha. Setas indicam ramificações das nervuras. G-H. Paredes das células epidérmicas em vista frontal. I-N. Tipos de tricomas. I-L. Tector Tipo I. M-N. Tector tipo II (seta maior) e glandular (seta menor). O-Q. Detalhe do parênquima paliádico e nervuras laterais. Estômatos indicados por setas. R-T. Nervura central. Setas brancas = canais secretores na nervura central; * = canais secretores nas extensões da bainha das nervuras laterais. Setas pretas = canais secretores no floema primário.

3.2 Anatomia do caule aéreo

O caule das três espécies é cilíndrico em secção transversal (Figuras 2A-C). A estrutura primária apresenta epiderme uniestratificada com células tabulares de paredes periclinais externas espessas e cutícula delgada (Figura 2B). Observam-se tricomas tectores do tipo I e II e os tricomas glandulares descritos para as folhas na superfície do caule jovem de *Viguiera linearifolia* (Figura 2D). Em *Viguiera trichophylla* e em *V. filifolia* são observados raros tricomas do tipo I. O córtex é constituído por 2-3 camadas de colênquima na região subepidérmica e 4-5 camadas de parênquima em *V. filifolia* (Figura 2A), 2-3 camadas de colênquima e 2-3 camadas de células parenquimáticas em *V. trichophylla* (Figura 2C) e 3-4 camadas de colênquima, 6-7 camadas de parênquima em *V. linearifolia* (Figura 2B), sendo delimitado internamente pela endoderme com estrias de Caspary. Em *V. linearifolia* a endoderme apresenta grãos de amido, caracterizando uma bainha amilífera (Figura 2E). Na região parenquimática do córtex estão imersos canais secretores, de epitélio simples ou multisseriado e de diâmetro variável. A disposição desses canais é alternada às calotas de fibras pericíclicas e em *V. trichophylla* (Figura 2C) esses canais são mais frequentes que nas demais espécies.

No cilindro vascular de *Viguiera filifolia* (Figura 2F) e *V. trichophylla* o periciclo oposto ao floema primário forma uma calota de fibras (Figuras 2F-G) e na região interfascicular apresenta várias camadas de células que se lignificam com o desenvolvimento (Figura 2N). Em *V. linearifolia*, também formam-se as calotas pericíclicas opostas ao floema primário (Figura 2G), porém, na região interfascicular o periciclo é formado por uma única camada de células não lignificadas, que pode ser interrompida por células de floema primário. Nas três espécies os feixes colaterais são abertos (Figuras 2F-G), separados por parênquima interfascicular. Observam-se canais secretores no floema primário em *V. filifolia* e *V. trichophylla* (Figura 2F) e a formação de novos canais no parênquima das proximidades do xilema primário (Figura 2H). A medula é parenquimática e nas proximidades dos feixes vasculares ocorrem canais secretores de diâmetro variável, com epitélio unisseriado (Figuras 2I,T).

Não há aumento expressivo em diâmetro em nenhuma das regiões nos caules de *Viguiera filifolia* (Figura 2M) e em *V. linearifolia* (Figura 2P). Nas três espécies, a estrutura secundária do caule mantém a epiderme, embora em *V. linearifolia* sejam observadas

divisões periclinais nas camadas subepidérmicas (Figura 2Q). Para as três espécies visualizam-se lenticelas (Figura 2J), cujas células acumulam compostos fenólicos. Células isoladas no córtex se lignificam (Figura 2K) e em *V. linearifolia* formam-se grupos de células lignificadas (Figura 2L). Nas células da endoderme opostas às calotas de fibras pericíclicas ocorrem espessamentos parietais pouco conspícuos em suberina.

Para as espécies *Viguiera filifolia* (Figuras 2M-N) e *V. trichophylla*, no cilindro vascular da estrutura secundária (Figuras 2M-O), o periciclo já está completamente esclerificado (Figura 2N). As porções fasciculares e interfasciculares do câmbio possuem atividades distintas, sendo que a região fascicular do câmbio produz xilema e floema secundários com todos os elementos do sistema axial, além de raios, enquanto a região interfascicular produz apenas raios, cujas células lignificam tanto no floema quanto no xilema secundários (Figura 2M). A atividade do câmbio fascicular é mais pronunciada em *V. trichophylla* que em *V. filifolia*. As células do parênquima interfascicular alongam-se no sentido periclinal afastando os feixes vasculares (Figura 2O). Além disso, as células do parênquima perimedular alongam-se no sentido anticlinal e dividem-se aumentando o número de camadas de células da medula e, conseqüentemente o diâmetro do órgão, principalmente em *V. trichophylla* (Figura 2O). Há canais secretores na medula das três espécies (Figura 2T).

Já para *V. linearifolia* (Figuras 2P-S), o periciclo não se esclerifica na região interfascicular. As porções do câmbio fascicular e interfascicular apresentam atividade idêntica (Figura 2R) e contribuem em igual proporção em células axiais e radiais do xilema e do floema secundários para o crescimento em espessura do caule (Figura 2P). O câmbio produz novos canais secretores no floema (Figuras 2R-S). Algumas células da periferia da medula aumentam de tamanho, porém diferentemente das demais espécies, não há aumento significativo da medula.

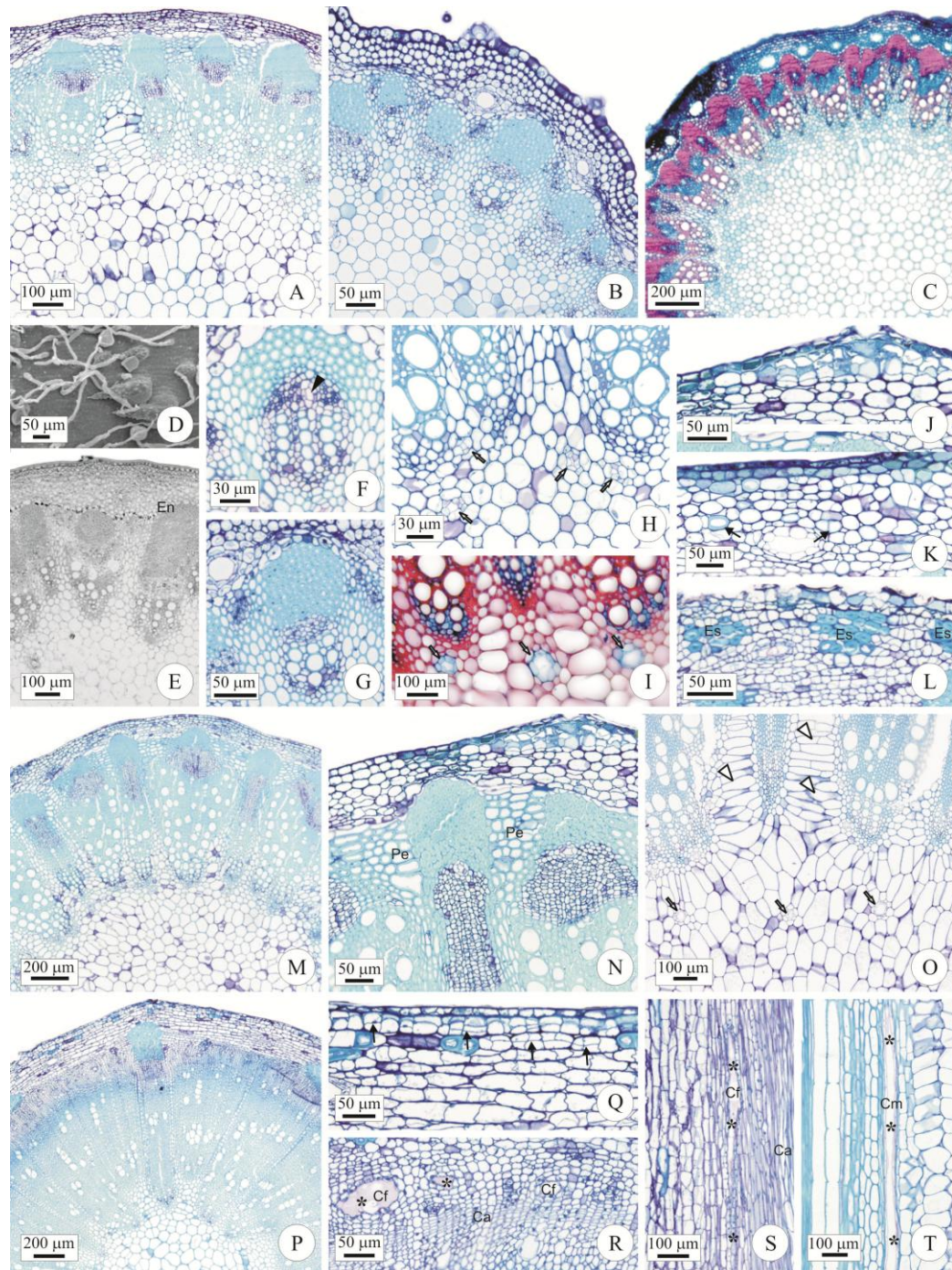


Figura 2. A,F,J,M,N. *Viguiera filifolia*. B,D,E,G,L,P,Q,R,S. *V. linearifolia*. C,H,I,K,O,T. *V. trichophylla*. A-C. Secção transversal do caule jovem. D. Tricomas na superfície caulinar. E. Bainha amilífera. F-G. Feixes vasculares. F. Com canal secretor no floema primário (seta). G. Sem canal secretor no floema primário. H-I. Canais secretores na medula (setas). J-L. Detalhe do córtex. Setas em K, esclereides isolados. M-T. Secções transversais do caule adulto, na região próxima ao solo. N. Detalhe do periciclo lignificado. O. Ampliação dos raios por aumento da medula. Cabeça de seta indicam alongamento nas células do parênquima interfascicular. Setas, canais perimedulares. Q. Divisões periclinais (setas) nas camadas subepidérmicas. R. Câmbio vascular. S. Canal secretor no floema secundário. T. Canal secretor na medula. Ca = câmbio vascular; Cf = canal secretor floemático; Cm = canal secretor medular; En = endoderme; Es = esclereides; Pe = periciclo; * = lume do canal secretor em R, S,T.

3.3 Anatomia do sistema subterrâneo

O sistema subterrâneo das três espécies é formado por um xilopódio lenhoso (Figura 3A) e por raízes adventícias e suas laterais (Figuras 4A-C). Esse órgão está localizado nas camadas superficiais do solo e apresenta gemas (Figura 3A), muitas delas axilares (Figura 3C), as quais correspondem às gemas presentes nas bases dos ramos emitidos em períodos anteriores do desenvolvimento. Possui estrutura anatômica complexa, devido à auto-enxertia natural entre os ramos caulinares emitidos nos diferentes períodos de desenvolvimento do órgão (Figura 3B).

O revestimento é epidérmico nos setores correspondentes às bases dos ramos remanescentes, como visto em *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla* (Figura 3D), porém nos setores de maior diâmetro, onde ocorrem as auto-enxertias, o revestimento é constituído por um estrato de células de paredes suberizadas (Figura 3E) resultantes de divisões periclinais das células da camada subepidérmica (Figura 3D) ou das camadas de células das regiões mais internas do córtex (Figura 3D). Em *V. trichophylla*, as duas camadas mais externas desse novo revestimento acumulam compostos fenólicos (Figura 3D). Em *V. linearifolia* e *V. trichophylla* são observados espaços internos secretores entre as camadas de células que compõem o revestimento e a endoderme (Figura 3F).

No cilindro vascular, o periciclo é uniestratificado em *V. linearifolia* (Figura 3F) e multiestratificado em *V. filifolia* e *V. trichophylla* formando, em alguns setores, grupos de esclereides (Figuras 3F-H). No floema secundário, apenas no sistema axial são observados canais secretores e grupos de esclereides (Figuras 3F-H). Em *V. linearifolia* os raios são amplos e dessa forma os canais e as esclereides estão posicionados mais distantes entre si do que nas outras duas espécies (Figura 3H). O xilema secundário é bem desenvolvido nas três espécies e com alto grau de lignificação das células condutoras (Figura 3G-H), principalmente em *V. filifolia*. É possível visualizar muitos elementos condutores obstruídos por tilos (Figura 3I). O xilema primário apresenta maturação centrífuga (Figura 3G, detalhe), o que confirma a natureza caulinar da estrutura. No centro do órgão encontra-se a medula parenquimática (Figura 3I) ou parcialmente esclerificada, como em *V. filifolia*, e é possível observar cavidades secretoras perimedulares nas três espécies (Figura 3I).

São observados frutanos do tipo inulina no cilindro vascular apenas em *V. trichophylla* (Figura 3J). Estes ocorrem no interior de células parenquimáticas dos raios e no interior de elementos de vaso.

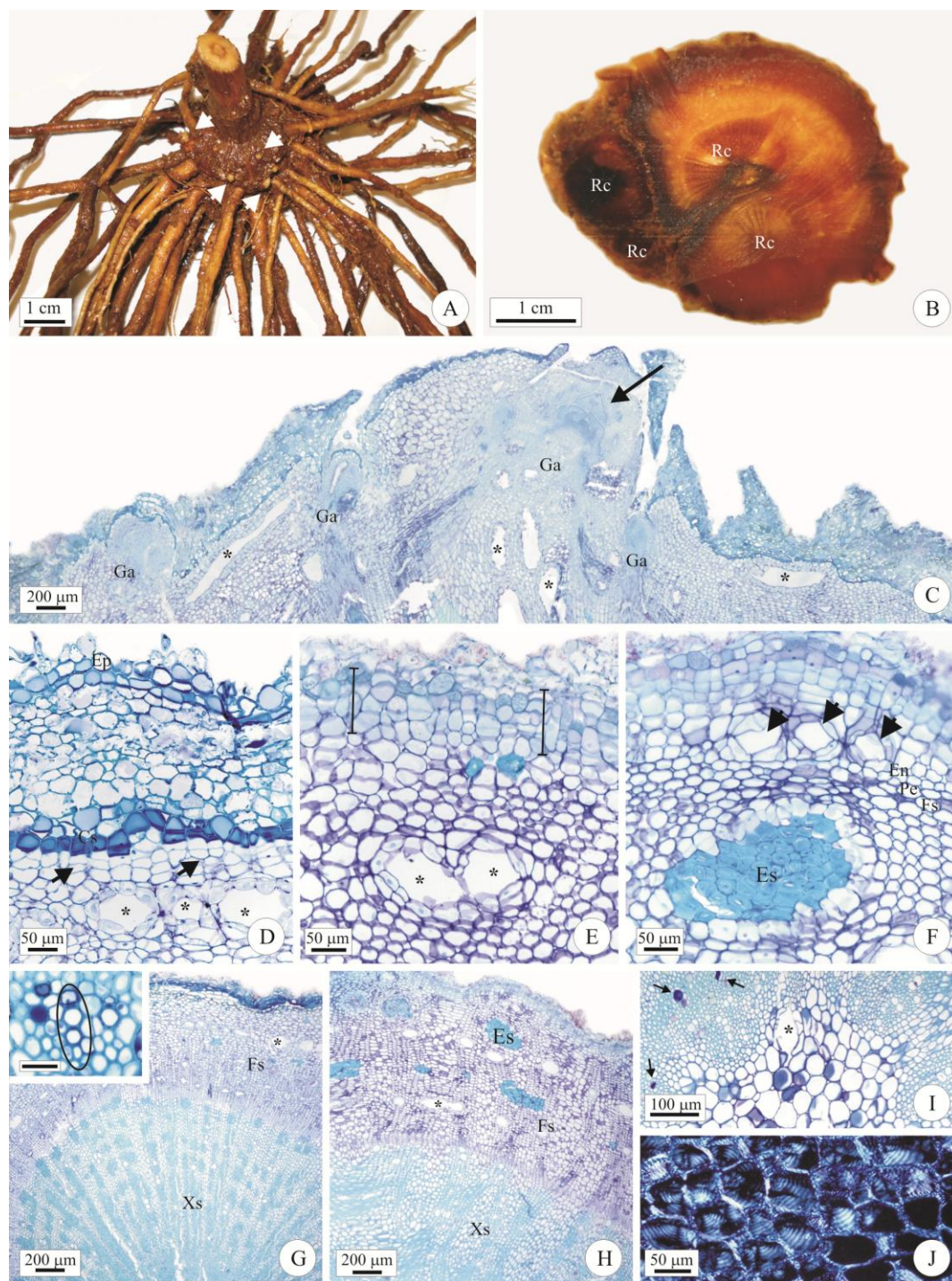


Figura 3. A. *Viguiera filifolia*. B,E,F,H,I. *V. linearifolia*. C,D,G,J. *V. trichophylla*. A. Sistema subterrâneo com gemas adventícias (setas). B. Auto-enxertia dos ramos caulinares. C. Gema axilar que iniciou o desenvolvimento (seta) com suas gemas axilares. D-E. Revestimento do órgão, setas indicam as divisões periclinais. Em (E) as barras delimitam as células suberizadas que compõem o revestimento. F. Espaços secretores abaixo do revestimento (setas). G-H. Visão geral da estrutura do xilopódio. Detalhe em (G) mostra maturação centrífuga do xilema primário. Barra do detalhe = 50 μ m. I. Medula parenquimática, setas indicam vasos obstruídos por tilos. J. Cristais de inulina. Cs = células suberizadas; En = endoderme; Es = esclereides; Ep = epiderme; Fs = floema secundário; Ga = gema axilar; Pe = periciclo; Rc = ramo caulinar; Xs = xilema secundário; * = espaços secretores internos.

O sistema radicular de todas as espécies é constituído, nas três espécies, por raízes adventícias tuberizadas e suas laterais (Figuras 4A-C). Em *Viguiera filifolia* (Figura 4A), as raízes adventícias exibem tuberização discreta por toda a sua extensão enquanto em *V. linearifolia* (Figura 4B) e *V. trichophylla* (Figura 4C) apresentam porções não tuberizadas e porções com tuberizações conspícuas, as quais se concentram nas extremidades das raízes. Em *V. filifolia*, as raízes laterais de menor diâmetro podem exibir associação com fungos (Figura 4D).

As raízes laterais no início da estrutura secundária (Figura 4E) são revestidas pela epiderme uniestratificada com pêlos radiculares. No córtex, a exoderme possui uma camada de células, com paredes espessadas em suberina. A camada do parênquima cortical subepidérmica divide-se periclinamente e as células resultantes apresentam paredes suberizadas (Figura 4J). Nas demais camadas, várias células exibem divisões anticlinais e algumas periclinais, e internamente o córtex é delimitado pela endoderme com estrias de Caspary (Figura 4F). Na região mais interna do córtex há canais secretores cujo epitélio é delimitado por número variável de células originadas do parênquima cortical e de derivadas da endoderme. Os canais secretores situam-se opostos ao floema primário. Em *Viguiera linearifolia* os canais endodérmicos são delimitados, no início, por duas células endodérmicas e duas células do parênquima cortical (Figura 4F) e encontram-se distribuídos por toda a circunferência do órgão. No cilindro vascular sólido, o periciclo possui uma camada de células. O câmbio de origem pericíclica inicia a formação dos raios vasculares opostos aos pólos de protoxilema, enquanto o câmbio de origem procambial forma todos os elementos dos sistemas axial e radial do floema e xilema secundários. As células adjacentes ao xilema primário já são lignificadas (Figura 4E).

As raízes adventícias (Figuras 4G-H), diferentemente da porção descrita anteriormente, possuem cilindro vascular oco com ampla medula parenquimática desde a sua estrutura primária. Já no início da estrutura secundária observa-se que a distribuição dos tecidos vasculares difere entre as espécies tanto nas raízes que tuberizam quanto nas não tuberizadas. Em *V. filifolia* o floema e xilema secundários estão separados por faixas de células parenquimáticas (Figura 4G), enquanto nas outras duas espécies o câmbio forma um cilindro vascular contínuo de floema e xilema secundários (Figura 4H).

Nas raízes adventícias de *Viguiera trichophylla* que não tuberizam e nas porções não tuberizadas das raízes que tuberizam das três espécies, a epiderme é substituída por um estrato de células de paredes suberizadas resultantes de divisões periclinais na camada celular abaixo da

exoderme (Figura 4J). É possível verificar lenticelas no revestimento (Figura 5A). No córtex são observadas esclereides isoladas em *V. filifolia* (Figura 5C), em grupos em *V. linearifolia* (Figura 5D) enquanto em *V. trichophylla* não se observam esclereides. Em *V. linearifolia*, na porção logo abaixo das células suberizadas, surgem cavidades secretoras no parênquima cortical (Figura 4I). Os canais secretores derivados da endoderme têm o seu lume aumentado por divisões das células epiteliais (Figura 5B) e a endoderme adiciona novas camadas ao córtex por divisões periclinais.

O cilindro vascular possui periciclo uniestratificado e câmbio vascular com atividade semelhante ao já descrito para a raiz lateral em *V. linearifolia* e *V. trichophylla*. Em *V. filifolia*, o câmbio de origem pericíclica produz apenas raios que podem se lignificar com o desenvolvimento do órgão dificultando a sua visualização em alguns setores (Figuras 5E-F). O câmbio de origem procambial, apenas nas porções coincidentes com os tecidos vasculares primários, produz todos os elementos dos sistemas axial e radial, incluindo os canais secretores floemáticos (Figura 5F). Nas demais porções, o câmbio produz apenas parênquima radial (Figuras 5C,F). Portanto, em *V. linearifolia* (Figura 5D) e em *V. trichophylla* a atividade cambial forma um cilindro contínuo nessa porção enquanto em *V. filifolia* as estruturas vasculares ficam separadas por faixas de células parenquimáticas, dando a falsa impressão de feixes vasculares (Figura 5C). A medula apresenta uma pequena ampliação por divisões celulares do parênquima, em especial, na região perimedular, nas três espécies (Figuras 5C-D) e em *V. filifolia* algumas células se lignificam (Figura 5C).

O que diferencia as porções tuberizadas das não tuberizadas nas raízes é a ampliação da medula nas primeiras (Figuras 5G-I). Na porção tuberizada, a atividade cambial é discreta (Figuras 5G-H), ocorre a ampliação da medula por hipertrofia e hiperplasia das células do parênquima medular (Figura 5I), aumentando a distância entre os elementos condutores primários, contribuindo para a tuberização do órgão. Nas porções entre as estruturas vasculares, a atividade cambial contribui com células parenquimáticas e alguns elementos condutores e fibras para o interior do órgão e com floema secundário e canais secretores para o exterior (Figuras 5H-I). São observadas cavidades secretoras distribuídas por toda a medula em *V. linearifolia* (Figura 5J) e em *V. trichophylla* (Figura 5K), porém na última o lume é menor em relação ao das cavidades de *V. linearifolia*. As cavidades são ausentes na medula de *V. filifolia* (Figura 5L).

Nas três espécies estudadas são observados cristais de inulina em células corticais, nas células parenquimáticas da medula nas proximidades da estrutura vascular (Figura 5L), no

interior de elementos de vaso e no lume dos canais secretores (Figura 5M) de todas as regiões analisadas.

As principais características anatômicas distintivas dos diferentes órgãos analisados das espécies *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* estão apresentadas na tabela 1.

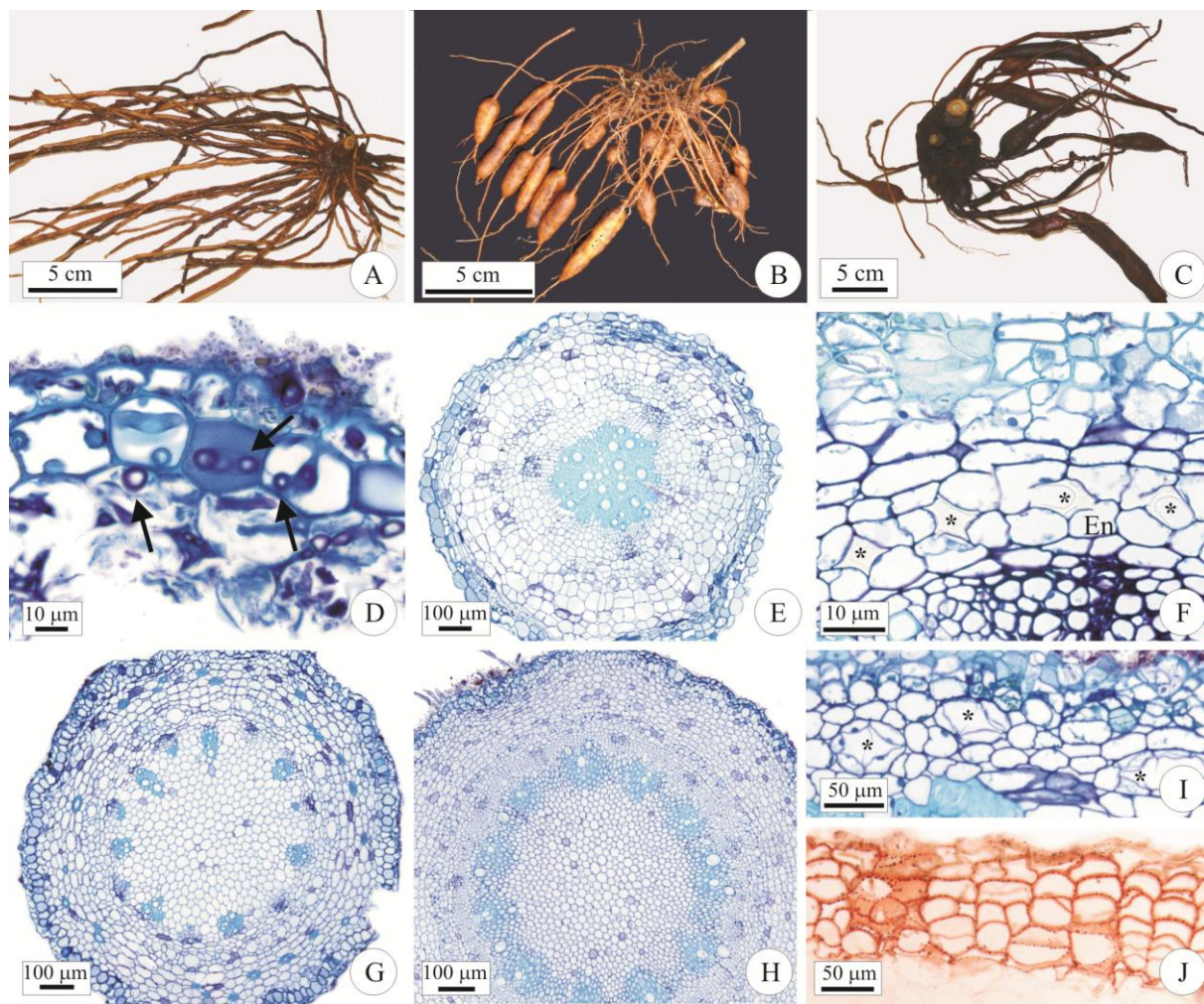


Figura 4. A,D,E,G. *Viguiera filifolia*. B,F,H,I,J. *V. linearifolia*. C. *V. trichophylla*. A-C. Visão geral do sistema subterrâneo. D. Raiz lateral com associação de fungos (setas). E. Visão geral da raiz lateral. F. Canais endodérmicos. G-H. Porção não tuberizada da raiz adventícia em início de estrutura secundária. I. Cavidades corticais. J. Estrato de células suberizadas que compõem o revestimento do órgão submetidas ao reagente Sudan IV. En = endoderme; * em F = canais secretores e em I = Espaços secretores.

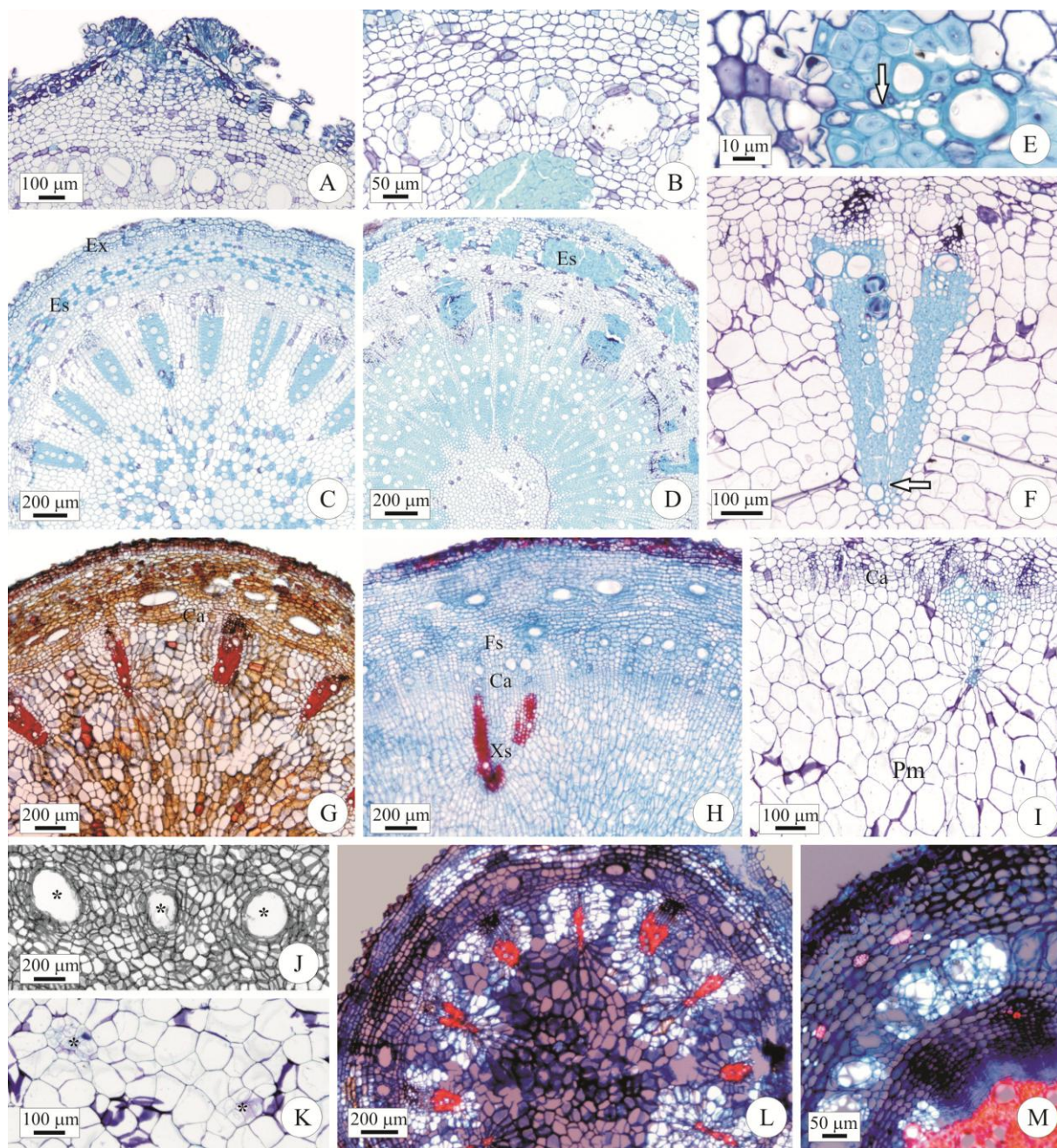


Figura 5. C,E,F,G,L. *Viguiera filifolia*. B,D,J,N. *V. linearifolia*. A,H,I,K,M. *V. trichophylla*. A. Revestimento da estrutura secundária com lenticela. B. Canais de origem endodérmica com lume aumentado. C-D. Porção não tuberizada da raiz em estrutura secundária. E-F. Formação de raios opostos ao pólo de protoxilema (seta). G-K. Porção tuberizada da raiz adventícia. J-K. Cavidades secretoras na medula parenquimática. L-M. Porção não tuberizada da raiz adventícia. Cristais de inulina visualizados sob luz polarizada. Ca = câmbio vascular; Es = esclerides; Ex = exoderme; Fs = floema secundário; Pm = parênquima medular; Xs = xilema secundário; * = cavidades secretoras.

Tabela 1. Resumo das principais características anatômicas distintivas entre *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*.

(Continua)

Órgão	Caracteres	<i>V. filifolia</i>	<i>V. linearifolia</i>	<i>V. trichophylla</i>
Folha	Contorno da folha em secção transversal	Cilíndrica, reentrância na face adaxial	Em “T”	Cilíndrica, reentrância na face abaxial
	Venação	Uninérvea com ramificações escassas	Uninérvea com intensa ramificação	Uninérvea com intensa ramificação
	Paredes das células epidérmicas em vista frontal	Sinuosas	Retas / retas	Retas
	Tricomas glandulares	Ausentes	Presentes	Ausentes
	Tipo de mesofilo	Homogêneo	Dorsiventral	Homogêneo
	Canais secretores na nervura central	2 grandes ao redor do feixe	3 pequenos ao redor do feixe	3 grandes ao redor do feixe
	Canais secretores no floema primário	Ausentes	Ausentes	Presentes
Caule aéreo	Indumento	Raramente tricoma tipo I	Tricomas tipo I, II e glandulares	Raramente tricoma tipo I
	Bainha amilífera	Ausente	Presente	Ausente
	Periciclo interfascicular	Várias camadas que lignificam	Uma camada que não lignifica	Várias camadas que lignificam
	Canais secretores no floema primário	Presentes	Ausentes	Presentes
	Atividade cambial das regiões inter e fascicular	Distinta	Idêntica	Distinta
	Canais no floema secundário	Ausentes	Presentes	Ausentes
Xilopódio	Espaços internos abaixo do revestimento	Ausentes	Presentes	Presentes
	Periciclo	Várias camadas	Uniestratificado	Várias camadas
	Sistema radial	Raios estreitos	Raios Amplos	Raios estreitos
	Frutanos	Ausentes	Ausentes	Presentes

Tabela 1. Resumo das principais características anatômicas distintivas entre *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*.

(Continuação)

	Tuberização das raízes	Discreta e uniforme	Conspícua, nas extremidades	Conspícua, nas extremidades
Raízes	Esclereides no córtex	Presentes, isolados	Presentes, em grupos	Ausentes
	Cavidades pós-formadas no córtex	Ausentes	Presentes	Ausentes
	Atividade de câmbio de origem procambial na porção não tuberizada	Diferenciada	Idêntica	Idêntica
	Cavidades na medula	Ausentes	Presentes, lume amplo	Presentes, lume reduzido

4. Discussão

A anatomia dos órgãos vegetativos apresentou características que podem auxiliar na delimitação das espécies em estudos taxonômicos.

As folhas das três espécies possuem limbo reduzido, sendo que em *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla* essas folhas são lineares, com grande compactação do mesofilo, enquanto em *V. linearifolia* ainda é possível visualizar uma pequena expansão do limbo com margens revolutas, formando criptas na face abaxial das folhas. Essas modificações são características de folhas ericóides, amplamente relatadas para espécies da família Ericaceae e revelam adaptações extremas às condições ambientais (Dickson, 2000).

Apesar das folhas serem órgãos caracteristicamente plásticos, que podem sofrer adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas em resposta ao ambiente, os caracteres anatômicos foliares apresentados mostraram-se úteis para a delimitação das espécies, principalmente os relacionados à posição e à ocorrência das estruturas secretoras nos feixes vasculares. Também são caracteres foliares úteis o padrão de venação e o contorno da parede das células epidêmicas em vista frontal.

A ocorrência e posição das estruturas secretoras tem sido relacionadas como úteis na identificação de espécies de Asteraceae por diversos autores (Appezzato-da-Glória & Cury, 2011; Fritz & Saukel, 2011; Cury & Appezzato-da-Glória, 2009; Appezzato-da-Glória et al., 2008b; Del-Vechio-Vieira et al., 2008; Milan et al., 2006; Lotocka & Geszprych, 2004; Lersten & Curtis, 1989, 1988, 1986; Fahn, 1979; Metcalfe & Chalk, 1950; Solereder, 1908), assim como a natureza do material secretado (Fahn, 1979; Metcalfe & Chalk, 1950; Solereder, 1908). Castro et al. (1997) propuseram uma chave de identificação baseada apenas na anatomia das estruturas secretoras presentes nas folhas de espécies de diferentes gêneros da família Asteraceae do Cerrado, incluindo duas espécies de *Viguiera*, o que mostra que essas estruturas têm valor diagnóstico a nível genérico.

Os canais e cavidades secretoras e os tricomas glandulares são estruturas comuns em espécies de Asteraceae e estão relacionados à presença de compostos do metabolismo secundário que são responsáveis pelas atividades farmacológicas relatadas para diversas espécies, inclusive do gênero *Viguiera* (Ambrósio et al., 2004; Spring et al., 2003; Marquina et al., 2001; Da Costa et al., 1996). Nas espécies aqui estudadas, tais estruturas secretam substâncias lipofílicas, ricas em terpenos de baixo peso molecular, que caracterizam os óleos essenciais (Capítulo 2).

Nos caules aéreos, as diferenças anatômicas foram menos evidentes, mas foi possível estabelecer algumas características relacionadas ao cilindro vascular, tais como a atividade cambial diferenciada entre as porções fascicular e interfascicular, que podem auxiliar na comparação entre as espécies. Além disso, a atividade cambial descrita para os caules aéreos de *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla* não é usualmente relatada para espécies de Asteraceae (Budel & Duarte, 2008; Del-Vechio-Vieira et al. 2008; Empinotti & Duarte, 2008). Adamson (1934) relatou um tipo de crescimento secundário anômalo para a porção caulinar do gênero *Athrixia* (Asteraceae) no qual há a formação de tecidos vasculares secundários pelo câmbio apenas nas regiões fasciculares, sendo que nas porções interfasciculares o câmbio não se diferencia e as células do parênquima se lignificam. Nas espécies *V. filifolia* e *V. trichophylla*, diferentemente do descrito pelo autor acima, nas porções interfasciculares há a diferenciação do câmbio vascular, mas nessa região apenas são formados raios parenquimáticos que se lignificam com o desenvolvimento.

O sistema subterrâneo composto por um caule subterrâneo espessado que, no caso de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* trata-se de um xilopódio, e por raízes

adventícias tuberosas é característico de espécies de Asteraceae, principalmente às que se desenvolvem no Cerrado (Appezato-da-Glória & Cury, 2011; Appezato-da-Glória et al. 2008a; Alonso & Machado, 2007; Hayashi & Apezato-da-Glória, 2007; Appezato-da-Glória & Estelita, 2000;). As funções atribuídas aos órgãos subterrâneos espessados são reserva de nutrientes, resistência às condições ambientais adversas como seca e passagem de fogo, capacidade de rebrotamento e propagação vegetativa (Fidelis et al., 2009; Rizzini & Heringer, 1961). No caso dos xilopódios, a principal função relaciona-se ao seu potencial gemífero (Appezato-da-Glória & Cury, 2011; Fidelis et al., 2009), pois a estrutura pode apresentar diversas gemas distribuídas por toda a superfície do órgão (Fidelis et al., 2009; Appezato-da-Glória et al. 2008a; Appezato-da-Glória, 2003) que em resposta às condições ambientais favoráveis podem rebrotar, garantindo a sobrevivência dessas espécies em seu ambiente.

As características anatômicas levantadas para as raízes também permitem uma delimitação entre as espécies. Destacam-se, mais uma vez, a ocorrência e posição das estruturas secretoras, sendo elas, a presença de cavidades pós-formadas no córtex de *Viguiera linearifolia* e a presença de cavidades secretoras de lume amplo na medula parenquimática de *V. linearifolia* e de lume reduzido em *V. trichophylla*. Para *V. filifolia* essas cavidades estão ausentes nas duas porções.

O revestimento das raízes e xilopódios em estrutura secundária observado nas espécies desse estudo é constituído por um estrato de células de paredes suberizadas originadas a partir de divisões periclinais das camadas de células mais externas no córtex, assemelhando-se ao súber estratificado relatado para espécies de monocotiledôneas. Embora não seja relatado esse tipo de revestimento para espécies de eudicotiledôneas, Angyalossy (2006) observou revestimento semelhante no caule de *Eucalyptus paniculata*.

O processo de tuberização verificado nas raízes adventícias das três espécies, com destaque para as tuberizações conspícuas de *Viguiera linearifolia* e *V. trichophylla* deve-se, principalmente, às divisões das células da medula parenquimática, com pouca contribuição do câmbio vascular. Em outras espécies de Asteraceae, tais como *Vernonia oxylepis* (Vilhalva & Appezato-da-Glória, 2006b) e *V. brevifolia* (Hayashi & Appezato-da-Glória, 2007), a tuberização resulta da proliferação do periciclo, enquanto que em *Gyptis lanigera* (Appezato-da-Glória et al., 2008a), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Appezato-da-Glória & Estelita, 2000), a atividade cambial é responsável pela produção de tecidos vasculares secundários com grandes

quantidades de células parenquimáticas e em *Smallanthus sonchifolius* (Machado et al., 2004), a tuberização se dá por divisões das células do córtex interno. Processo de tuberização semelhante ao observado nas espécies desse estudo foi relatado para o tubérculo de *Solanum tuberosum*, no qual a formação do tubérculo se dá, principalmente, por divisões das células da zona perimedular (Artschwager, 1924; Artschwager, 1918).

A atividade cambial das raízes de *Viguiera linearifolia* e *V. trichophylla* segue o padrão descrito para as angiospermas em geral, ou seja, o câmbio possui atividade idêntica formando um cilindro contínuo no órgão (Appezato-da-Glória & Hayashi, 2006). No entanto, na porção não tuberizada das raízes de *V. filifolia*, o câmbio posicionado oposto aos tecidos vasculares primários produz floema e xilema secundários com todos os elementos dos sistemas axial e radial. Nos demais setores, o câmbio produz apenas parênquima vascular, o que confere à estrutura uma falsa impressão de feixes vasculares, como ocorre em uma estrutura caular. Portanto, assim como na estrutura do caule aéreo, a atividade cambial diferenciada na porção não tuberizada das raízes pode auxiliar na diferenciação das espécies.

As raízes tuberosas das três espécies e o xilopódio de *Viguiera trichophylla* acumulam frutanos na forma de cristais de inulina. A presença de cristais de inulina já foi considerada como característica da família Asteraceae por Solereder em 1908. Diversos estudos relatam a presença de frutanos em sistemas subterrâneos e raízes tuberosas (Hayashi & Appezato-da-Glória, 2007; Portes & Carvalho, 2006; Vilhalva & Appezato-da-Glória, 2006a, 2006b; Van den Ende et al., 2005), inclusive em raízes de espécies de *Viguiera* (Itaya et al., 1999; Teturliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993; Isejima et al., 1991). Os frutanos desempenham um importante papel na regulação osmótica, o que permite a sobrevivência e o desenvolvimento dessas espécies em ambientes com pouca disponibilidade hídrica (Vilhalva et al., 2011; Valluru & Van den Ende, 2008; Figueiredo-Ribeiro, 1993; Brocklebank & Hendry, 1989). Assim, a capacidade de rápida metabolização e utilização desses frutanos quando as condições ambientais se tornam favoráveis, como um episódio de chuva, por exemplo, aumenta a vantagem das plantas que acumulam esses polissacarídeos e que estão adaptadas a sobreviver em condições temporárias de seca (Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Com os caracteres anatômicos levantados nesse estudo foi possível estabelecer um quadro comparativo que permite diferenciar as espécies anatomicamente. Nota-se que as espécies *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla* são muito semelhantes tanto na morfologia externa quanto na

morfologia interna, principalmente em relação aos caracteres foliares, porém foi possível estabelecer caracteres únicos para cada uma delas. *V. linearifolia* se confirma com um táxon bem definido pelas diferenças anatômicas aqui apresentadas.

5. Referências Bibliográficas

- Adamson, R.S. Anomalous Secondary Thickening in Compositae. *Annals of Botany* 48: 505-514. 1934.
- Adedeji, O. & Jewoola, O.A. Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 36(2): 7-16. 2008.
- Ambrosio, S.R.; Schoor, K. & Da Costa, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 221-224. 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* 55: 749-758. 2007.
- Angyalossy, V. O floema secundário em espécies arbóreas. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. 135p.
- Appezzato-Da-Glória, B. Morfologia de sistemas subterrâneos: histórico e evolução do conhecimento no Brasil. Ed. Alexandre Sene Pinto, Ribeirão Preto, 2003. 80p.
- 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* 135: 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* 157: 789-796. 2008b.
- 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* 83(3): 981-991. 2011.
- Appezzato-Da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. The developmental anatomy of the subterranean system in *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson and *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23:7-35. 2000.
- Appezzato-Da-Glória, B. & Hayashi, A.H. Raiz. In: Appezzato-Da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (Eds.). *Anatomia Vegetal*, 2ª Ed., Viçosa, 2006. 438p.
- Artschwager, E.F. Anatomy of the potato plant, with special reference to the ontogeny of the vascular system. *Journal of Agricultural Research* 14(6): 221-252. 1918.

- Artschwager, E.F. Studies on the potato tuber. *Journal of Agricultural Research* 27: 809-835. 1924.
- Baker, J.G. Compositae IV: Helianthoideae. In: C.F.P. Martius & A.W. Eichler (Eds.) *Flora Brasiliensis Monachii*. Typografia Regia 6(3): 135-268. 1884.
- Blake, S.F. A revision of the genus *Viguiera*. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* 51: 1-205. 1918.
- Bremer, K. *Asteraceae: cladistics and classification*. Portland: Timber Press, 1994. 752p.
- Brocklebank, K.J. & Hendry, G.A.F. Characteristics of plant species which store different types of reserve carbohydrates. *New Phytologist* 112: 255-260. 1989.
- Budel, J.M. & Duarte, M.R. Caracteres morfoanatômicos de partes vegetativas aéreas de *Baccharis coridifolia* DC. (Asteraceae-Astereae). *Latin American Journal of Pharmacy* 26(5): 723-731. 2008.
- Bukatsch, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255. 1972.
- 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* 20: 163–174. 1997.
- Cury, G. & Appezzato-Da-Glória, B. Internal secretory spaces in thickened underground systems of Asteraceae species. *Australian Journal of Botany* 57: 229–239. 2009.
- Da Costa, F.B.; Vichnewski, W. & Herz, W. Constituents of *Viguiera aspilioides* and *V. robusta*. *Biochemical Systematics and Ecology* 24(6): 585-587. 1996.
- David, R. & Carde, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série D*, 258: 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* 18: 769-776. 2008.
- Dickison, W. C. *Integrative Plant Anatomy*. Copyright, Elsevier (USA), 2000, 533p.
- Empinotti, C.B. & Duarte, M.R. Estudo anatômico de folha e caule de *Elephantopus mollis* Kunth (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 108-116. 2008.

Fahn, A. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31: 37-75. 2000.

Fahn, A. *Secretory Tissues in Plants*. London: Academic Press, 1979. 302p.

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. (Eds.). *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Cap. 6., p. 88-100. 2009.

Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 5(2): 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* 53(1): 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* 28(4): 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* 50(6): 979-988. 2007.

Horridge, G.A. & Tamm, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. *Science* 163: 817-818. 1969.

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

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* 119: 149-154. 1991.

Itaya, N.M.; Vaz, A.P.A.; Kerbauy, G.B. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas in vitro de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica* 19(3): 579-586. 2005.

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

Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138. 1965.

- Kelsey, R.G. Glandular trichomes: a helpful taxonomic character of *Artemisia nova* (Black sagebrush). *Journal of Range Management* 37: 370-372. 1984.
- Lersten, N.R. & Curtis, J.D. Foliar oil reservoir anatomy and distribution in *Solidago canadensis* (Asteraceae, tribe Astereae). *Nordic Journal of Botany* 9(3): 281-287. 1989.
- Lersten, N.R. & Curtis, J.D. Secretory reservoirs (ducts) of two kinds in giant ragweed (*Ambrosia trifida*; Asteraceae). *American Journal of Botany* 75: 1313-1323. 1988.
- Lersten, N.R. & Curtis, J.D. Tubular cavities in white snakeroot, *Eupatorium rugosum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 73: 1016-1021. 1986.
- Lersten, N.R. & Curtis, J.D. Distribution and anatomy of hydathodes in Asteraceae. *Botanical Gazette* 146(1): 106-114. 1985.
- Lotocka, B. & Geszprych, A. Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 144: 207-233. 2004.
- Lotocka, B. & Osinska, E. Shoot Anatomy and Secretory structures in *Hypericum* species (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 163: 70-86. 2010.
- 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* 27: 115-123. 2004.
- Magenta, M.A.G. *Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da USP. 2006.
- Magenta, M.A.G.; Nunes, A.D.; Mendonça, C.B.F. & Esteves, V.G. Palynotaxonomy of Brazilian *Viguiera* (Asteraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 45(3-4): 285-299. 2010a.
- Magenta, M.A.G.; Pirani, J.R. & Mondin, C.A. Novos táxons e combinações em *Viguiera* (Asteraceae - Heliantheae). *Rodriguésia* 61(1): 1-11. 2010b.
- Marquina, S.; Maldonado, N.; Garduño-Ramírez, M.L.; Aranda, E.; Villarreal, M.L.; Navarro, V.; Bye, R.; Delgado, G. & Alvarez, L. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. *Pytochemistry* 56: 93-97. 2001.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. *Anatomy of the Dicotyledons: Wood Structure and Conclusion of the General Introduction*. v.2. New York, Oxford University Press. 1983. 330p.

- Metcalf, C.R. & Chalk, L. Anatomy of the dicotyledons. Oxford: Clarendon Press. v. 2. 1950. 1500p.
- Milan, P.; Hayashi, A.H. & Appezzato-Da-Glória, B. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. Brazilian Archives of Biology And Technology 49(1): 135-144. 2006.
- Panero, J.L. & Schilling, E.E. Revision of *Viguiera* sect. *Maculatae* (Asteraceae: Heliantheae). Systematic Botany 13: 371-406. 1988.
- Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied, vol. 1. London: J. & A. Churchill Ltd. 1968.
- 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 170: 624-633. 2006.
- Rizzini, C.T. & Heringer, E.P. Underground organs of plants from some southern Brazilian savannas, with special reference to the xylopodium. Phytion 17: 105-124. 1961.
- Robinson, H. Studies in Heliantheae (Asteraceae) VIII. Notes on genus and species limits in the genus *Viguiera*. Phytologia 36(3): 201-215. 1977.
- Robinson, H. & Moore, A.J. New species and new combinations in *Rhysolepis* (Heliantheae – Asteraceae). Proceedings of the Biological Society of Washington 117(3): 423-446. 2004.
- Sakai, W.S. Simple Method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. Stain Technology 48: 247-248. 1973.
- Schilling, E.E. & Jansen, R.K. Restriction fragment analysis of chloroplast DNA and the systematics of *Viguiera* and related genera (Asteraceae-Heliantheae). American Journal of Botany 76(12): 1769-1778. 1989.
- Schilling, E.E. & Panero, J.L. Phylogenetic reticulation in subtribe Helianthinae. American Journal of Botany 83(7): 939-948. 1996.
- Schilling, E.E. & Panero, J.L. Evidence for a close relationship between *Iostephane* and *Viguiera* (Asteraceae-Heliantheae). American Journal of Botany 78(8): 1054-1062. 1991.
- 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 57(3): 323-332. 2000.

Schilling, E.E.; Panero, J.L. & Eliasson, U.H. Evidence from chloroplast DNA restriction site analysis on the relationships of *Scalesia* (Asteraceae-Heliantheae). *American Journal of Botany* 81(2): 248-254. 1994.

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

Spring, O.; Zipper, R.; Conrad, J.; Vogler, B.; Klaiber, I. & Da Costa, F.B. Sesquiterpene lactones from glandular trichomes of *Viguiera radula* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry* 62: 1185-1189. 2003.

Strasburger, E. Handbook of practical botany. (Transl. W. Hillhouse). George Allen & Company Ltda., London. 1913. 519p.

Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the Cerrado. *New Phytologist* 123: 741-749. 1993.

Valluru, R. & Van den Ende, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* 59: 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* 125: 419-429. 2005.

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* 29(1): 39-47. 2006a.

Vilhalva, D.A.A. & Appezzato-Da-Glória, B. Morfoanatomia da raiz tuberosa de *Vernonia oxylepis* Sch. Bip. in Mart. ex Baker – Asteraceae. *Acta Botanica Brasilica* 20(3): 591-598. 2006b.

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* 59: 46-52. 2011.

Wagenitz, G. Systematics and Phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Plant Systematic and Evolution* 125: 29-46. 1976.

Capítulo 2:
Composição química do óleo essencial dos órgãos
vegetativos de três espécies de *Viguiera*
(Asteraceae – Heliantheae)

Composição química do óleo essencial dos órgãos vegetativos de três espécies de *Viguiera* (Asteraceae – Heliantheae)

Resumo: O gênero *Viguiera* é um dos maiores da família Asteraceae e por isso, as relações entre as espécies não estão bem estabelecidas. *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* são ervas aromáticas e potencialmente resiníferas, muito semelhantes morfológicamente e se diferenciam apenas por características morfológicas reprodutivas. Estudos sobre a composição dos óleos essenciais (OE's) das espécies podem ser úteis do ponto de vista taxonômico, auxiliando na delimitação das mesmas. Além disso, podem auxiliar no levantamento de possíveis compostos bioativos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o rendimento e a composição química dos OE's dos diferentes órgãos das três espécies e comparar o perfil químico a fim de determinar se existem diferenças na composição dos OE's que possam servir como marcadores químicos. As extrações dos OE's das folhas, caules aéreos, raízes e xilopódios foram realizadas por hidrodestilação em sistema Clevenger, a análise da composição química através de Cromatografia à Gás acoplada a Espectometria de Massas e a identificação dos compostos por comparação com dados da biblioteca, co-injeção de padrões de hidrocarbonetos para cálculo do índice de Kovatz e dados da literatura. O rendimento dos OE's foi diferente entre as espécies assim como a sua composição química. Foi possível identificar alguns compostos que já foram apontados em estudos fitoquímicos com diversas atividades biológicas. Também se identificou compostos exclusivos às espécies (copaeno, cipereno, τ -cariofileno e β -gurjuneno para *V. filifolia*; germacreno B, carotol, cubenol e α -cadineno para *V. linearifolia* e ρ -cimeno e α -longipineno para *V. trichophylla*) que podem em conjunto com os compostos comuns às três espécies, fornecer um perfil químico característico para cada uma das espécies, auxiliando na separação das mesmas.

Palavras-chave: *Viguiera filifolia*, *Viguiera linearifolia*, *Viguiera trichophylla*, quimiossistemática, rendimento.

1. Introdução

Viguiera Kunth é um dos gêneros mais representativos da família Asteraceae (Compositae), exclusivamente americano, com aproximadamente 180 espécies (Magenta, 2006; Bremer, 1994). No entanto, alguns estudos apontam que não se trata de um grupo monofilético (Magenta, 2006; Robinson & Moore, 2004; Schilling et al., 2000; Schilling & Panero, 1991) e as relações entre as espécies não estão bem estabelecidas.

Viguiera filifolia Sch. Bip. ex Baker, *V. linearifolia* Chodat e *V. trichophylla* Dusén são ervas perenes, providas de sistema subterrâneo espessado, aromáticas e potencialmente resiníferas (Magenta, 2006). Essas espécies pertencem à mesma seção (*Trichophylla*) na classificação proposta por Blake (1918) e de acordo com Magenta (2006), são espécies muito semelhantes, que se diferenciam apenas por características morfológicas reprodutivas.

Os óleos essenciais e as resinas são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões & Spitzer, 2010; Bakkali et al., 2008), e que no caso dos óleos contém predominantemente terpenos voláteis de baixo peso molecular (Fahn 2000; Fahn, 1979). Tais materiais de natureza lipofílica são secretados por uma variedade de estruturas anatômicas, como idioblastos, tricomas, cavidades e ductos (Fahn, 2000).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham importantes funções, entre elas atração de polinizadores e dispersores de sementes, proteção contra herbivoria, ação antimicrobiana, antiviral e antifúngica, entre outras (Bakkali et al., 2008; Wink, 2003; Fahn, 2000; Harborne & Turner, 1984). Além disso, esses compostos têm sido utilizados pelo homem através do tempo, e são comercialmente importantes, com aplicação na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (Bakkali et al., 2008; Harborne & Turner, 1984).

A ocorrência de óleos essenciais em espécies de Asteraceae tem sido amplamente relatada (Maia et al., 2010; Borsato et al., 2007; Ferronato et al., 2007; Castro et al., 2006; Agostini et al., 2005; Corrêa et al., 2004). Para as espécies brasileiras de *Viguiera* não se encontram estudos na literatura sobre a caracterização ou até mesmo utilização farmacológica dos óleos essenciais. No entanto, estudos sobre a fitoquímica de diversas espécies (Ambrosio et al., 2004; Spring et al., 2003; Marquina et al., 2001; Da Costa et al., 1996) têm destacado a importância farmacológica do gênero.

A atividade farmacológica das plantas de *Viguiera* é atribuída às lactonas sesquiterpênicas (Da Costa, 2008), substâncias utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias na medicina tradicional (Siedle et al., 2004). Esses compostos apresentam uma variedade de atividades tais como antibacteriana em *Viguiera dentata* (Canales et al., 2008), antimicrobiana em *V. arenaria* (Porto et al., 2009), antiinflamatória, analgésica (Valério et al., 2007) e citotóxica (Arakawa, 2007) em *V. robusta*.

Estudos sobre a composição química dos óleos essenciais também podem auxiliar no levantamento de possíveis compostos bioativos, que muitas vezes se mostram mais ativos e com efeitos colaterais mais amenos (Ambrosio et al., 2008). Alguns estudos já mostram a utilização de óleos essenciais de espécies de Asteraceae para diversos fins, tais como atividade antimicrobiana em espécies de *Baccharis* (Ferronato et al., 2007), atividade inseticida em *Tagetes minuta* (Cestari et al., 2004), atividade antimicrobiana e antioxidante em *Achiella millefolium* (Candan et al., 2003) e atividade antiinflamatória nos óleos de *Porophyllum ruderale* e *Conyza bonariensis* (Souza et al., 2003). Para espécies de *Viguiera*, a utilização de óleos essenciais foi relatada apenas pelo estudo de Canales et al. (2008), que mostram a ação antibacteriana do óleo essencial da espécie mexicana *Viguiera dentata*.

Do ponto de vista taxonômico, estudos sobre óleos essenciais têm sido úteis na delimitação de espécies, na detecção de hibridização em populações naturais, na confirmação da presença de raças geográficas e de limites genéricos e tribais (Alvarenga et al., 2001; Harborne & Turner, 1984). O uso de dados químicos para a resolução de problemas taxonômicos tem aumentando consideravelmente nos últimos anos, principalmente em estudos com espécies de gimnospermas, nas quais esses compostos são amplamente distribuídos (Harborne & Turner, 1984). A escassez desse tipo de estudo com famílias de angiospermas pode estar relacionada com a sua distribuição irregular no grupo (Harborne & Turner, 1984), mas mesmo assim, estudos com espécies de Asteraceae (Alvarenga et al., 2005; Alvarenga et al., 2001; Emericiano et al., 1987; Ferreira & Gottlieb, 1982) têm se mostrado valiosos na resolução de problemas taxonômicos em vários níveis hierárquicos (Hegnauer, 1977).

A família Asteraceae, por ser uma das maiores famílias de angiospermas, possui relações taxonômicas muito complexas e os caracteres químicos se mostram de grande importância no processo de revisão da sistemática da família (Harborne & Turner, 1984). Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais dos

diferentes órgãos vegetativos de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* e comparar o perfil químico das espécies a fim de determinar se existem diferenças na composição dos óleos essenciais que possam servir como marcadores químicos.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal

Amostras de órgãos vegetativos aéreos e subterrâneos de *Viguiera filifolia* Sch. Bip. ex Baker, *V. linearifolia* Chodat e *V. trichophylla* Dusén foram obtidas a partir de populações naturais de Alto Paraíso de Goiás/GO (S 25°22'53,4" e W 49°48'24,0") em maio de 2010, em Ponta Porã/MS (S 22°21'52,7" e W 55°43'58,1") em outubro de 2010 e em Palmeira/PR (S 25°22'53,4" e W 49°48'21,0") em abril de 2010, respectivamente.

As espécies foram identificadas pela especialista Profa. Dra. Mara Angelina Galvão Magenta e as exsicatas foram registradas e incorporadas ao acervo do Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESA) da Universidade de São Paulo sob os números: *V. filifolia* - ESA111848, *V. linearifolia* - ESA113164 e *V. trichophylla* - ESA111850.

O material fresco foi coletado e armazenado para transporte em folhas de jornal umedecidas, dentro de sacos plásticos. Esse material foi mantido refrigerado com auxílio de gelo em gel em sacola térmica até o preparo para a extração no laboratório.

2.2 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger. Para cada espécie foram realizadas quatro extrações (uma para cada órgão: folhas, caules aéreos, raízes e xilopódios) utilizando-se material vegetal fresco, o qual foi fracionado para otimizar a extração do óleo essencial. As massas das estruturas variaram de acordo com a disponibilidade de material no momento da coleta e estão apresentadas na tabela 1.

O material vegetal foi depositado em um balão de fundo redondo seguido da adição de 1000 mL a 3000 mL de água destilada (dependendo do material contido no balão) e procedeu-se à hidrodestilação durante 3 horas. Ao término da extração os sistemas foram resfriados, o óleo recolhido com auxílio de pipeta de Pasteur quando o rendimento permitia, ou a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 50 mL) e as fases orgânicas agrupadas e evaporadas a vácuo em

evaporador rotativo. Os óleos resultantes foram pesados em balança analítica, os rendimentos determinados e posteriormente armazenado em frasco de vidro âmbar em freezer.

Tabela 1. Massa fresca utilizada de folhas, caules aéreos, raízes e xilopódios para a extração do óleo essencial de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*.

Espécie	Massa fresca (g)			
	Folhas	Caules aéreos	Raízes	Xilopódios
<i>V. filifolia</i>	302,3	401,3	500	307,5
<i>V. linearifolia</i>	337,5	394,8	1003,5	245,4
<i>V. trichophylla</i>	500	600	1000	600

2.3 Análise da composição química dos óleos essenciais

As amostras dos óleos essenciais foram analisadas por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), em cromatógrafo HP 5890 série II (Palo Alto, CA, USA) equipado com detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5971, injetor split/splitless, coluna capilar HP-5 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m); temperaturas: injetor = 220 °C, detetor = 280 °C, coluna = 60 °C, 3 °C.min⁻¹, 240 °C (7 min); vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹, com as amostras dissolvidas em acetato de etila na concentração de 20 mg/mL.

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massas com dados da biblioteca NIST-05, co-injeção de padrões de hidrocarbonetos para cálculo do índice de Kovatz e dados descritos por Adams (2007).

As extrações e análises dos óleos essenciais foram realizadas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, da Unicamp.

3. Resultados

O rendimento do óleo essencial para as espécies, nos diferentes órgãos encontra-se na tabela 2.

Tabela 2. Rendimento do óleo essencial dos diferentes órgãos de espécies de *Viguiera*.

Órgão / Espécie	Rendimento do óleo essencial (% m/m)		
	<i>V. filifolia</i>	<i>V. linearifolia</i>	<i>V. trichophylla</i>
Folhas	1,29	0,05	1,01
Caules aéreos	0,09	0,07	0,17
Raízes	0,22	0,23	0,27
Xilopódios	0,12	0,14	0,08

A composição química do óleo essencial de *Viguiera filifolia* apresenta monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, com predominância de monoterpenos. Foram identificados 16 compostos, alguns foram encontrados apenas no óleo essencial proveniente dos órgãos aéreos, principalmente dos caules aéreos e outros apenas no óleo dos órgãos subterrâneos (Tabela 3). Na figura 1 estão apresentados os cromatogramas dos OE's dos diferentes órgãos de *V. filifolia*.

O óleo essencial de *Viguiera linearifolia* também apresenta monoterpenos e sesquiterpenos. Para o sistema subterrâneo foram identificados apenas monoterpenos, para as folhas e caules aéreos, mono e sesquiterpenos (Figura 2, tabela 4).

O óleo essencial de *Viguiera trichophylla* se caracteriza por predominância de monoterpenos, em todos os órgãos (Figura 3). As porcentagens relativas dos constituintes identificados nos OE's estão apresentadas na tabela 5.

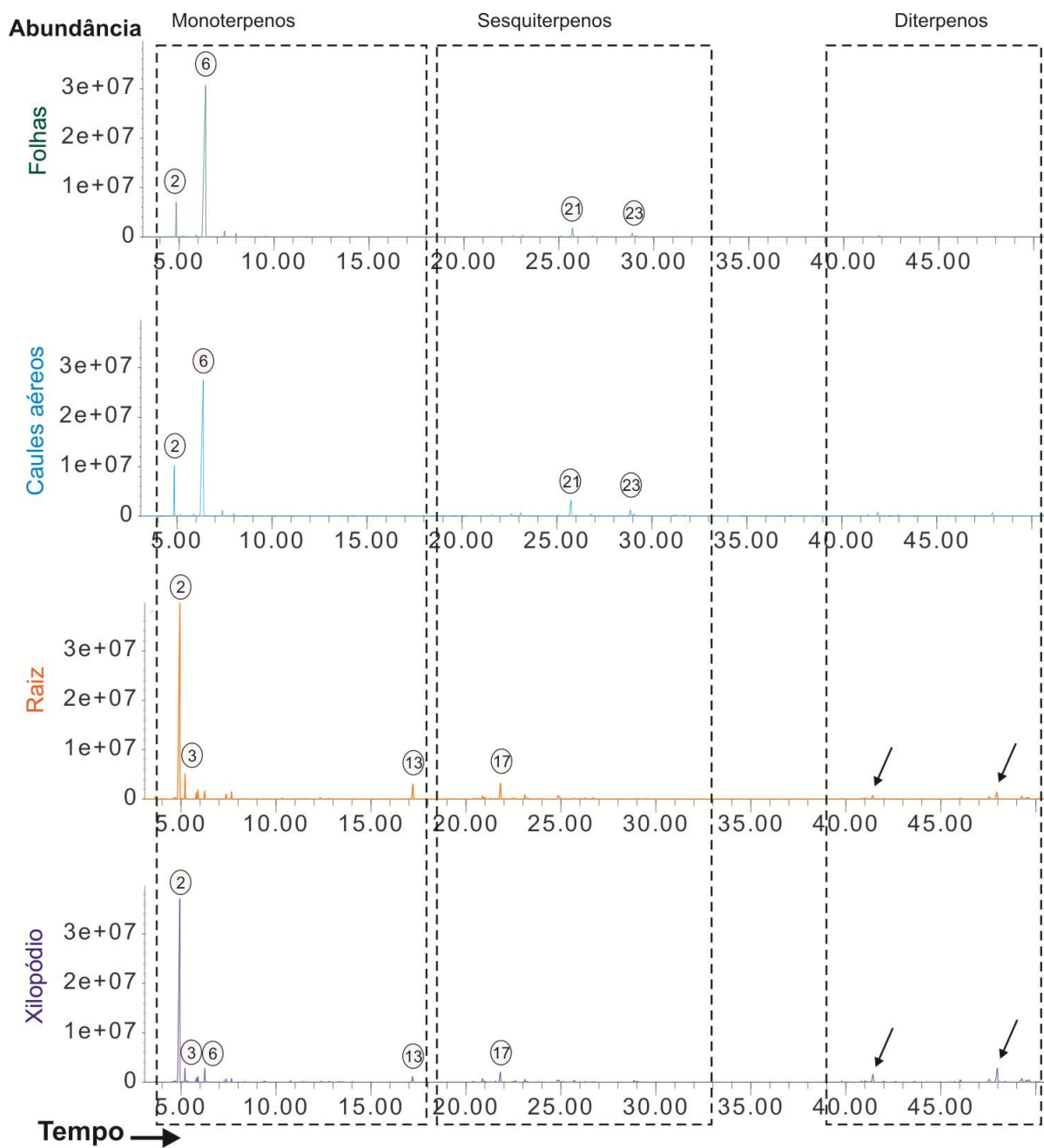


Figura 1. Cromatogramas de *Viguiera filifolia* dos diferentes órgãos vegetativos. Números dos picos correspondem aos números da tabela 6. Setas = diterpenos não identificados. Tempo em minutos.

Tabela 3. Composição química e porcentagens relativas dos compostos nos óleos essenciais dos diferentes órgãos vegetativos de *Viguiera filifolia*.

Composto	tR (min)	IK _{calc}	% relativa			
			Folha	Caule aéreo	Raiz	Xilopódio
Monoterpenos			94,6	85,11	85,48	82,68
α-pineno	4,94	936	5,86	9,39	70,01	69,18
Canfeno	5,21	948	-	0,31	4,0	5,2
Sabineno	5,79	972	-	-	1,13	0,8
β-pineno	5,89	976	0,38	0,38	1,6	1,04
Mirceno	6,24	991	86,0	73,1	1,45	2,94
D-limoneno	7,37	1027	1,56	1,38	1,12	0,9
β-ocimeno	7,65	1036	0,83	0,56	1,52	0,75
Acetato de bornila	17,20	1284	-	-	4,63	1,86
Sesquiterpenos			4,88	12,22	8,2	5,57
Copaeno	20,87	1372	-	-	0,88	1,17
Cipereno	21,81	1395	-	-	5,17	3,56
τ-cariofileno	22,60	1415	-	0,77	-	-
β-gurjuneno	23,10	1427	0,42	1,02	1,23	0,84
ni	24,86	1471	-	-	0,91	-
Germacreno D	25,08	1476	-	0,43	-	-
Biciclogermacreno	25,71	1492	3,06	6,11	-	-
δ-cadineno	26,79	1520	-	0,67	-	-
Espatulanol	28,85	1574	1,4	2,31	-	-
ni	29,07	1579	-	0,91	-	-
Diterpenos			0,48	2,67	5,97	12,07
ni	41,41	1935	-	-	1,36	3,1
ni	41,89	1950	0,48	1,31	-	-
ni	47,55	-	-	-	0,91	1,3
ni	47,97	-	-	1,36	2,59	5,94
ni	49,26	-	-	-	1,11	1,73

tR = tempo de retenção; IK_{calc} = índice de Kovatz calculado; (-) = composto ausente; ni = composto não identificado.

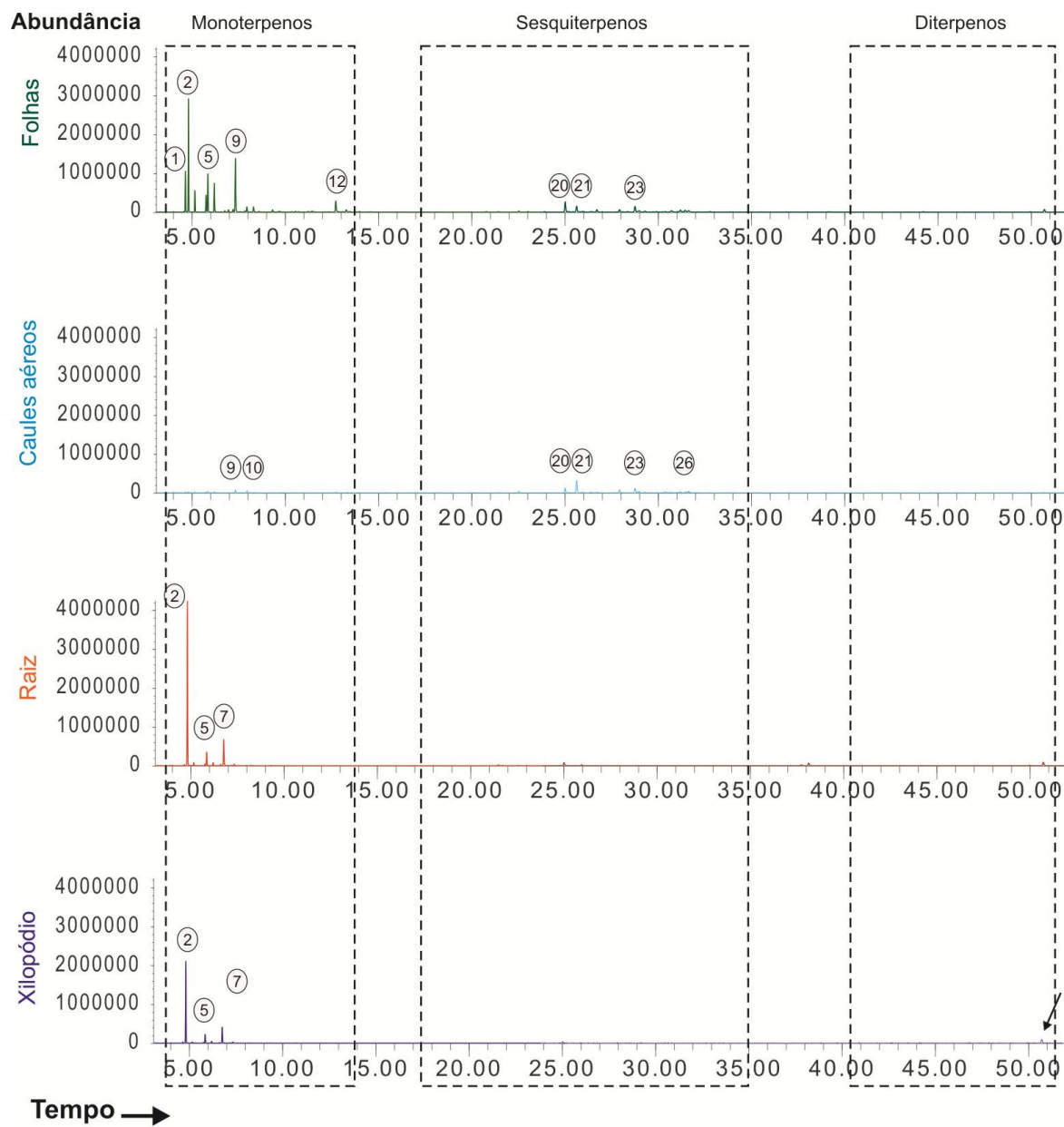


Figura 2. Cromatogramas de *Viguiera linearifolia* dos diferentes órgãos vegetativos. Números dos picos correspondem aos números da tabela 6. Setas = diterpenos não identificados. Tempo em minutos.

Tabela 4. Composição química e porcentagens relativas dos compostos nos óleos essenciais dos diferentes órgãos vegetativos de *Viguiera linearifolia*.

(continua)

Composto	t_R (min)	IK_{calc}	% relativa			
			Folha	Caule aéreo	Raiz	Xilopódio
Monoterpenos			89,12	12,04	100	92,01
α -tujeno	4,81	925	9,23	-	-	-
α -pineno	4,81	933	26,2	1,05	77,12	66,49
Canfeno	5,21	947	5,39	-	-	-
Sabineno	5,79	972	4,52	-	-	-
β -pineno	5,89	976	10,31	1,53	7,33	8,48
Mirceno	6,24	991	7,9	1,27	-	-
3-careno	6,76	1011	-	-	15,55	17,04
D-limoneno	7,37	1028	17,25	4,35	-	-
β -ocimeno	7,65	1046	1,76	3,84	-	-
γ -terpineno	8,37	1057	1,78	-	-	-
4-terpineol	12,70	1176	4,78	-	-	-
Sesquiterpenos			10,88	87,96	-	-
Germacreno B	17,92	1552	-	7,01	-	-
τ -cariofileno	22,52	1416	-	2,74	-	-
Germacreno D	25,08	1478	5,09	12,02	-	-
Biciclogermacreno	25,71	1493	2,88	30,14	-	-
δ -cadineno	26,85	1521	-	1,61	-	-
Espatuleno	28,85	1574	2,91	11,6	-	-
ni	28,97	1580	-	4,3	-	-
Carotol	29,27	1588	-	2,66	-	-
ni	30,38	1617	-	3,2	-	-
ni	30,71	1626	-	1,55	-	-
ni	31,18	1639	-	3,09	-	-
Cubenol	31,44	1647	-	2,56	-	-
α -cadinol	31,63	1652	-	5,48	-	-

Tabela 4. Composição química e porcentagens relativas dos compostos nos óleos essenciais dos diferentes órgãos vegetativos de *Viguiera linearifolia*.

(continuação)

Diterpenos		-	-	-	7,99
ni	50,70	-	-	-	7,99

tR = tempo de retenção; IKcalc = índice de Kovatz calculado; (-) = composto ausente ; ni = composto não identificado.

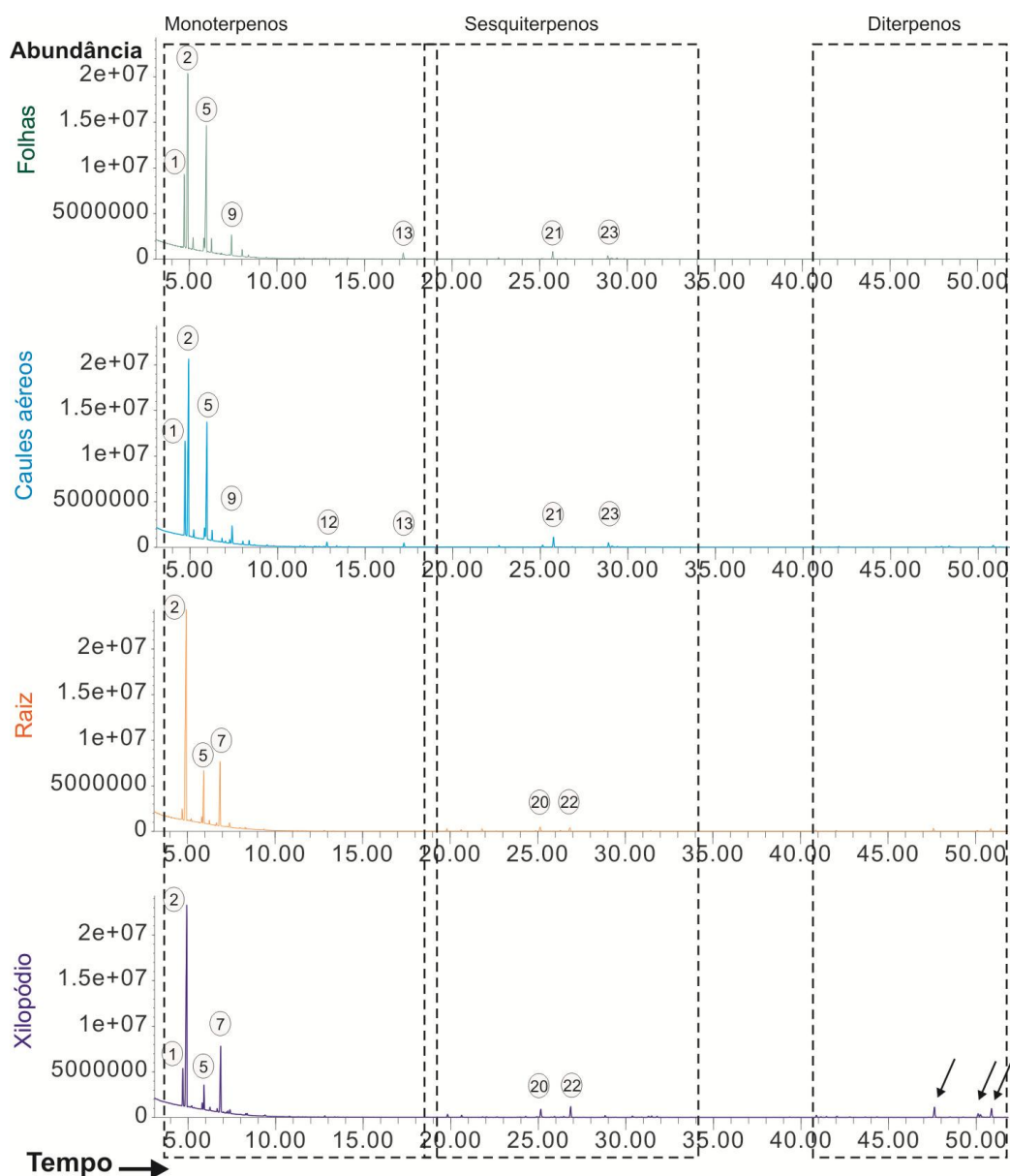


Figura 3. Cromatogramas de *Viguiera trichophylla* dos diferentes órgãos vegetativos. Números dos picos correspondem aos números da tabela 6. Setas = diterpenos não identificados. Tempo em minutos.

Tabela 5. Composição química e porcentagens relativas dos compostos nos óleos essenciais dos diferentes órgãos vegetativos de *Viguiera trichophylla*.

Composto	t _R (min)	IK _{calc}	% relativa			
			Folha	Caule aéreo	Raiz	Xilopódio
Monoterpenos			96,95	96,0	97,25	85,42
α-tujeno	4,70	927	12,51	17,04	2,32	7,23
α-pineno	4,94	936	39,97	38,5	66,01	56,45
Canfeno	5,21	948	1,65	1,09	-	-
Sabineno	5,79	973	2,96	2,41	1,28	1,11
β-pineno	5,89	979	30,75	26,97	10,49	4,1
Mirceno	6,24	991	2,12	1,58	0,71	0,61
3-careno	6,86	1011	-	0,66	15,35	15,06
ρ-cimeno	7,27	1024	-	0,64	-	-
D-limoneno	7,37	1028	4,26	3,45	1,09	0,86
β-ocimeno	7,65	1046	1,23	0,64	-	-
γ-terpineno	8,37	1057	-	0,86	-	-
4-terpineol	12,81	1176	-	1,13	-	-
Acetato de bornila	17,20	1284	1,5	1,03	-	-
Sesquiterpenos			3,05	4,0	2,75	10,36
α-longipineno	19,82	1346	-	-	-	0,87
Germacreno D	25,08	1477	-	-	1,57	2,57
Biciclogermacreno	25,71	1492	2,1	2,79	-	-
δ-cadineno	26,85	1521	-	-	1,18	3,29
Espatulenol	28,85	1574	0,95	1,21	-	-
ni	47,62	-	-	-	-	3,63
Diterpenos						4,22
ni	50,11	-	-	-	-	1,02
ni	50,62	-	-	-	-	3,2

tR = tempo de retenção; IK_{calc} = índice de Kovatz calculado; (-) = composto ausente; ni = composto não identificado.

A tabela 6 traz a composição química do óleo essencial das três espécies. É possível identificar compostos comuns as três e compostos exclusivos a cada uma delas.

Tabela 6. Composição química do óleo essencial de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*. Compostos em negrito correspondem aos compostos exclusivos para cada espécie.

(continua)

Pico n°	Composto	t _R (min)	MM (g.mol ⁻¹)	IK _{calc}	<i>V. filifolia</i>	<i>V. linearifolia</i>	<i>V. trichophylla</i>
Monoterpenos							
1	α -tujeno	4,70	136	927	-	+	+
2	α -pineno	4,94	136	936	+	+	+
3	Canfeno	5,21	136	948	+	+	+
4	Sabineno	5,79	136	973	+	+	+
5	β -pineno	5,89	136	979	+	+	+
6	Mirceno	6,24	136	991	+	+	+
7	3-careno	6,86	136	1011	-	+	+
8	ρ-cimeno	7,27	134	1024	-	-	+
9	D-limoneno	7,37	136	1028	+	+	+
10	β -ocimeno	7,65	136	1046	+	+	+
11	γ -terpineno	8,37	136	1057	-	+	+
12	4-terpineol	12,81	154	1176	-	+	+
13	Acetato de bornila	17,20	196	1284	+	-	+
Sesquiterpenos							
14	Germacreno B	17,92	204	1552	-	+	-
15	α-longipineno	19,82	204	1346	-	-	+
16	Copaeno	20,87	204	1372	+	-	-
17	Cipereno	21,81	204	1395	+	-	-
18	τ -cariofileno	22,60	204	1415	+	+	-
19	β-gurjuneno	23,10	204	1427	+	-	-
20	Germacreno D	25,08	204	1477	+	+	+
21	Biciclogermacreno	25,71	204	1492	+	+	+
22	δ -cadineno	26,85	204	1521	+	+	+
23	Espatulanol	28,85	220	1574	+	+	+

(continua)

Tabela 6. Composição química do óleo essencial de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*. Compostos em negrito correspondem aos compostos exclusivos para cada espécie.

(continuação)

24	Carotol	29,27	204	1588	-	+	-
25	Cubenol	31,44	222	1647	-	+	-
26	α-cadinol	31,63	222	1652	-	+	-

tR = tempo de retenção; MM = massa molecular (g.mol⁻¹), IKcalc = índice de Kovatz calculado. (+) = composto presente na espécie; (-) = composto ausente na espécie. Em negrito, compostos exclusivos de cada espécie.

4. Discussão

O rendimento dos óleos essenciais pode ser influenciado por diversos fatores, tais como o genótipo, o estágio de desenvolvimento da planta e as condições ambientais nas quais os indivíduos se encontram (Deschamps et al., 2008; Castro et al., 2004; Marotti et al., 1994). Para as espécies aqui estudadas, o rendimento dos OE's foi diferente para as espécies e entre os órgãos de uma mesma espécie. O rendimento total de *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla* foi cerca de três vezes maior que o de *V. linearifolia*. Em relação aos órgãos, para *V. filifolia* e *V. trichophylla*, as folhas apresentaram o maior rendimento, seguidas pelas raízes, enquanto em *V. linearifolia*, o maior rendimento foi para as raízes e em seguida, para os xilopódios.

A diferença no rendimento entre as espécies quando consideramos os órgãos pode estar relacionada à presença das estruturas secretoras, responsáveis pela produção dos óleos essenciais (Fahn, 1979). As folhas de *Viguiera linearifolia*, comparativamente às outras espécies, apresentaram um rendimento 20 vezes menor e isso pode estar associado ao fato de que o diâmetro dos canais secretores é menor enquanto o tamanho da folha é maior quando comparados com as demais espécies estudadas (Capítulo 1).

Em relação à composição química dos OE's, as três espécies apresentaram diferenças quali e quantitativas na sua constituição. Para as três espécies, os OE's são constituídos majoritariamente por monoterpenos, exceto para o OE dos caules aéreos de *Viguiera linearifolia*, que apresentou maior porcentagem de sesquiterpenos.

Para *Viguiera filifolia* os monoterpenos majoritários foram mirceno para os órgãos aéreos e α -pineno para os órgãos subterrâneos. Em relação aos sesquiterpenos, destacaram-se o biciclogermacreno e o espatulenol para os órgãos aéreos vegetativos e o cipereno para os

subterrâneos. Já em *V. linearifolia*, para as folhas, os compostos majoritários foram os monoterpenos α -tujeno, α -pineno, β -pineno e D-limoneno e para os caules aéreos, a predominância foi de sesquiterpenos, com destaque para os compostos germacreno D, biciclogermacreno e espatulenol. No sistema subterrâneo, os três monoterpenos identificados (α -pineno, β -pineno e 3-careno) representam cem por cento do óleo essencial das raízes e 92% do óleo dos xilopódios. Em *V. trichophylla*, os OE's dos órgãos aéreos apresentam os monoterpenos α -tujeno, α -pineno e β -pineno como compostos majoritários e para os órgãos subterrâneos, α -pineno e 3-careno.

Os monoterpenos α - e β -pineno, limoneno, 3-careno e mirceno são amplamente distribuídos e frequentemente encontrados juntos em óleos essenciais de folhas de diferentes espécies vegetais (Harborne & Turner, 1984). Para a espécie *Viguiera dentata*, no óleo essencial dos órgãos aéreos foi relatada a presença do limoneno (Canales et al., 2008). Esses compostos citados para as espécies do presente estudo também já foram relatados em outras espécies de Asteraceae, inclusive em espécies medicinais, tais como camomila (Borsato et al., 2007), em *Vernonia* sp. (Maia et al., 2010), em espécies de *Baccharis* (Agostini et al., 2005) e em *Eremanthus erythropappus* (Sousa et al., 2008).

Em relação aos sesquiterpenos, alguns podem ser amplamente distribuídos na natureza, como o trans-cariofileno, enquanto outros são mais restritos a certos grupos vegetais, como o carotol (Harborne & Turner, 1984). Os sesquiterpenos encontrados em *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* já foram relatados para outras espécies de Asteraceae (Souza et al., 2007; Agostini et al., 2005), e inclusive na espécie *Viguiera dentata* por Canales et al. (2008).

Alguns compostos majoritários nos OE's deste estudo têm sido apontados em estudos fitoquímicos, com diversas atividades biológicas. Canales et al. (2008), sugerem que a atividade antibacteriana do OE de *Viguiera dentata* pode estar relacionada à presença de limoneno, espatulenol e acetato de bornila, entre outros. A atividade antimicrobiana também já foi relatada para α - e β -pineno isolados (Leite et al., 2007). Sousa et al. (2008) mostraram a atividade do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*, constituído majoritariamente por β -pineno, trans-cariofileno, β -mirceno e germacreno D, contra bactérias e leveduras. Ensaios farmacológicos demonstraram ação analgésica para o β -mirceno (Lorenzetti et al., 1991). Ao biciclogermacreno tem sido atribuída atividade antifúngica (Silva et al., 2007) e antimicrobiana (Cysne et al., 2005; Constantin et al., 2001). Além disso, os compostos identificados como majoritários nesse estudo

são semelhantes aos encontrados em *Eupatorium polystachium* (Souza et al., 2007), e de acordo com os autores esses possuem aplicação como precursores químicos para a semissíntese de compostos voláteis com atividade biológica.

Com relação à taxonomia de espécies de Asteraceae, alguns estudos têm demonstrado a eficácia de marcadores químicos (Alvarenga et al., 2005; Flamini et al., 2002; Alvarenga et al., 2001; Emerenciano et al., 2001; Catalán et al., 1996; Emerenciano et al., 1987; King & Jones, 1982;) inclusive em espécies do gênero *Viguiera* (Ambrosio et al., 2004; Spring et al., 2003; Spring et al., 2001; Da Costa et al., 2001; Da Costa et al., 1996; Alvarez et al., 1985; Delgado et al., 1984;). No entanto, para o gênero, os estudos focam no perfil químico obtido através de extratos e não na composição dos óleos essenciais.

Apesar de o perfil químico das plantas poder ser utilizado como identificador das espécies, os constituintes majoritários e traços podem variar de acordo com o tipo de solo, as condições climáticas e sazonais (Mesquita et al., 2005; Erdtman, 1963), podendo essas variações ser de natureza quali e quantitativa (Da Costa et al., 2001), o que mostra a importância da análise de diversos espécimes da mesma espécie e se possível, que cresçam sob diferentes condições (Erdtman, 1963). Assim, o que deve ser considerado é o padrão de ocorrência dos componentes em diferentes plantas e órgãos, pois compostos isolados não caracterizam uma planta (Erdtman, 1963).

A maior parte dos estudos com óleos essenciais caracteriza apenas o óleo essencial das folhas ou órgãos aéreos (Apel et al., 2006; Agostini et al., 2005; Corrêa et al., 2004; Harborne & Turner, 1984). Neste estudo, ao analisar todos os órgãos vegetativos foi possível estabelecer um perfil químico mais completo das espécies. Assim, foram identificados alguns compostos comuns as espécies (α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, D-limoneno, β -ocimeno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadideno e espatulenol), que corroboram os dados da taxonomia que agrupam essas espécies em uma mesma seção (Magenta, 2006; Blake, 1918). Além disso, foram encontrados compostos exclusivos (copaeno, cipereno, trans-cariofileno e β -gurjuneno para *Viguiera filifolia*, germacreno B, carotol, cubenol e α -cadinol para *V. linearifolia* e p -cimeno e α -longipineno para *V. trichophylla*) que podem, em conjunto com os compostos comuns às três espécies, fornecer um perfil químico característico para cada uma delas, auxiliando na separação das mesmas.

5. Referências bibliográficas

- Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.
- Agostini, F.; Santos, A.C.A.; Rossato, M.; Pansera, M.R.; Zattera, F.; Wasum, R. & Serafini, L.A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15(3): 215-220. 2005.
- Alvarenga, S.A.V.; Ferreira, M.J.P.; Emerenciano, V.P. & Cabrol-Bass, D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 56: 27–37. 2001.
- Alvarenga, S.A.V.; Ferreira, M.J.P.; Rodrigues, G.V. & Emerenciano, V.P. A general survey and some taxonomic implications of diterpenes in the Asteraceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 291-308. 2005.
- Alvarez, L.; Mata, R.; Delgado, G. & Romo De Vivar, A. Sesquiterpene lactones from *Viguiera hypargyrea*. *Phytochemistry* 24(12): 2973-2976. 1985.
- Ambrosio, S.R.; Schoor, K. & Da Costa, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 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* 22: 1423-1415. 2008.
- Apel, M.A.; Sobral, M. & Henriques, A.T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(3): 402-407. 2006.
- Arakawa, N.S. Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). Tese de doutorado, Ribeirão Preto. 2007.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. & Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446–475. 2008.
- Blake, S.F. A revision of the genus *Viguiera*. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*. 54: 1-205. 1918.
- Borsato, A.V.; Doni-Filho, L.; Côcco, L.C. & Paglia, E.C. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] submetida à secagem à 70° C. *Ciências Agrárias* 28(4): 635-644. 2007.

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

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. & Ávila, G. Antimicrobial activity of the extracts and essential oil of *Viguiera dentata*. *Parmaceutical Biology* 46: 719-723. 2008.

Candan, F.; Unlu, M.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sökmen, A. & Akpulat, H.A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 87: 215–220. 2003.

Castro, D.P.; Cardoso, M.G.; Moraes, J.C.; Santos, N.M. & Baliza, D.P. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 8(4): 27-32. 2006.

Castro, H.G.; Oliveira, L.O.; Barbosa, L.C.A.; Ferreira, F.A.; Silva, D.J.H.; Mosquim, P.R. & Nascimento, E.A. Teor e Composição química do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. *Química Nova* 27(1): 55-57. 2004.

Catalán, C.A.N; Borkosky, S. A. & Joseph-Nathan, P. The secondary metabolite chemistry of the Subtribe Gochnatiinae (Tribe Mutisieae, Family Compositae). *Biochemical Systematics and Ecology* 24(7/8): 659-718. 1996.

Cestari, V.M.; Sarti, S.J; Waib, C.M. & Branco Jr., A.C. Evaluation of the Potential Insecticide Activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) Essential Oil Against the Head Lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotropical Entomology* 33(6):805-807 (2004).

Constantin, M.B.; Sartorelli, P.; Limberger, R.; Henriques, A.T.; Steppe, M.; Ferreira, M.J.P.; Ohara, M.T.; Emerenciano, V.P. & Kato, M.J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. *Planta Med* 63: 771-773. 2001.

Corrêa, R.M.; Bertolucci, S.K.V.; Pinto, J.E.B.P.; Reis, E.S. & Alves, T.L. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. *Ciência e Agrotecnologia* 28(2): 339-344. 2004.

Cysne, J.B.; Canuto, K.M.; Pessoa, O.D.L.; Nunes, E.P. & Silveira, E.R. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(6B): 1378-1381. 2005.

Da Costa, F.B. Asteraceae: química e potencial farmacológico. Texto sistematizado para obtenção de livre docência. Ribeirão Preto. 2008.

- Da Costa, F.B.; Shorr, K.; Arakawa, N.S.; Shilling, E.E & Spring, O. Intraspecific variation in the chemistry of glandular trichomes of two Brazilian *Viguiera* species (Heliantheae; Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12(3): 403-407. 2001.
- Da Costa, F.B.; Vichnewski, W. & Herzi, W. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. *Biochemical Systematics and Ecology* 24(6): 585-587. 1996.
- Delgado, G.; Alvarez, L. & Romo De Vivar, A. Terpenoids and a Flavan-3-ol from *Viguiera quinquerradiata*. *Phytochemistry* 23(3): 675-678. 1984.
- 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* 32(3): 725-730. 2008.
- Emerenciano, V.P.; Ferreira, Z.S.; Kaplan, M.A.C. & Gottlieb, O.R. A Chemosystematic analysis of tribes of Asteraceae involving sesquiterpene lactones and flavonoids. *Phytochemistry* 26(12): 3103-3115. 1987.
- Emerenciano, V.P.; Milit, J.S.L.T.; Campos, C.C.; Romoff, P.; Kaplan, M.A.C.; Zambon, M. & Brant, A.J.C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 947-957. 2001.
- Erdtman, H. Some aspects of chemotaxonomy. In: T. Swain (ed.), *Chemical plant taxonomy*, pp. 89-125. Academic Press, London and New York. 1963, 543p.
- Fahn, A. 1979. *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press, London. 302p.
- Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. In: Hallahan, D. L.; Gray, J. C. *Advances in botanical research: Plant trichomes*. London: Academic Press. Chapter 2: 37-75.
- Ferreira, Z.S. & Gottlieb, O.R. Polyacetylenes as Systematic Markers in Dicotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology* 10(2): 155-160. 1982.
- Ferronato, R.; Marchesan, E.D.; Pezenti, E.; Bednarski, F. & Onofre, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(2): 224-230. 2007.
- Flamini, G.; Ertugrul, K.; Cioni, P.L.; Morelli, I.; Dural, H. & Bagci, Y. Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* and *C. hadimensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 953-959. 2002.
- Hegnauer, R. The chemistry of the Compositae. In: Haywood, V.H.; Harborne, J.B. & Turner, B.L. (Eds.) *The biology and chemistry of the Compositae*. London. Academic Press, Chapter 10. 283-335 p., 1977.

- Harborne, J.B. & Turner, B.L. Plant Chemosystematics. London: Academic Press, 1984, 562p.
- King, B.L. & Jones, S.B. Chemosystematics of Vernonia Series Flexuosae (Vernonieae; Compositae). Bulletin of the Torrey Botanical Club 109(3): 279-286. 1982.
- Leite, A.M.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Diniz, M.F.F.M.; Trajano, V.N. & Medeiros, I.A. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 43(1): 121-126. 2007.
- Lorenzetti, B.B.; Souza, G.E.; Sarti, S.J.; Santos Filho, D. & Ferreira, S.H. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. Journal of Ethnopharmacology 34: 43-48. 1991.
- Magenta, M.A.G. *Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da USP. 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 brasiliiana*: composição química e atividade biológica. Química Nova, São Paulo 33(3): 584-586. 2010.
- Marotti, M.; Piccaglia, R.; Giovanelli, E.; Deans, S. G. & Eaglesham, E. Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. Journal of Flavour and Fragrance 9(3): 125-129. 1994.
- Marquina, S.; Maldonado, N.; Garduño-Ramírez, M.L.; Aranda, E.; Villarreal, M.L.; Navarro, V.; Bye, R.; Delgado, G. & Alvarez, L. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. Phytochemistry 56: 93-97. 2001.
- Mesquita, J.M.O.; Cavaleiro, C.; Cunha, A.P.; Lombardi, J.A. & Oliveira, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia 15(1): 6-12. 2005.
- 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 80: 432-436. 2009.
- Robinson, H. & Moore, A.J. New species and new combinations in *Rhyssolepis* (Heliantheae – Asteraceae). Proceedings of the Biological Society of Washington 117(3): 423-446. 2004.
- Schilling, E.E. & Panero, J.L. Evidence for a close relationship between *Iostephane* and *Viguiera* (Asteraceae-Heliantheae). American Journal of Botany 78(8): 1054-1062. 1991.

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* 57(3): 323–332. 2000.

Siedle, B.; García-Piñeres, A.J.; Murillo, R.; Schulte-Mönting, J.; Castro, V.; Rüngeler, P.; Klaas, C.A.; Da Costa, F.B.; Kisiel, W. & Merfot, I. Quantitative Structure-Activity Relationship of Sesquiterpene Lactones as Inhibitors of the Transcription Factor NF- κ B. *Journal of Medicinal Chemistry* 47: 6042-6054. 2004.

Silva, L.; Oniki, G.H.; Agripino, D.G.; Moreno, P.R.H.; Young, M.C.M.; Mayworm, M.A.S. & Ladeira, A.M. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(3): 361-367. 2007.

Simões, C.M.O. & Spitzer, V. Óleos Voláteis. In: Simões, C.M.O; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.de; Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* - 6ª Ed., Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editorada UFSC, p. 467-496. 2010.

Sousa, O.V.; Dutra, R.C.; Yamamoto, C.H. & Pimenta, D.S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. *Revista Brasileira de Farmácia* 89(2): 113-116. 2008.

Souza, M.C.; Siani, A.C.; Ramos, M.F.S.; Menezes-De-Lima Jr, O.; Henriques, M.G.M. O. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 58(8): 582-586. 2003.

Souza, T.J.T.; Apel, M.A.; Bordignon, S.; Matzenbacher, N.I.; Zuanazzi, J.A.S. & Henriques, A.T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(3): 368-372. 2007.

Spring, O.; Zipper, R.; Conrad, J.; Vogler, B.; Klaiber, I. & Da Costa, F.B. Sesquiterpene lactones from glandular trichomes of *Viguiera radula* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry* 62: 1185-1189. 2003.

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* 57: 267-272. 2001.

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* 562: 155-163. 2007.

Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3–19. 2003.

Capítulo 3:
Germinação de sementes de três espécies de
***Viguiera* Kunth (Heliantheae – Asteraceae)**

Germinação de sementes de três espécies de *Viguiera* Kunth (Heliantheae – Asteraceae)

Resumo: O gênero *Viguiera* é um dos maiores da família Asteraceae e seus representantes são encontrados principalmente em regiões com inverno seco, devido à presença de um sistema subterrâneo espessado. No entanto, para essas espécies, estudos preliminares indicam que não ocorre propagação vegetativa pelo sistema subterrâneo e o estudo da propagação sexuada se faz importante dado o risco de extinção de *Viguiera filifolia* e *V. linearifolia*. Além disso, a literatura carece de informações sobre as estratégias de reprodução das três espécies. Assim, o objetivo do trabalho foi estudar o comportamento germinativo e determinar a faixa ideal de temperatura para a germinação das sementes de *V. filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*. Para isso, 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. Foi também realizado o teste de sanidade das sementes de *V. filifolia*. As temperaturas ideais para germinação de *V. filifolia* e *V. trichophylla* foram as de 20 e 25 °C e para a espécie *V. linearifolia* nenhum dos tratamentos se sobressaiu estatisticamente. O número de sementes sem embrião foi significativo para a espécie *V. linearifolia* e contribuiu para as baixas taxas germinativas. O teste de sanidade permitiu identificar seis táxons de fungos, mas esses não influenciaram na germinação das sementes de *V. filifolia*.

Palavras-chave: Compositae, propagação, *Viguiera filifolia*, *Viguiera linearifolia*, *Viguiera trichophylla*.

1. Introdução

Viguiera Kunth é um dos gêneros mais representativos da família Asteraceae, exclusivamente americano e com aproximadamente 180 espécies (Bremer, 1994; Magenta, 2006). No Brasil, essas plantas podem ser encontradas em diferentes localidades (Bringel Jr. & Cavalcanti, 2009; Almeida et al., 2005; Mondin, 2004; Nakajima & Semir, 2001). No entanto, sua maior ocorrência é citada em regiões sob climas que apresentam inverno seco (Magenta, 2006).

A maior ocorrência de espécies de *Viguiera* sob essas condições pode estar ligada ao tipo de sistema subterrâneo espessado, que certamente provê as necessidades hídricas da planta na fase de dormência (Zaidan & Carreira, 2008; Magenta, 2006), e tem papel fundamental na regeneração das partes vegetativas (Lindman, 1906). Em espécies de Asteraceae foi verificada a presença de sistemas subterrâneos espessados com capacidade de produção de gemas (Appezzato-da-Glória et al., 2008). Tais sistemas podem ser morfologicamente diversos, tais como xilopódios, rizóforos, raízes gemíferas e sistemas subterrâneos difusos (Appezzato-da-Glória & Cury 2011; Appezzato-da-Glória et al., 2008; Hayashi & Appezzato-da-Glória, 2007; Vilhalva & Appezzato-da-Glória, 2006) e possuem capacidade de propagação vegetativa. No entanto, há registros de espécies que mesmo apresentando sistema subterrâneo espessado não se propagam vegetativamente e a eficiência na reprodução sexuada é o que garante a manutenção da espécie no ambiente (Cury et al., 2010).

Estudos sobre a reprodução de espécies vegetais são importantes para auxiliar na proposta de estratégias que garantam o desenvolvimento sustentado (Gomes & Fernandez, 2002) e conservação de espécies. Uma forma de estimar a eficiência reprodutiva de uma espécie é através do comportamento germinativo de suas sementes (Cury et al., 2010). Dentre os estudos sobre a germinação de sementes de espécies brasileiras da família Asteraceae estão os de Cury et al. (2010), Garcia et al. (2006), Velten & Garcia et al. (2005), Gomes & Fernandez (2002) e Ferreira et al. (2001). No entanto, pouco se sabe sobre as estratégias de propagação das espécies do gênero *Viguiera* e apenas para *V. robusta* foi descrito o comportamento germinativo e desenvolvimento (Ruggiero & Zaidan, 1997).

Além disso, há a preocupação quanto à propagação das espécies nativas do gênero, pois *Viguiera filifolia* Sch. Bip. Ex Baker e *V. linearifolia* Chod. & Hassl. constam na lista das espécies da flora brasileira como criticamente em perigo (Site Cria, 2011; Brasil, 2008) e a literatura sobre elas é escassa e apesar de *V. trichophylla* Dusén não constar na lista, a literatura referente a essa espécie também é rara. Visto que para as espécies brasileiras de *Viguiera* é relatada a presença um sistema subterrâneo composto pelo xilopódio e raízes adventícias (Magenta, 2006) e que as análises morfológicas indicam que tais espécies não se propagam pelo sistema subterrâneo, pois se trata de um órgão lenhoso, com gemas axilares apenas na porção apical, próxima ao solo e as raízes não possuem capacidade gemífera, o objetivo desse trabalho foi estudar o comportamento germinativo e determinar a faixa ideal de temperatura para a germinação das sementes de *V. filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*.

2. Material e métodos

2.1 Coleta e armazenamento das cipselas

Os experimentos de germinação de sementes foram realizados no Laboratório de Sementes do Departamento de Produção Vegetal, USP/ESALQ/LPV. Para a realização dos mesmos foram utilizadas cipselas coletadas de plantas de *Viguiera filifolia* Sch. Bip. Ex Baker, *V. linearifolia* Chod. & Hassl. e *V. trichophylla* Dusén de populações naturais provenientes de Alto Paraíso de Goiás, em vegetação de Cerrado não antropizado no estado de Goiás, Ponta Porã no estado de Mato Grosso do Sul, em região de Cerrado antropizado, e de Palmeira no estado do Paraná, em região de campo úmido, também antropizada, respectivamente.

As plantas foram identificadas pela especialista no gênero Profa. Dra. Mara Angelina Galvão Magenta e incorporadas ao herbário da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESA) sob os número 111848, 113164 e 111850, respectivamente.

De acordo com Marzinek et al. (2008) em Asteraceae os frutos são do tipo cipsela. Nas espécies desse estudo não foi possível fazer a remoção da semente do fruto e, portanto para os experimentos utilizou-se a unidade de propagação composta por fruto e semente.

2.2 Instalação do experimento e acompanhamento da germinação das sementes

Os capítulos coletados foram espalhados sobre papel, mantidos a 22 °C no laboratório até a secagem, armazenados por três meses (para padronização, em função da época diferente da coleta) em sacos de papel e mantidos na mesma temperatura.

As sementes foram removidas dos capítulos manualmente, homogeneizadas em uma bandeja e selecionadas, sendo que as sementes murchas ou predadas foram descartadas. Após o descarte, as sementes aparentemente normais foram selecionadas manualmente para a colocação nas caixas de germinação e não foi possível determinar se as mesmas continham ou não embrião, com base no seu aspecto físico externo ou por pressão.

Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento. Para *V. filifolia* e *V. trichophylla*, foram utilizadas 25 sementes em cada repetição e para *V. linearifolia* foram utilizadas 21 sementes por repetição para o tratamento 30 °C e 24 sementes por repetição para os demais tratamentos. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, hidratadas com 13 ml de água destilada, e colocadas em caixas plásticas transparentes (13x13x3,5cm) previamente esterilizadas. As caixas foram distribuídas em seis câmaras de germinação, marca Marconi, modelo MA 402, em temperaturas constantes de 20 °C, 25 °C e 30 °C e alternadas de 15-35 °C, 20-30 °C e 20-35 °C, em fotoperíodo diário de 8h. Em todas as câmaras de germinação, a luz foi fornecida por lâmpada fluorescente com uma irradiância de 40.32 mmol m⁻² s⁻¹.

O processo de germinação foi avaliado diariamente até 32 dias, pois após esse período não foi verificada a germinação de sementes. Quando necessário, o papel foi umedecido, garantindo o suprimento de água para as sementes durante o experimento. As sementes foram consideradas germinadas quando originaram plântulas normais, ou seja, providas de dois cotilédones, hipocótilo e raiz primária (Brasil, 2009). Também foram contabilizadas as sementes não germinadas.

Ao final do experimento foram calculados o índice de velocidade de germinação (IVG), de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962), o tempo médio de germinação (Labouriau, 1983) e a porcentagem de germinação para cada espécie.

Para as análises estatísticas, os valores obtidos foram verificados quanto à distribuição normal pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{\%/100}$ e quando o parâmetro apresentou valores iguais a zero, em $\sqrt{x + 0,5}$. Em seguida, os resultados

foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa SAS (SAS/STAT, 2003).

2.3 Análise das sementes não germinadas

Após a última avaliação, as sementes foram mantidas nas mesmas condições por um período adicional de 10 dias para garantir a estabilização do processo de germinação. Ao final desse período, as sementes não germinadas foram analisadas quanto à presença do embrião e à viabilidade do mesmo.

Para a análise, foi realizada uma secção transversal no fruto logo abaixo da região de inserção do pápus e quando a semente continha embrião, este foi retirado e avaliado quanto à viabilidade pelo teste de tetrazólio utilizando o método descrito por Cury et al. (2010).

2.4 Teste de sanidade das sementes

No decorrer do experimento, para a espécie *Viguiera filifolia* foi registrada a incidência de fungos em todos os tratamentos e repetições. Em função disso, realizou-se um teste de sanidade para identificação dos fungos presentes na superfície das sementes.

Para isso, foram selecionadas 100 sementes da mesma forma como descrito para o teste de germinação e essas foram distribuídas em quatro placas de Petri sobre três folhas de papel de filtro embebidas em água (25 sementes por placa). Essas placas foram mantidas sob temperatura constante de 20 °C, fotoperíodo diário de 12h de luz, por sete dias. Após esse período foi feita a identificação dos fungos presentes a partir das colônias estabelecidas.

O teste de sanidade de sementes foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, USP/ESALQ.

3. Resultados

3.1 Experimento de germinação de sementes

Para as sementes de *Viguiera filifolia* as porcentagens de germinação (Tabela 1) obtidas nas temperaturas de 20 e 25 °C foram significativamente superiores as dos demais tratamentos, exceto na temperatura de 20-30 °C. No tratamento 15-35 °C a porcentagem de germinação foi significativamente inferior às demais. Os valores de IVG e tempo médio de germinação também

foram estatisticamente superiores para as temperaturas de 20 e 25 °C. Já para *V. linearifolia* os valores de porcentagem de germinação, IVG e tempo médio de germinação foram similares entre os tratamentos. Apenas para o tratamento 15-35 °C os valores de tempo médio de germinação foram estatisticamente inferiores.

Para *Viguiera trichophylla*, os valores de porcentagem de germinação foram similares entre os tratamentos exceto para 20-35 °C, cujos resultados foram inferiores e só não diferiram estatisticamente das condições de 30 e 20-30 °C. O tratamento de 15-35 °C também foi eficiente considerando a taxa de germinação de sementes, porém esse tratamento apresentou o maior tempo médio de germinação diferindo significativamente das demais condições.

Tabela 1. Porcentagem de germinação (G, %), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TM, dias) de sementes de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla* avaliados em diferentes temperaturas e em fotoperíodo de 8h de luz. Para cada espécie, na mesma coluna, letras iguais não diferem estatisticamente.

Espécie	Temperatura (°C)	G (%)	IVG	TM (dias)
<i>Viguiera filifolia</i> (n = 750)	20	50 a	1,14 ab	11,81 a
	25	48 a	1,29 a	10,05 a
	30	33 bc	0,76 c	12,71 ab
	15-35	8 d	0,10 d	23,73 c
	20-30	41 ab	0,89 bc	12,63 ab
	20-35	22 c	0,34 d	17,40 b
<i>Viguiera linearifolia</i> (n = 705)	20	29 a	0,49 a	14,73 a
	25	22 a	0,43 ab	12,79 a
	30	13 a	0,23 ab	12,55 a
	15-35	17 a	0,21 b	21,75 b
	20-30	28 a	0,49 a	14,54 a
	20-35	20 a	0,34 ab	15,09 a
<i>Viguiera trichophylla</i> (n = 750)	20	47 a	1,68 ab	7,30 a
	25	54 a	2,54 a	5,85 a
	30	34 ab	1,49 b	6,98 a
	15-35	50 a	1,26 b	10,48 b
	20-30	42 ab	1,60 b	7,22 a
	20-35	22 b	0,77 b	7,60 a

3.2 Análise das sementes não germinadas

A análise das sementes de *Viguiera filifolia* que não germinaram indicou que 23% das sementes não tinham o embrião e 32% das sementes estavam mortas, enquanto para *V.*

linearifolia, 67% das sementes estavam sem embrião e 6% mortas. *V. trichophylla* apresentou 21% de sementes sem embrião e 27% de sementes mortas. Além da não formação de embrião e da presença de sementes mortas, outro fator que afetou a taxa de germinação foi a geração de plântulas anormais, que representou 9% em *V. filifolia*, 5% em *V. linearifolia* e 10% em *V. trichophylla* (Tabela 2). Nas três espécies foram poucas as sementes viáveis não germinadas. No entanto, para *V. filifolia* e *V. linearifolia* o número de sementes viáveis não germinadas foi significativamente maior no tratamento 15-35 °C (Tabela 2).

Tabela 2. Análise das sementes com germinação de plântulas anormais ou não germinadas de *Viguiera filifolia*, *V. linearifolia* e *V. trichophylla*. Porcentagem de plântulas anormais, de sementes viáveis, de sementes mortas e de sementes sem embrião. Para cada espécie, na mesma coluna, letras iguais não diferem estatisticamente.

Espécie	Temperatura °C	Plântulas		Sementes não germinadas (%)					
		anormais (%)		Viáveis		Mortas	Sem embrião		
<i>V. filifolia</i>	20	0	c	0	b	24	a	26	ab
	25	4	bc	0	b	33	a	15	b
	30	11	ab	1	b	33	a	22	ab
	15-35	26	a	10	a	42	a	14	b
	20-30	5	bc	1	b	27	a	26	ab
	20-35	12	ab	2	b	28	a	36	a
	Total	9		2		32		23	
<i>V. linearifolia</i>	20	1	b	0	b	8	a	62	a
	25	3	ab	0	b	3	a	72	a
	30	5	ab	0	b	11	a	71	a
	15-35	10	a	3	a	7	a	63	a
	20-30	3	ab	0	b	4	a	65	a
	20-35	8	ab	0	b	5	a	67	a
	Total	5		1		6		67	
<i>V. trichophylla</i>	20	2	c	0	a	30	a	21	ab
	25	2	c	0	a	21	a	23	ab
	30	17	ab	0	a	37	a	12	b
	15-35	9	abc	2	a	26	a	13	b
	20-30	6	bc	0	a	21	a	31	a
	20-35	22	a	0	a	30	a	26	ab
	Total	10		0		27		21	

3.3 Teste de sanidade de sementes

Com o teste de sanidade das sementes de *Viguiera filifolia* foi possível identificar a ocorrência de seis táxons de fungos diferentes, sendo eles: *Alternaria alternata* que ocorreu em 98% das sementes, *Cladosporium* sp. em 90%, *Fusarium* spp. em 9%, *Alternaria* sp. em 1%, *Phoma* sp. em 1% e *Nigrospora* sp. em 1%.

4. Discussão

As maiores taxas germinativas foram obtidas sob as temperaturas de 20 e 25 °C para *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla* e para a espécie *V. linearifolia* nenhum dos tratamentos se sobressaiu estatisticamente. No entanto, se forem considerados os parâmetros porcentagem de germinação, IVG e tempo médio em conjunto, as temperaturas de 20, 25 e 20-30 °C foram as que apresentaram os melhores resultados para a última espécie. Já os tratamentos de 15-35 °C para *V. filifolia* e 20-35 °C para *V. trichophylla* foram os tratamentos estatisticamente inferiores, não sendo indicados para a germinação de sementes dessas espécies.

Em relação aos outros estudos de germinação de espécies de Asteraceae (Cury et al., 2010; Garcia et al., 2006; Velten & Garcia, 2005; Gomes & Fernandez, 2002; Ferreira et al., 2001), é possível afirmar que diferentes espécies apresentam comportamento germinativo diferenciado, respondendo a faixas distintas de temperatura, com variação nas taxas germinativas. Para algumas espécies medicinais do Cerrado, foi relatado que as sementes germinam normalmente em temperaturas constantes de 25 ou 30 °C (Albuquerque et al., 2003). Para as sementes da espécie *Viguiera robusta*, Ruggiero & Zaidan (1997) indicaram que a temperatura alternada 20-30 °C foi a mais adequada para a germinação das sementes, o que evidencia comportamento germinativo diferenciado entre as espécies do mesmo gênero.

Em relação às sementes não germinadas, notou-se um maior número de plântulas anormais formadas sob as condições que foram desfavoráveis à germinação de sementes. Outro fator relevante foi o valor de sementes viáveis que não germinaram no tratamento de 15-35 °C, que para a espécie *Viguiera filifolia* coincidiu com o tratamento menos eficiente, evidenciando que essa variação de temperatura não é eficiente para a germinação e ainda, que pode retardar o

processo germinativo, o que justificaria a presença de embriões ainda viáveis nas sementes não germinadas.

A germinação das sementes das três espécies mostrou-se mais lenta na temperatura de 15-35 °C que em *Viguiera filifolia* coincidiu com os menores valores de porcentagem de germinação. Já nos tratamentos que conferiram os melhores valores de porcentagem de germinação, os valores de IVG tenderam a ser superiores e, conseqüentemente, os valores de tempo médio de germinação tenderam a ser inferiores. De acordo com Ferreira et al. (2001), o tempo médio ou velocidade de germinação é um bom indicador da rapidez de ocupação de um território por uma espécie em um determinado ambiente, ou seja, sua capacidade de propagação em seu hábitat. Conforme proposto por esses autores, as espécies podem ser classificadas em função da velocidade de germinação de suas sementes. Valores altos de IVG e baixos de tempo médio indicam uma germinação rápida, característica de espécies que conseguem se estabelecer no ambiente o mais rápido possível sob condições ambientais favoráveis (Velten & Garcia, 2005). Assim, *V. filifolia* e *V. linearifolia* são espécies de germinação lenta, enquanto *V. trichophylla* classifica-se como intermediária. Ruggiero & Zaidan (1997) em experimento com sementes de *V. robusta* afirmaram que para a espécie a germinação é lenta.

Gomes & Fernandez (2002) destacam a importância da rapidez na germinação para que uma espécie seja apta à recuperação de áreas degradadas ou ainda à ocupação de um ambiente. As sementes de *Viguiera linearifolia* e *V. trichophylla* foram coletadas em áreas perturbadas e em populações reduzidas, sendo que originalmente as suas áreas de ocorrência eram regiões de vegetação aberta, em área pedregosa e em campo úmido, respectivamente (Magenta, 2006). No entanto, as áreas perturbadas são frequentemente invadidas por gramíneas exóticas (Freitas & Pivello, 2005) e isso se torna uma ameaça à biota nativa desses locais (Souza et al., 2005), pois dificulta a germinação das sementes no solo e o estabelecimento das plântulas das espécies que ocorrem nesse ambiente.

Diversos fatores podem influenciar na taxa de germinação das sementes tais como a diminuição da viabilidade das sementes durante o armazenamento (Gomes & Fernandez, 2002; Sasaki et al., 1999), o número de sementes sem embriões (Cury et al., 2010; Velten & Garcia, 2005; Sasaki et al., 1999) e a coleta de sementes imaturas (Albuquerque et al., 2003). Para as espécies *Viguiera filifolia* e *V. trichophylla*, o número de sementes desprovidas de embrião foi relativamente baixo, contrastando diversos estudos que relatam altos valores de sementes

desprovidas de embrião em diversas espécies da família Asteraceae (Cury et al., 2010; Velten & Garcia, 2005; Sassaki et al., 1999). Já *V. linearifolia*, assim como os estudos citados, apresentou um número significativo de sementes desprovidas de embrião.

A ausência de sementes em frutos de Asteraceae não pode ser identificada pois, devido ao pequeno envolvimento de energia na produção do pericarpo, visto que não há o aumento de camadas pericárpicas, o desenvolvimento do fruto mantém-se inalterado enquanto a semente nem sempre apresenta-se bem formada (Marzinek, 2008). Alguns autores ainda relacionam a ausência de embriões em sementes de Asteraceae com o tipo de sistema reprodutivo, que variam de apomixia e partenocarpia (Bertasso-Borges & Coleman, 2005; Werpachowski et al., 2004) a auto-incompatibilidade genética (Hiscock, 2000; Richards, 1986) e também ao aborto de sementes (Marzinek, 2008).

A presença de fungos em sementes é relatada para diversas espécies, inclusive da família Asteraceae (Moreira, 2010; Reis et al., 2006; Lima et al., 2003). O aparecimento de fungos durante a germinação pode resultar em um número elevado de sementes infestadas ou mortas bem como em plântulas doentes; assim, a contaminação de sementes pode afetar a qualidade e, em alguns casos, inibir a germinação (Botelho et al., 2008; Castellani et al., 1996). No entanto, na espécie *Viguiera filifolia* o único tratamento que resultou na maior produção de plântulas anormais foi na temperatura de 15-35 °C na qual a taxa de germinação foi inferior o que ratifica a observação de Oliveira et al. (2003) de que apesar do elevado grau de infestação das sementes, a germinação pode não ser comprometida.

5. Referências bibliográficas

- Albuquerque, M.C.F.; Coelho, M.F.B. & Albrecht, J.M.F. Germinação de sementes de espécies medicinais do cerrado, *In*: Coelho, M.F.B.; Costa Jr., P.; Dombroski, J.L.D. (Orgs.). Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais. Cuiabá: Unicen, 157-182. 2003.
- Almeida, A.M.; Fonseca, C.R.; Prado, P.I.; Almeida-Neto, M.; Diniz, S.; Kubota, U.; Braun, M.R.; Raimundo, R.L.G.; Anjos, L.A.; Mendonça, T.G.; Furtado, S.M. & Lewinsohn, T.M. Diversidade e ocorrência de Asteraceae em Cerrados de São Paulo. *Biota Neotropica* 5(2): 1-17. 2005.
- Appenzato-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* 83: 981-992. 2011.
- Appenzato-da-Glória, B.; Hayashi, A.H.; Cury, G.; Misaki-Soares, M.K. & Rocha, R. Occurrence of secretory structures in underground systems of seven Asteraceae species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 157: 789-796. 2008.
- Bertasso-Borges, M.S. & Coleman, J.R. Cytogenetics and embryology of *Eupatorium laevigatum* (Compositae). *Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto* 28(1): 123-128. 2005.
- Botelho, L.da S.; Moraes, M.H.D. & Menten, J.O.M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. *Summa Phytopathologica* 34(4): 343-348. 2008.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa nº 6. Setembro de 2008.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009, 399 p.
- Bremer, K. Asteraceae: cladistics and classification. Portland: Timber Press, 1994, 752p.
- Bringel Jr., J.B. De A. & Cavalcanti, T.B. Heliantheae (Asteraceae) na Bacia do Rio Paraná (Goiás, Tocantins), Brasil. *Rodriguésia* 60(3): 551-580. 2009.
- Castellani, E.D.; Silva, A.da; Barreto, M. & Aguiar, I.B. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. var. *Variegata*. *Revista Brasileira de Sementes* 18(1): 41-44. 1996.

Cury, G.; Novembre, A.D.L.C. & Appezzato-da-Glória, B. Seed Germination of *Chresta sphaerocephala* DC. and *Lessingianthus bardanoides*. Brazilian Archives of Biology and Technology 53(6): 1299-1308. 2010.

Cury, G. Sistemas subterrâneos de Asteraceae do Cerrado Paulista: abordagens anatômica, ecológica e reprodutiva. Tese de doutorado. 2008.

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 Botanica Brasilica 15(2): 231-242. 2001.

Freitas, K.G. & Pivello, V.R. A Ameaça das Gramíneas Exóticas à Biodiversidade. In Pivello, V.R. & Varanda, E.M. (orgs.) O Cerrado Pé-de-Gigante (Parque Estadual de Vassununga, SP) - Ecologia e Conservação. São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2005, 256 p.

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 Botanica Brasilica 20(2): 443-448. 2006.

Gomes, V. & Fernandez, G.W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). Acta Botanica Brasilica 16: 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 50(6): 979-988. 2007.

Hiscock, S.J. Self-incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). Annals of Botany 85: 181-190. 2000.

Laboriau, L.G. A germinação de sementes. Washington: Secretaria geral da OEA, 1983, 174p.

Lima, M.L.P.; Reis, A. & Lopes, C.A. Patogenicidade de *Alternaria cichorii* sobre espécies da família Asteraceae no Brasil. Fitopatologia Brasileira 28(6): 682-685. 2003.

Lindman, C.A.M. A vegetação no Rio Grande do Sul. EDUSP/Itatiaia, São Paulo/Belo Horizonte, Brasil, 1906, 377 p.

Magenta, M.A.G. *Viguiera* Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e sistemática das espécies do Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da USP. 2006.

Maguire, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science 2: 176-177. 1962.

Marzinek, J. Aspectos estruturais de órgãos reprodutivos de seis espécies de *Eupatorieae* (Asteraceae), com ênfase na ontogênese das cipselas e sementes. Tese de doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 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* 31(3): 549-553. 2008.

Mondin, C.A. Levantamento da tribo Heliantheae Cass. (Asteraceae), *sensu stricto*, no Rio Grande do Sul, Brasil. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

Moreira, F.J.C. Fungos associados às Oleaginosas mamona, girassol, amendoim e gergelim na região do Cariri, no Estado do Ceará. Congresso Brasileiro de Mamona, 4º Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa. Inclusão Social E Energia: Anais... Campina Grande: Embrapa Algodão, pp. 996-1001. 2010.

Nakajima, J.N. & Semir, J. Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24(4): 471-478. 2001.

Oliveira, L.M.; Davide, A.C. & Carvalho, M.L.M. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium*) (Sprengel) Taubert. *Revista Árvore* 27(5): 597-603. 2003.

Reis, A.; Satelis, J.F.; Pereira, R.S. & Nascimento, W.M. Associação de *Alternaria dauci* e *A. alternata* com sementes de coentro e eficiência do tratamento químico. *Horticultura Brasileira* 24: 107-111. 2006.

Richards, A.J. Plant breeding systems. London, George Allen and Unwin, 1986, 544p.

Ruggiero, P.G.C. & Zaidan, L.B.P. Estudos de desenvolvimento de *Viguiera robusta* Gardn., uma Asteraceae do Cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 20: 1-9. 1997.

SAS Institute. SAS System: SAS/STRAT version 9.1 (software). Cary, 2003.

Sasaki, R.M., Rondon, J.N., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M. Germination of seeds from herbaceous plants artificially stored in Cerrado soil. *Revista Brasileira de Biologia* 59: 271-279. 1999.

Site Cria. Centro de Referência de Informação Ambiental. Disponível em: <http://names.cria.org.br/>. Acesso em 18-07-2011.

Souza, A.; Moraes, M.G. & Ribeiro, R.C.L.F. Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. *Acta Botanica Brasilica* 19(1): 81-90. 2005.

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 Botanica Brasilica* 19: 753-761. 2005.

Vilhalva, D.A.A. & Appezzato-Da-Glória, B. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Callea verticillata* (Klatt) Pruski e *Isostigma megapotamicum* (Spreng.) Sherff – Asteraceae. *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 29-47. 2006.

Werpachowski, J.S.; Varassin, I.G. & Goldenberg, R. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. *Revista Brasileira de Botânica* 27(3): 607-613. 2004.

Zaidan, L.B.P. & Carreira, R.C. Germination Ecophysiology of Cerrado Seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20(3): 167-181. 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados anatômicos confirmaram que são, de fato, três espécies distintas. Assim, foi possível estabelecer um quadro comparativo de caracteres diagnósticos.

Os resultados obtidos através das análises químicas do óleo essencial forneceram informações importantes sobre a composição e o rendimento e, em conjunto com os caracteres anatômicos, auxiliam na separação das espécies. Ainda, foram identificados compostos amplamente estudados quanto às suas atividades farmacológicas. Os estudos dos óleos essenciais podem servir como um ponto de partida para futuras investigações de fitofármacos provenientes dessas espécies.

O estabelecimento da temperatura para a germinação das sementes das espécies estudadas pode ser útil em estudos futuros sobre o cultivo das mesmas.