

MAIRA CHRISTINA MARQUES FONSECA

Crescimento, composição do óleo essencial, teores
de óleo e de tanino em *Porophyllum ruderale*
(Jacq.) Cassini

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

MAIRA CHRISTINA MARQUES FONSECA

CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL,
TEORES DE ÓLEO E DE TANINO EM *Porophyllum ruderale*
(Jacq.) Cassini

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

MAIRA CHRISTINA MARQUES FONSECA

CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL,
TEORES DE ÓLEO E DE TANINO EM *Porophyllum ruderale*
(Jacq.) Cassini

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 01 de Agosto de 2001.

Prof. Francisco Affonso Ferreira

Prof. Ricardo Henrique S. Santos

Prof. Luiz Cláudio de Almeida
Barbosa
(Conselheiro)

Prof. Glauco Vieira Miranda
(Conselheiro)

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Orientador)

“Em Jesus Cristo conhecemos a Deus como Ele é, e ao homem como deve ser”.

(Aliança Bíblica Universitária)

AGRADECIMENTOS

Te agradeço Deus querido, em primeiro lugar, por teu amor infinito, pelo teu nascimento, morte e ressurreição... Porque através disso podemos novamente nos reconciliar Contigo. Obrigado porque Tu és um Deus pessoal e relacional.

Te agradeço pelo “Sopro da Vida” que vem de Ti, me fazendo existir...

Te agradeço pela oportunidade de pesquisar e poder conhecer um pouquinho mais da Tua criação, estudando sobre as plantas medicinais.

Te agradeço pelas pessoas tão especiais que têm participado, bem de pertinho, desta caminhada:

- Reinaldo, pelo seu amor, amizade, respeito e companheirismo;
- Minha família maior: pai, mãe, irmãos e sobrinhos pelo amor, pelos telefonemas e orações que me faziam senti-los mais perto;
- Pessoal da ABU e da IPV pela força, pelo carinho e por me lembrar sempre de que a vida na universidade vai muito, mas muito mais além do que a obtenção de um título.
- Professor Casali, pessoa que aprendi a gostar, pelo apoio e ensino;
- Aos funcionários sempre tão prestativos: seu Vicente, seu “Quimquim”, Ribeiro, Domingos, Itamar, Rosane e todos da secretaria do DFT.
- Aos amigos: Marco, Nair, Cíntia e outros do Grupo Entre Folhas pelo carinho e disposição em ajudar.

Te agradeço pela boa vontade dos professores Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Glauco Vieira Miranda em me aconselhar.

Te agradeço pelas instituições que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho:

- Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de cursar o mestrado;
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudo.

Te agradeço pela disposição dos professores Evandro Nascimento pela obtenção dos espectros de massas e Jimi Naoki Nakajima pela identificação da espécie.

Como te agradecer, Senhor meu e Deus meu, pelo bem que tens feito a mim? Só sei que o meu coração se enche de alegria e gratidão neste momento!

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

MAIRA CHRISTINA MARQUES FONSECA, filha de Célio Santos Fonseca e Alda Miriam Marques Silva Fonseca, nasceu em Belo Horizonte, MG, no dia 02 de Julho de 1973.

Em Dezembro de 1997, graduou-se Engenheira Agrônoma, pela Universidade Federal de Viçosa.

No período de Março de 1998 a Julho de 1999 aperfeiçoou-se na área de Nutrição Mineral de Plantas na mesma Universidade.

Em Agosto de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia, área de Plantas Medicinais, Aromáticas e Homeopatia, concentrando seus estudos em fitoquímica.

Em Agosto de 2001, submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE	3
<i>Aspectos taxonômicos e morfológicos</i>	3
<i>Composição química e usos</i>	4
CAPÍTULO 1	
CRESCIMENTO E FENOLOGIA DE <i>POROPHYLLUM RUDERALE</i> (JACQ.) CASSINI	8
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4. CONCLUSÕES	16
CAPÍTULO 2	
HORÁRIO DE COLHEITA, RENDIMENTO DE TANINO, ÓLEO ESSENCIAL E	
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO EM <i>POROPHYLLUM RUDERALE</i>	17
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Metabólitos Secundários</i>	17
1.2 TANINO	20
a) <i>Taninos Condensados</i>	20
b) <i>Taninos Hidrolisáveis</i>	21
1.3 EXTRAÇÃO DE TANINO	23
1.4 ÓLEO ESSENCIAL	23
1.5 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL	27
1.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO E VARIABILIDADE DOS ÓLEOS	28
1.7 ANÁLISE QUALITATIVA DO ÓLEO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 <i>Obtenção das plantas para as extrações</i>	32
2.2 <i>Coleta e preparo das amostras</i>	32
2.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	33
2.4 EXTRAÇÃO DE TANINO	33
2.5 ANÁLISE QUALITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL	34
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 <i>Rendimento de óleo essencial</i>	36
3.2 RENDIMENTO DE TANINO (%)	38
3.3 ANÁLISE QUALITATIVA DO ÓLEO	40
4. CONCLUSÕES	49
4.1 <i>Óleo</i>	49
4.2 TANINO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE	59

RESUMO

FONSECA, Maira Christina Marques, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Crescimento, composição do óleo essencial, teores de óleo e de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini.** Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Conselheiros: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Glauco Vieira Miranda.

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa, no período de junho de 2000 a maio de 2001, visando estudar características de crescimento, fenologia e fitoquímica da espécie *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini. O crescimento foi quantificado pela área foliar, matéria fresca e seca da parte aérea, número de nós e altura da planta. Na caracterização fenológica determinou-se o número de folhas, o número de glândulas foliares e o número de botões florais. O acompanhamento fitoquímico, visando o óleo essencial e o tanino, foi feito em duas épocas do ano. No primeiro experimento (junho a outubro de 2000) realizou-se a colheita em três horários (7, 13 e 18 horas) seguida da análise fitoquímica. No segundo experimento (fevereiro a maio de 2001) realizou-se a colheita em cinco épocas, também seguida de análise fitoquímica. As folhas frescas de cada parcela (horários e épocas de colheita) foram submetidas à extração de óleo essencial por meio de destilação a vapor em aparelho Clevenger modificado. O óleo essencial foi analisado em cromatógrafo a gás. No período de pré-floração, o conteúdo de óleo essencial das folhas foi maior do que quando comparado com as outras fases da planta. Nos botões florais, o teor foi maior na fase de floração.

O óleo essencial foi composto de mistura complexa de terpenos, de acordo com os tempos de retenção e as massas moleculares dos compostos analisados. O maior teor de tanino foi observado na colheita realizada às 18 horas (primeiro experimento) e aos 120 dias após o plantio (segundo experimento). Houve aumento contínuo do teor de tanino com o desenvolvimento das plantas.

ABSTRACT

FONSECA, Maira Christina Marques, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Growth, composition of essential oil, yield of oil and tannin in *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini.** Adviser: Vicente Wagner Dias Casali. Committee members: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Glauco Vieira Miranda.

The experiments were conducted in the Federal University of Viçosa, during the period of June 2000 to May 2001, aiming to study the characteristics of growth, phenology and phytochemistry of *Porophyllum ruderale* specie. The growth was quantified by leaf area, fresh and dried matter of aerial part, number of node and height of the plant. During the phenology, characterization of the number of leaves, leaf glands and flowers buds were determined. The phytochemistry accompaniment, aiming the essential oil and tannin, was done in two seasons of the year. The first experiment occurred from July to October 2000 (summer) and the harvest was done in three times (7 am, 1 pm, and 6 pm) followed by phytochemical analysis. The second experiment was done from February to May 2001 (winter) and the harvest occurred in five different ages of the plant, followed by the phytochemical analysis. The fresh leaves of each harvest (done by pre determinate time and by the age of the plant) were submitted to essential oil extraction using water vapor distillation by modified Clevenger equipment. The essential oil was analyzed using gas chromatography. During the pre flowering period, the essential oil content in the leaves was higher than in other periods of the plant's life. In the flower bud, the higher production was in full flowering age. The essential oil was extracted by complex moisture of terpenes, according to the time of retention and molecular mass of the analyzed components. The higher concentration of tannin was observed when the harvest was done at 6 pm. (for the first experiment) and at 120 days after the sowing (for the second experiment). The concentration of tannin was continuous with the development of the plant.

“O Senhor produziu da terra os medicamentos. O homem sensato não os desprezará”.

(Eclesiastes)

“Uma erva daninha é qualquer planta cujas virtudes ainda não foram descobertas...”

(Guia devocional No Cenáculo)

INTRODUÇÃO

Acredita-se que a utilização de plantas medicinais seja prática tão antiga quanto a existência do próprio homem (MARTINS et al., 1996).

As propriedades curativas das plantas constituíram durante séculos a base terapêutica. Em *papyrus* datando de 2000 anos A.C., são relatados os usos de plantas medicinais no Egito. No início da Era Cristã, jardins de plantas condimentares e medicinais foram estabelecidos em várias partes da Europa (BALBAA, 1983).

As plantas sintetizam compostos químicos a partir de nutrientes, água e luz. Muitos destes compostos ou grupos deles podem provocar reações nos organismos; são os chamados princípios biologicamente ativos, podendo ser tóxicos ou não, dependendo da dosagem em que tais compostos venham a ser utilizados. Assim, na fitoterapia e na indústria farmacêutica, planta medicinal pode ser definida como aquela que contém um ou mais princípios ativos, conferindo-lhe(s) atividade terapêutica (MARTINS et al., 1996).

Diante da possibilidade de descoberta de novos compostos com atividade terapêutica ou da busca de formulações mais simples, com menor custo e, portanto, mais acessíveis à maioria da população, a Organização Mundial da Saúde (O.M.S.), em 1978, recomendou a seus países membros que desenvolvessem pesquisa visando o estudo da flora medicinal. Atendendo a esse apelo, o Ministério da Saúde, no Brasil, baixou a Portaria número 212 (11/09/81), sobre “Diretrizes e Prioridades em Saúde”, em que se incluiu o estudo multidisciplinar de plantas medicinais (MING, 1994). Em 1988, a Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN) resolveu implantar a fitoterapia nos serviços de saúde pública como prática oficial da medicina (SCHEFFER, 1996).

ALMASSY JÚNIOR (2000) citou que existem, atualmente, mais de 2000 programas governamentais de adoção da fitoterapia no atendimento aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Dessa maneira, os processos referentes à cadeia produtiva tornam-se de extrema importância, pois influenciam diretamente a qualidade e a quantidade de princípios ativos do produto a ser comercializado.

Muitas plantas possuem compostos economicamente importantes, como óleos, resinas, taninos, borracha natural, gomas, ceras e tinturas (BALANDRIN et al., 1985). Estima-se que a produção brasileira de óleos essenciais corresponda a 13,15% da

produção mundial em toneladas, sendo responsável pela receita de 45 milhões de dólares anuais (VERLET, 1993).

As potencialidades do uso das plantas medicinais podem ser avaliadas com base no exemplo da China. Este país mantém 400.000 hectares cultivados com plantas medicinais, permitindo a existência de 800 indústrias farmacêuticas nacionais. Elas empregam 80.000 trabalhadores, produzindo cerca de 2.000 variedades de medicamentos. Essa cifra se eleva a 220.000 pessoas quando se considera o envolvimento com plantio, processamento e distribuição de ervas medicinais (ELYSABETSKY, 1986).

Estima-se que das 250.000 espécies de plantas existentes no planeta, 35.000 a 70.000 têm sido utilizadas com propósito medicinal por alguma cultura. O número de espécies nativas do Brasil é de aproximadamente 120.000, sendo recente o desenvolvimento da fitoquímica moderna brasileira.

Porophyllum ruderale é uma espécie nativa distribuída em todas as regiões do Brasil. Tem sido largamente utilizada na medicina popular, no entanto, poucas espécies deste gênero têm sido estudadas quimicamente.

O presente trabalho visou obter informações sobre *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini, planta brasileira pouco estudada, em relação ao seu crescimento e à produção de dois dos princípios ativos: taninos e terpenos (óleo essencial).

REVISÃO DE LITERATURA

Características gerais da espécie

Aspectos taxonômicos e morfológicos

A espécie *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini, planta ruderal e aromática, pertence à família Asteraceae.

Dentre os nomes comuns encontram-se várias sinonímias, quais sejam: couve-cravinho, erva-fresca, erva-de-veado, amica-brasileira, amica-do-campo, arruda-de-galinha, cravo-de-urubu e picão-branco.

Considera-se seu lugar de origem a América do Sul, sendo amplamente distribuída por todas as regiões do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Pará, Mato Grosso, Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Sul).

Quanto às características botânicas (Figura 1), é anual, herbácea, ereta, com 1,0 a 1,3 m de altura. Caule em geral simples, glabro, esverdeado e levemente reluzente. Folhas alternas, membranáceas, pecioladas, glabras, oblongo-lanceoladas, de ápice obtuso, base levemente atenuada e bordos nitidamente crenados, na face superior verde clara e na inferior mais pálida. Inflorescência axilar e terminal formada por capítulos pedunculados, isolados ou em corimbos. Invólucro unisseriado, com brácteas membranáceas, esverdeadas, glabras e com pontuações glandulosas mais escuras. Flores hermafroditas de corola tubulosa, glabra e branco-esverdeada ou levemente amarelada. Reprodução por sementes, com ciclo de 100 a 120 dias. Floresce abundantemente nos meses de maio a setembro.

Plântula com hipocótilo cilíndrico, glabro e pigmentado de antocianina junto ao colo. Folhas cotiledonares carnosas, glabras, lanceoladas, de ápice ligeiramente agudo e base atenuada, na face superior verde-claras e na inferior mais pálidas. Epicótilo curto e verde-brancacento. Folhas definitivas opostas, membranáceas, glabras, lanceoladas, de ápice agudo e base atenuada, na face superior verdes, na inferior mais pálidas e de bordas levemente crenadas na base e íntegros no ápice.

É considerada invasora e sua ocorrência é bem mais comum em terrenos baldios do que em áreas cultivadas.

Composição química e usos

Na medicina popular, *Porophyllum ruderale* é utilizada como cicatrizante e antiinflamatória (SILVA et al., 1996), antifúngica (DEVINCENZI et al., 1996), antibacteriana, calmante, combate a hipertensão arterial (chá), tratamento de leishmaniose, tratamento de edemas e traumatismos (infusão), tratamento de picada de cobra e de doenças reumáticas (infusão), assim como de inflamações do aparelho genital (infusão), dores em geral, machucadura interna causada por batidas (MARQUESINI, 1996).

As espécies do gênero *Porophyllum* são largamente utilizadas na medicina popular na América do Sul e Central. No entanto, poucas espécies têm sido estudadas quimicamente (HERZ et al., 1979; LOCOCK et al., 1966; WAGNER et al., 1972). O chá feito do caule de *Porophyllum gracile* (Benth) é usado como remédio para tratar resfriado e também auxilia em partos difíceis, fazendo com que a criança nasça mais rápido (MOSER, 1970). O chá das raízes da mesma planta é usado para curar dor de dente e diarreia. Já *Porophyllum lanceolatum* é popularmente usada como remédio eficiente contra hipertensão (infusão das folhas). O princípio ativo assemelha-se a acetilcolina em relação à sua estabilidade e solubilidade, porém, evidências químicas são necessárias na identificação conclusiva de acetilcolina nas folhas desta espécie (HORTON & FELIPPE, 1973).

No levantamento de atividade fototóxica em raízes de espécies de *Porophyllum*, notou-se forte ação contra leveduras patogênicas e *Candida albicans*. Além disso, contém α -tertienil e 5-(3-buten-1-il)-2,2-bitienil (derivados do enxofre) que são letais a bactérias, leveduras e fungos (TOWERS et al., 1977), além de nematóides (GOMMERS & GEERLIGS, 1973) em luz ultravioleta.

Durante o dia a visita de insetos e predadores é mais intensa. Como mecanismo de defesa, algumas plantas, através da energia solar, têm alguns metabólitos secundários ativados, os quais se tornam tóxicos a estes “visitantes”. A fototoxicidade é um mecanismo de defesa desenvolvido por certas plantas para protegê-las da ação de microrganismos e predadores. Este mecanismo é acionado quando alguns metabólitos secundários são excitados por altos níveis de energia solar ou artificial (MECKES-LOZOYA & GASPAR, 1993).

Cinco espécies de *Porophyllum* foram fitoquimicamente analisadas:

- *Porophyllum lanceolatum* (BOHLMANN & ZDERO, 1979);
- *Porophyllum riedelii* (BOHLMANN et al., 1983);
- *Porophyllum scoparia* (BOHLMANN et al., 1985);
- *Porophyllum ellipticum* (BERNARDINI & POZETTI, 1976; 1978);
- *Porophyllum ruderale* (BOHLMANN et al., 1980).

Na parte aérea de *Porophyllum ruderale*, estudada no nordeste do Brasil, foram encontrados compostos tiofênicos com cadeias insaturadas e derivados do timol. A composição química do óleo das folhas de *Porophyllum ruderale* constituiu-se de limoneno (74,6%) e dodecadienal (21,8%). As plantas foram colhidas em maio de 1992 (inverno) no estágio de floração no Ceará (NETO et al., 1994).

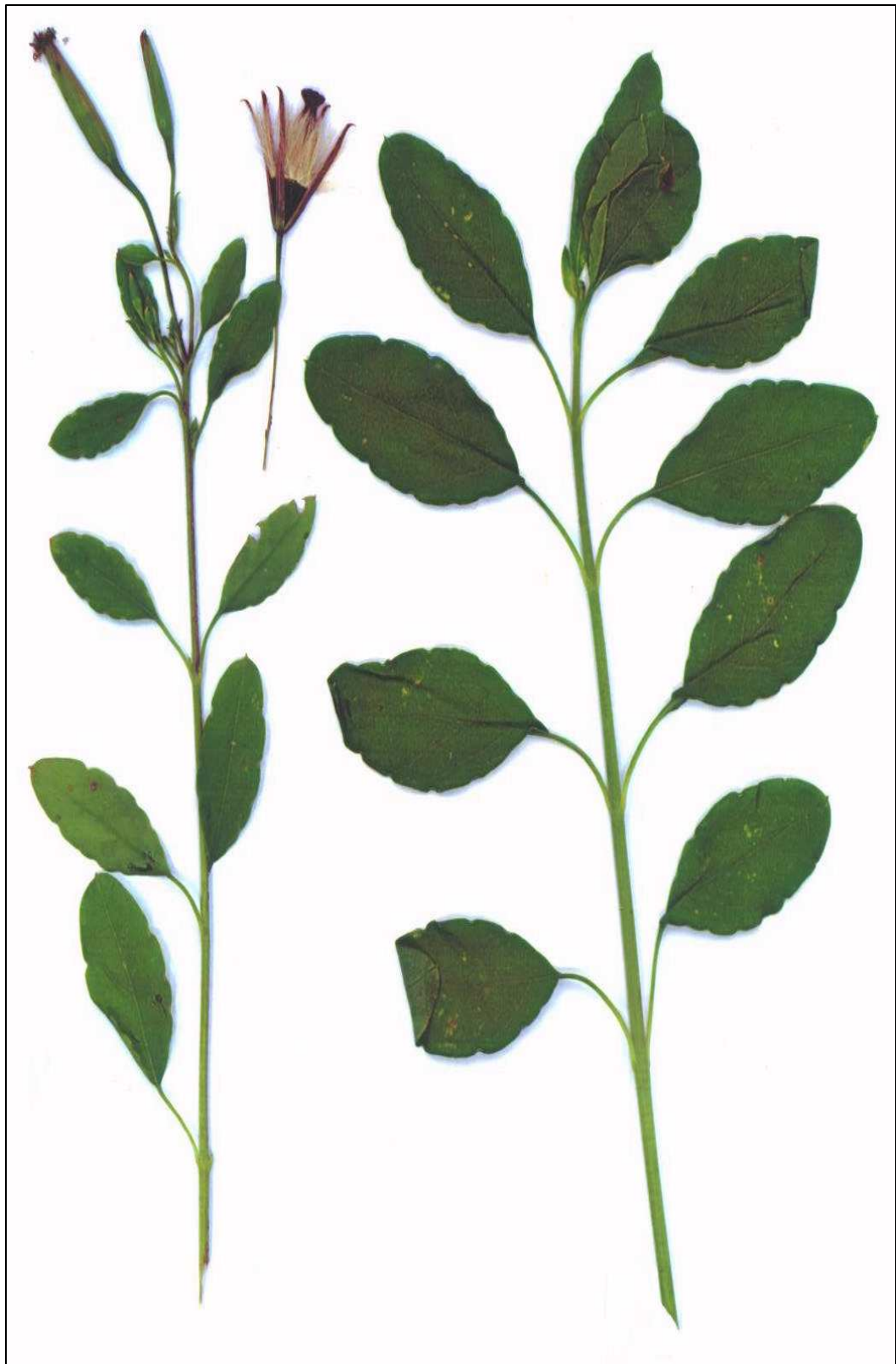


Figura 1 - Ilustração da parte aérea de *Porophyllum ruderale*

O gênero *Porophyllum* (Asteraceae) é caracterizado pela presença de cavidades secretoras glandulares translúcidas, as quais se localizam longitudinalmente à margem da folha, e prolongando-se ao interior, dispersadas em toda a parte da lâmina (MUNZ & KECK, 1973).

Em estudo prévio foi relatado que tais cavidades glandulares conferem resistência contra a herbivoria por insetos em *Porophyllum gracile* (Jacq.) Cassini var. *macrocephalum* (D.C.) e *Porophyllum ruderale* Benth (Asteraceae) (GUILLET et al., 1997). O mesmo estudo confirmou, em condições de laboratório, que os compostos voláteis emitidos das glândulas foliares das duas espécies exercem atividade repelente contra adultos de *Melanoplus femurrubrum femurrubrum* (Orthoptera: Acrididae). Provavelmente, os monoterpenos que constituem a maior parte dos químicos emitidos pelas glândulas secretoras de *Porophyllum ruderale* são responsáveis pela atividade repelente (GUILLET et al., 1997).

Diferentes monoterpenos, sesquiterpenos e tiofenos fototóxicos têm sido identificados no gênero *Porophyllum* (LOZOYA & GASPAR, 1993; DOWNUM et al., 1985; BOHLMANN et al., 1980; BOHLMANN & ZDERO, 1979; BOLHMANN et al., 1983; CHAN et al., 1979; DOWNUM & TOWERS, 1983). No trabalho realizado por GUILLET et al. (1998), sabineno, mirceno e limoneno constituíram 91,8% do óleo essencial das folhas de *Porophyllum ruderale*.

CAPÍTULO 1

Crescimento e fenologia de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini

1. INTRODUÇÃO

Nas plantas, o crescimento consiste no aumento da matéria seca pela conversão de substâncias inorgânicas simples (água, CO₂ e elementos minerais) em substâncias orgânicas.

Segundo BENINCASA (1988), o crescimento da planta resulta de interação de mecanismos físicos e bioquímicos complexos; e, para avaliá-lo o meio mais utilizado tem sido a análise de crescimento. A utilização dos parâmetros de crescimento vegetal, como análise, é considerada o método básico para se obter a estimativa da produtividade primária dos vegetais.

Sabe-se que o *habitat* natural determina características normais relativas ao desenvolvimento e produção final da planta, e que quando levada para outro ambiente, essas características podem ser modificadas. Outro ponto interessante é a determinação de variações rítmicas estacionais nas fases da planta (PICOLO, 1980), pois fornecem dados importantes no cultivo de espécies pouco utilizadas.

Elementos do clima, como radiação solar, vento, precipitação pluvial e temperatura têm influência decisiva sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (Linacre, citado por SOUZA, 1989).

A fenologia é a parte da botânica que estuda vários fenômenos periódicos como a brotação e a floração, determinando os momentos em que os organismos diferenciam seus tecidos visando expressar as modificações fisiológicas que ocorrem sob influência de múltiplos fatores. Dentre os principais deles, encontram-se os climáticos (LEDESMA, 1952).

Como a espécie a ser estudada é ruderal, o primeiro passo para cultivá-la seria a análise de crescimento. No entanto, não foi encontrado nenhum dado na literatura relacionado a este assunto nesta planta. O presente trabalho visou obter informações quanto ao crescimento e a fenologia de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini, assim como observar o seu comportamento em Viçosa – Minas Gerais.

Como planta medicinal, a importância da análise de crescimento numa determinada espécie também está correlacionada à concentração de princípios ativos, como o óleo essencial, os quais podem variar durante o desenvolvimento da planta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A espécie *Porophyllum ruderale* foi taxonomicamente classificada e incorporada ao acervo do herbário VIC (Herbário de Viçosa) com o número de registro 25169.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no período de fevereiro a maio de 2001.

As sementes utilizadas foram obtidas de uma única planta, coletada na Universidade Federal de Viçosa. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor, no dia 23 de fevereiro. Realizou-se o transplante das mudas em vasos de 8 litros, contendo 30% de húmus, quando elas tinham aproximadamente 30 dias.

A irrigação foi feita manualmente, por meio de mangueira, até o umedecimento do solo.

As plantas foram coletadas em intervalos regulares de 15 dias, a partir de 30 dias após o transplante, até completar o ciclo da cultura. Após cada colheita, elas foram acondicionadas em sacos de papel e imediatamente transportadas ao laboratório, a fim de determinar o peso de matéria fresca. A pesagem foi realizada em balança semi-analítica.

Na obtenção do peso de matéria seca total (g), as folhas foram separadas manualmente dos caules, sendo essas partes levadas à sala com desumidificador, até peso constante e pesadas em balança semi-analítica.

Foram coletadas, aleatoriamente, duas plantas e tomaram-se os dados de três folhas representativas do ápice, meio e base de cada planta, totalizando nove folhas por planta. A área foliar (AF) foi obtida com equipamento de medição “Areometer”, e as medidas de comprimento (C) e largura (L) de cada folha amostrada, utilizando régua graduada.

A partir destes dados obteve-se o fator de correção (F), sendo igual a:

$$F = \frac{AF}{C \times L}$$

Este fator fixo de correção (F) foi multiplicado ao comprimento (C) e à largura (L) da quarta folha do quarto nó, de baixo para cima ($C \times L \times F = AF$) de cada planta. Assim, a área foliar total de uma planta foi determinada pelo produto da área foliar de cada amostra pelo número de folhas (ROBINS & PHAR, 1987).

A determinação dos índices fisiológicos de crescimento foi efetuada conforme recomendação de BENINCASA (1988).

A altura da planta foi medida com trena, em cm, da superfície do solo até a parte mais alta da planta.

Na determinação do número de folhas realizou-se a contagem de todas as folhas desenvolvidas com mais de 0,5cm de largura.

O número de nós de cada planta foi contado verticalmente, no ramo principal, iniciando-se na base do ramo até o ápice da planta, onde as folhas se encontravam desenvolvidas.

Foi realizada a contagem de todos os botões desenvolvidos, com mais de 1cm de comprimento.

Os dados foram interpretados por análises de variância e regressão. A análise estatística foi feita no programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas).

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso. O experimento consistiu em cinco tratamentos (5 épocas de colheita) e três repetições, perfazendo 30 plantas (duas plantas por parcela).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resumos das análises de variância dos valores de matéria fresca e seca total da parte aérea de *Porophyllum ruderale* encontram-se na tabela 1 e os resultados das características de crescimento constam da tabela 2.

O resumo das análises dos dados de área foliar (AF), altura (ALT), número de folhas (NF), número de nós (NN) e número de botões florais (NBF) encontra-se na tabela 3.

Foram obtidos os seguintes resultados:

A matéria fresca (g) aumentou progressivamente em função do tempo, sendo que a fase de maior crescimento, ou seja, o aumento da matéria fresca concentrou-se entre 75 e 105 dias após o plantio (Figura 2). De maneira geral, os modelos de crescimento seguiram tendência sigmoideal, em que ocorrem três fases distintas: uma inicial, quando o crescimento é lento; outra intermediária, durante o desenvolvimento dos ramos, em que o crescimento é acelerado; e a final, quando a planta atinge a dimensão máxima, floresce e a taxa de crescimento é reduzida (MAGALHÃES, 1985).

De acordo com o modelo de regressão ajustado à variável matéria seca total (g), os dados constam do gráfico (Figura 3), a partir de 60 dias após o plantio. Houve menor acúmulo de matéria seca no período inicial de crescimento (60 dias após o plantio), podendo-se observar acréscimos significativos a partir de 75 dias após o plantio, até o final do ciclo da planta.

Houve aumento progressivo da área foliar (AF) em função do tempo, até as plantas entrarem no processo de senescência e queda das folhas mais velhas (Figura 4). A determinação da área foliar é fundamental na estimativa do crescimento vegetal, considerando-se que as folhas são as principais responsáveis pela captação de energia solar e pela produção de matéria orgânica, por meio da fotossíntese (BENINCASA, 1988).

Tabela 1 – Resumo das análises de variância dos valores de matéria fresca total, matéria seca total da parte aérea e área foliar de *Porophyllum ruderale*. Viçosa (MG), no período de Fevereiro a Maio de 2001.

FV	Quadrado médio			
	GL	MF	MS	AF
Blocos	2	3,765	0,246	2,365
Época	4	74,368**	20,767**	30,137**
Resíduo	8	5,646	0,426	58,851
CV (%)		8,87	12,443	16,317

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 2 – Valores médios de matéria fresca total (MFT) e matéria seca total (MST), da parte aérea e área foliar (AF) de *Porophyllum ruderale*. Viçosa (MG), no período de Fevereiro a Maio de 2001.

Dias após o plantio	Matéria Fresca (g/planta)	Matéria Seca (g/planta)	Área Foliar (dm ² /planta)
60	16,0	1,6	9,0
75	75,2	10,9	45,2
90	101,6	24,3	58,5
105	140,5	34,3	75,0
120	134,5	32,8	47,2

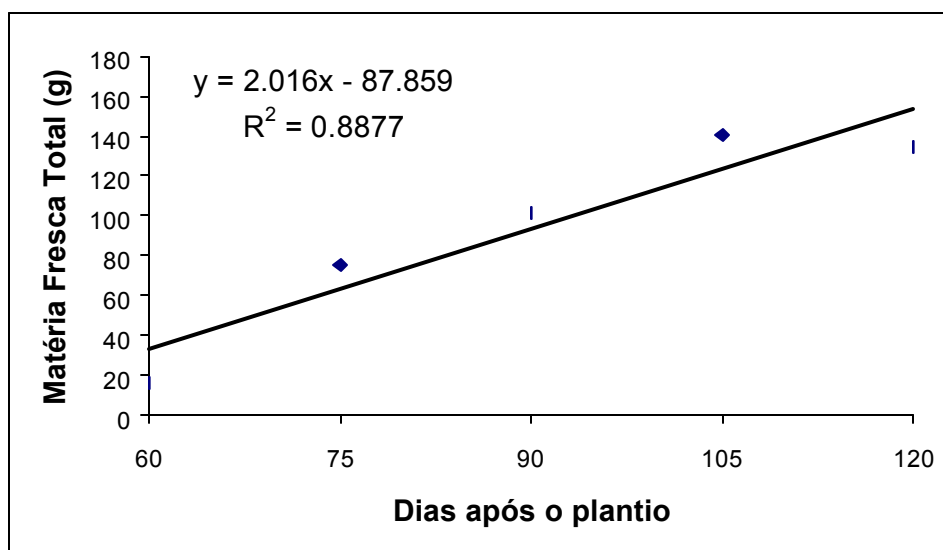


Figura 2 – Estimativa da matéria fresca total de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*), em função do tempo. Viçosa, 2001.

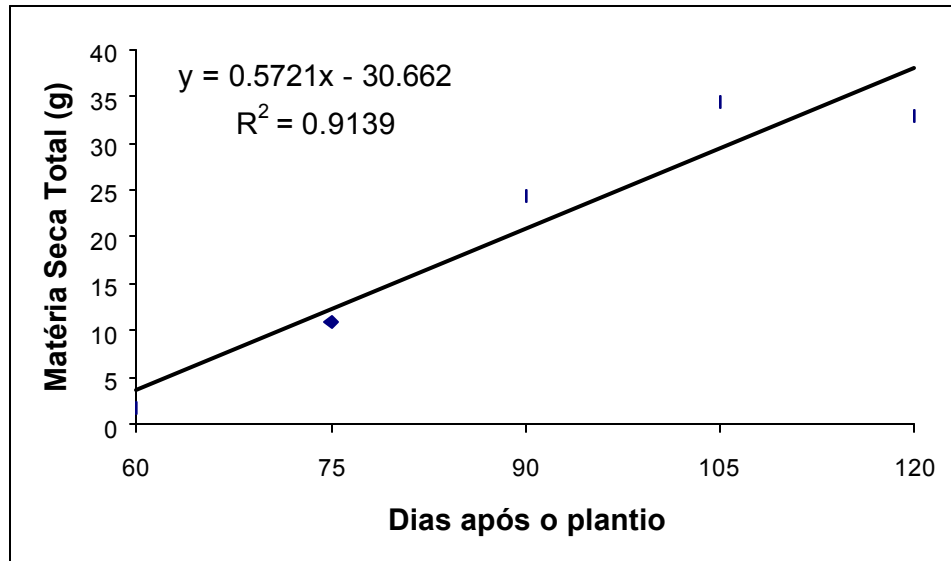


Figura 3 – Estimativa da matéria seca total de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*), em função do tempo. Viçosa, 2001.

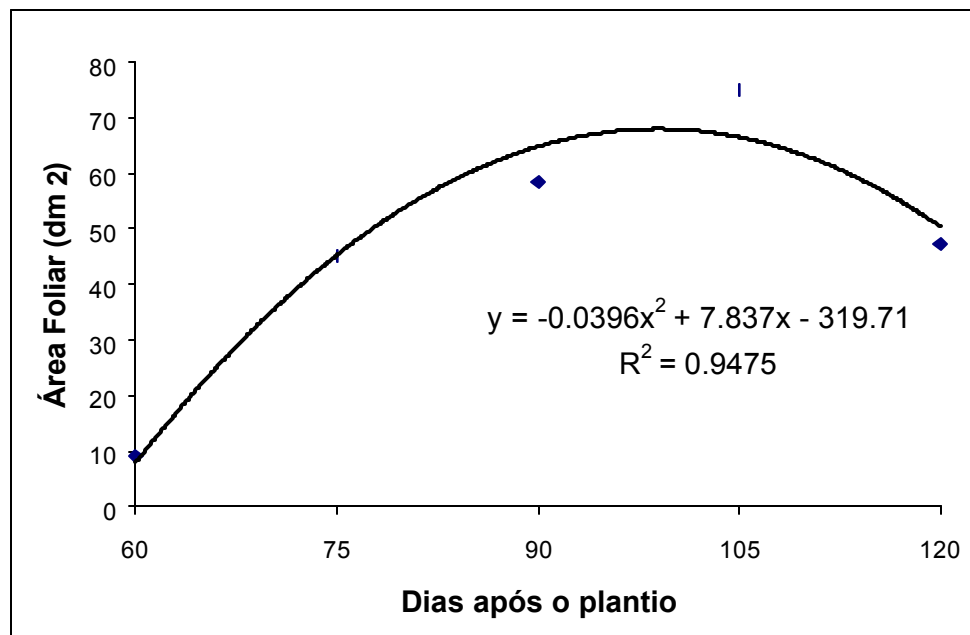


Figura 4 - Estimativa da área foliar de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*), em função do tempo. Viçosa, 2001.

Com relação à altura da planta, pode-se observar que, no início do desenvolvimento, o crescimento foi lento, ficando mais acentuado no período entre 60 e 75 dias após o plantio (Figura 5). A altura aumentou progressivamente em função do

tempo até que a planta entrasse no processo de florescimento. O comportamento da altura e do número de nós foi semelhante. Em trabalho realizado com *Ocimum*, ECHEVERRY et al. (1990), verificou-se que o crescimento em altura das plantas estava relacionado com o número de nós, o que poderia justificar tal semelhança.

O número de folhas teve aumento crescente até os 105 dias de idade (período de floração), decrescendo a partir daí devido ao processo de senescência e queda das folhas (Figura 6).

A curva de regressão ajustada aos dados de número de nós do ramo principal, nas cinco épocas de colheita, está ilustrada na figura 7. O número de nós aumentou em função do tempo, atingindo cerca de 13 nós por planta aos 120 dias. As curvas de regressão ajustadas para altura e número de nós apresentaram tendências semelhantes, segundo Lucas e Milbourn, citados por THOMÉ (1985); o aumento da estatura das plantas em maiores densidades decorre do aumento do comprimento dos entrenós, e também está relacionado com o número de nós (ECHEVERRY, 1990), o que justifica tal semelhança.

Os botões florais foram detectados a partir de 75 dias, aumentando progressivamente até o final do ciclo da planta. À medida que o número de botões florais aumentava, o crescimento da planta em altura se tornava mais lento. Isto ocorre provavelmente devido à drenagem de fotoassimilados pelos botões florais. LARCHER (1986) relatou que quando a planta atinge a maturidade necessária para florescer, os surtos de crescimento do corpo vegetativo combinam-se com o ciclo reprodutivo, e, ora se processam simultaneamente, ora, alternadamente, de acordo com a espécie vegetal.

Tabela 3 – Valores médios de altura, número de folhas, número de nós e número de botões florais de *Porophyllum ruderale*. Viçosa (MG), no período de 23 de Março a 22 de Maio de 2001.

Dias após o plantio	Caracteres Fenológicos			
	Altura (cm)	Número de folhas	Número de nós	Número de botões florais
60	39,9	61,5	9,0	0,0
75	85,4	213,6	12,6	10,6
90	104,6	256,8	12,0	136,3
105	110,0	352,8	12,8	358,1
120	104,9	313,6	13,0	368,0

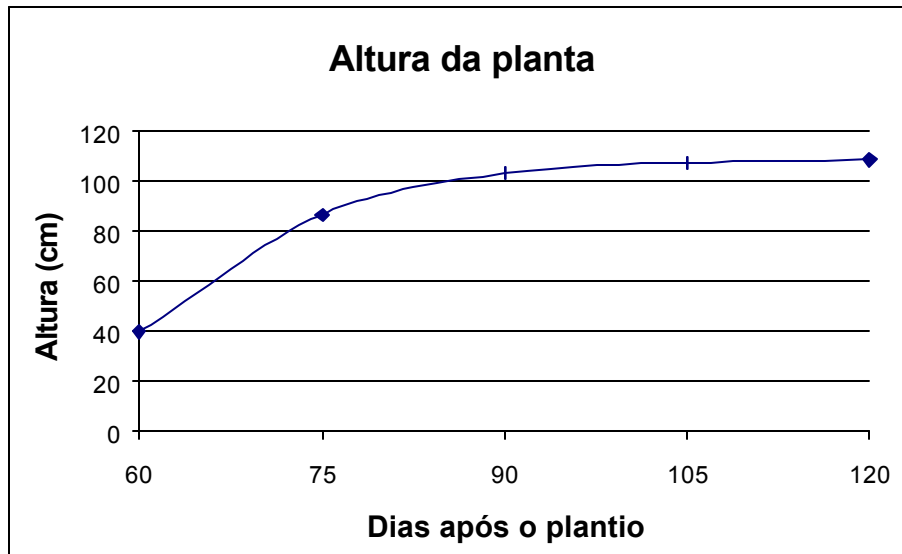


Figura 5 – Estimativa do crescimento em altura de *Porophyllum ruderale*, em função do tempo. Viçosa, 2001.

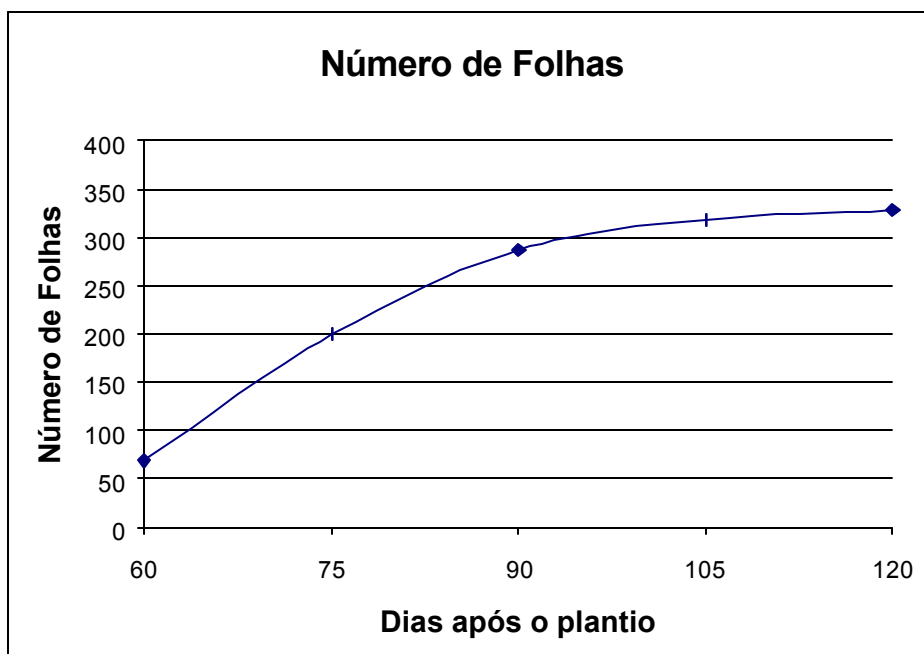


Figura 6 – Estimativa do número de folhas de *Porophyllum ruderale*, em função do tempo. Viçosa, 2001.

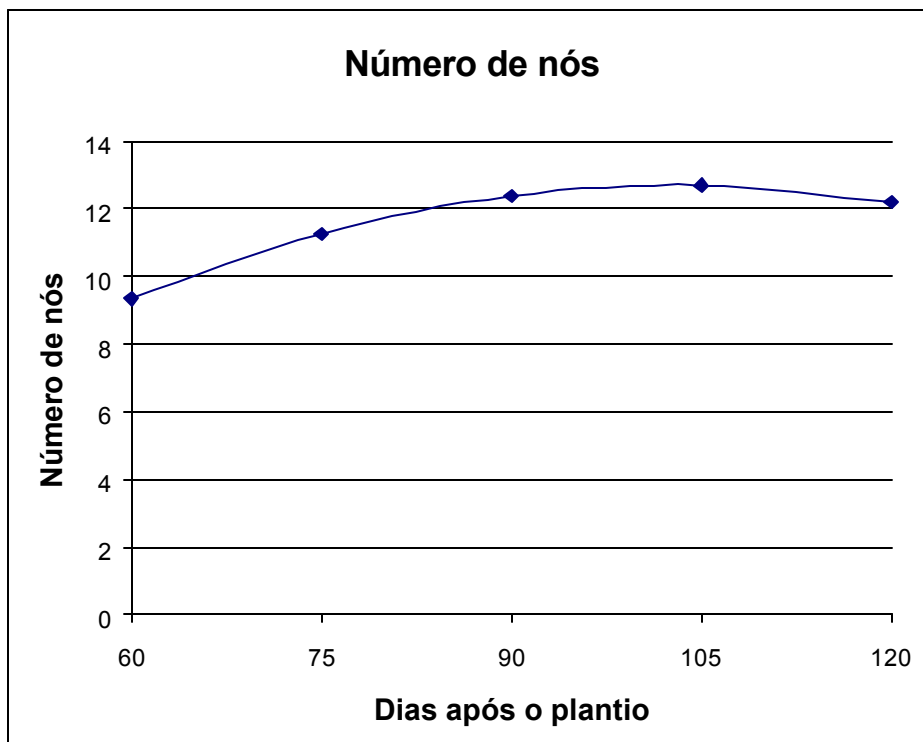


Figura 7 – Estimativa do número de nós em função do tempo. Viçosa, 2001.

4. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi conduzido o experimento:

- As maiores taxas de crescimento ocorreram no período de 60 a 75 dias após a emergência;
- O florescimento da couve-cravinho teve início aos 90 dias após o plantio;
- A partir do início do florescimento, o crescimento da planta em altura, número de folhas e número de nós se tornou mais lento;
- A área foliar decresceu continuamente a partir do início do período de floração, devido ao processo de senescência e queda das folhas mais velhas.

CAPÍTULO 2

Horário de colheita, rendimento de tanino, óleo essencial e composição química do óleo em *Porophyllum ruderale*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabólitos Secundários

Os compostos químicos no organismo vivo são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, mediadas por enzimas; esse complexo sistema de reações químicas constitui o metabolismo dos organismos. Todos os organismos possuem caminhos metabólicos semelhantes de produção de compostos essenciais à sobrevivência, como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados (polissacarídeos, proteínas, lipídios, RNA, DNA, etc). Este caminho é o primário, sendo esses compostos os metabólitos primários (ANDRADE & CASALI, 1999; TAIZ & ZAIGER, 1998).

Alguns vegetais, microrganismos e, em menor escala animais, possuem o arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias. Esse conjunto metabólico tem sido definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens na sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema (SANTOS, 1999).

Os metabólitos secundários são expressão da individualidade química dos indivíduos e diferem, qualitativa e quantitativamente, entre espécies, sendo produzidos em pequenas quantidades (MARTINS et al., 1996). Podem ser divididos em três grupos principais: terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 1998).

É importante ressaltar que a maioria dos compostos químicos utilizados na defesa das plantas são terpenóides e compostos fenólicos (tanino) (MEYER & KARASOV, 1991).

Os terpenóides são sintetizados a partir do acetil CoA, via rota do ácido mevalônico. Os compostos fenólicos são substâncias aromáticas formadas via rota do ácido chiquímico. Os compostos nitrogenados, como alcalóides, são sintetizados a partir dos aminoácidos (SANTOS, 1999) (Figura 1).

O metabolismo do acetil CoA gera o diversificado grupo de metabólitos secundários, os isoprenóides ou terpenóides (MANN, 1987), que representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos, na qual se encontram os óleos essenciais. Os principais terpenóides encontrados nos óleos essenciais podem ser divididos em monoterpenos e sesquiterpenos (LOPES, 1997).

As plantas terrestres se adaptaram ao meio e se relacionaram com os herbívoros por meio de metabólitos secundários, que podem tanto atrair como repelir insetos (MANN, 1987). Muitos desses metabólitos são responsáveis por qualidades atribuídas aos vegetais, principalmente atributos medicinais, o que vem sendo referendado em pesquisas, tornando cada vez maior o interesse em se entender e controlar esses processos de síntese de metabólitos secundários, tanto por parte da comunidade científica quanto por parte da indústria (SILVA & CASALI, 2000; ANDRADE E CASALI, 1999).

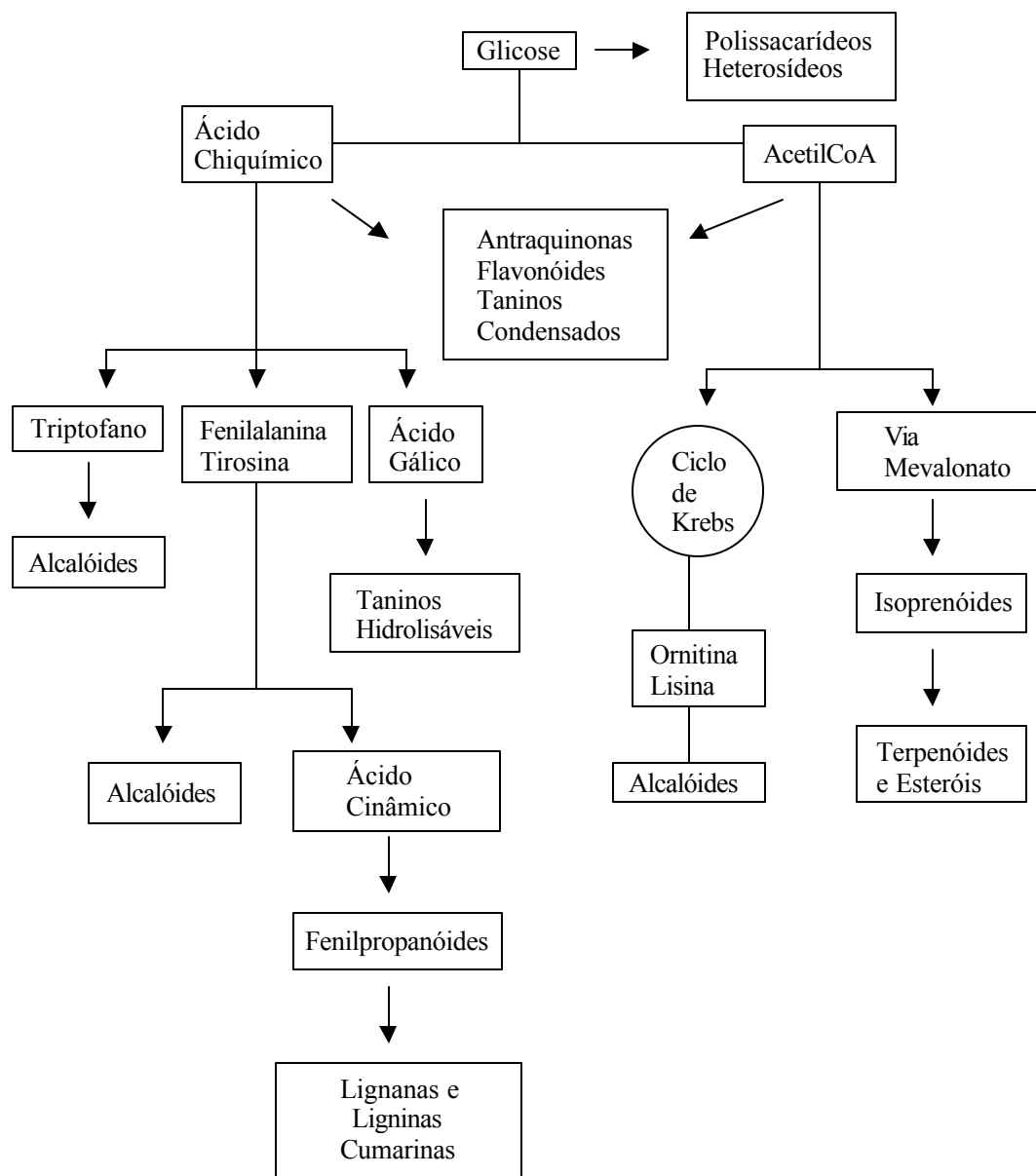


Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. Adaptado de SANTOS (1999).

1.2 Tanino

Os taninos fazem parte de uma classe de compostos denominados fenólicos. A expressão “compostos fenólicos” abrange numeroso grupo de compostos que possuem um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxílicos junto a vários outros substituintes, com distribuição ampla no reino vegetal (OLIVEIRA, 1988).

Praticamente, todos os compostos fenólicos são formados a partir do ácido chiquímico, cuja síntese ocorre com intermediação da fenilalanina, da fenilalanina amônia liase (PAL) e do ácido cinâmico (HARBORNE, 1989; KAY, 1991).

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água, com possibilidade de formar complexos insolúveis em água, com alcalóides, gelatinas e outras proteínas (SIMÕES et al., 1999). São considerados os compostos secundários mais importantes envolvidos na defesa das plantas contra insetos e doenças (SWAIN, 1979). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base das suas propriedades como fator de controle de insetos, fungos e bactérias, assim como dos seus principais usos industriais, como na manufatura do couro.

Nas plantas, os taninos são efetivos como repelente de predadores por tornarem os tecidos menos palatáveis, devido à precipitação das proteínas salivares ou a imobilização de enzimas, impedindo a invasão dos tecidos do hospedeiro pelo parasita (BATE-SMITH, 1973).

Nas células vegetais os taninos estão localizados separadamente das proteínas e enzimas do citoplasma, dissolvidos dentro de vacúolos. Quando herbívoros se alimentam, os tecidos são danificados e os taninos reagem com as proteínas, tornando-os menos acessíveis ao suco digestivo dos animais. A sua localização foi possível por meio do uso de corantes vitais (não destroem as células), como o azul de metileno (COSTA, 1975; HARBORNE, 1984).

Os taninos são classificados, segundo sua estrutura química, em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os dois tipos de taninos se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes.

a) Taninos Condensados

Os taninos condensados são, principalmente, produtos polimerizados de flavan-3-ol (catequina) e flavan-3,4-diol (leucoantocianidina) ou da mistura desses dois (CHUNG et al., 1998). Em geral, estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas e ausentes em plantas herbáceas (POZO, 1997; CHUNG et al., 1998).

b) Taninos Hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são misturas de compostos simples como ácido gálico, pirogalol ou ácido elágico na forma de éteres de açúcares, principalmente glicose (CHUNG et al., 1998; ZUCKER, 1983). Ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, porém dentro de limites taxonômicos bem definidos (SIMÕES et al., 2000).

Os taninos hidrolisáveis são divididos em dois tipos: os galotaninos e os elagitaninos. Ambos os tipos possuem carboidratos, tipicamente glicose; porém, com ácido gálico, são definidos freqüentemente como galotaninos e, quando contêm, além de ácido gálico, um ácido elágico, são chamados elagitaninos (ZUCKER, 1983).

Um dos mais importantes exemplos de galotaninos é o ácido tânico (Chinese tannin), que contém uma glicose esterificada e oito moléculas de ácido gálico (D'MELLO et al., 1991).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Nas últimas décadas, vários grupos têm investigado as atividades farmacológica e biológica dos taninos. Testes “in vitro”, realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros, têm identificado atividades biológicas dessa classe de substâncias.

Dentre essas atividades podem-se citar:

- ação bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991);
- antiviral (OKUDA et al., 1993);
- moluscida (MARSTON & HOSTEFFMANN, 1985);
- inibição de enzimas como glucosil transferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993);
- ação antitumoral (OKUDA et al., 1989).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são referentes, pelo menos em parte, a três características gerais comuns (em maior ou menor grau) presentes nos dois grupos de taninos (condensados e hidrolisáveis). Foi sugerido que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estão intimamente ligados a essas três propriedades (HASLAM, 1996):

- complexação com íons metálicos (Fe, Mn, Vn, Cu, Al, Ca, entre outros);
- atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres;

- habilidade de complexar outras moléculas, incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (SIMÕES et al., 1999).

O modo de ação destes compostos envolve, então, a precipitação das proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos descobertos, formando revestimentos protetores. A sensação de secura que deixam na boca advém das proteínas do epitélio bucal e das glicoproteínas da saliva, que conferem propriedades lubrificantes; portanto, a sua ação se deve à reação dos grupos fenólicos com grupos amino das proteínas. Esta reação explica as suas propriedades hemostáticas, como antídoto no caso de intoxicação com alcalóides (ZHU et al., 1997), e as incompatibilidades que se observam na preparação de medicamentos que contenham alcalóides e substâncias protéicas (COSTA, 1975).

Os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações por meio da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. Debaixo dessa camada, o processo natural de cura pode, então, ocorrer. Processo similar ocorre, provavelmente, em casos de úlcera gástrica, em que uma camada tanino-proteína complexados protege a mucosa do estômago (HASLAM, 1989).

Outros estudos mostraram que os taninos têm efeitos inibitórios sobre bactérias e fungos (WAAGE et al., 1984; MARWAN & NAGEL, 1986; SCALBERT, 1991).

Existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana:

- pressuposição de que os taninos inibem as enzimas de bactérias e fungos e/ou complexam-se com os substratos destas enzimas;
- ação sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo;
- complexação de taninos com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo dos microrganismos (SIMÕES et al., 1999).

A produção de metabólitos secundários varia de acordo com a idade das plantas, o estágio reprodutivo, as rotas metabólicas determinadas pelo efeito de hormônios e ciclo de síntese de substâncias influenciadas pelas estações ou horas do dia (BROWN JÚNIOR, 1988). Em relação à produção de taninos, biossintetizados pela rota do acetato ou do chiquimato, há variação de suas concentrações conforme os órgãos (folhas, cascas, raízes e lenhos), a idade ou a fase do ciclo da planta (COSTA, 1975).

Testes aplicados sobre substâncias contidas no lume das glândulas de *Porophyllum lanceolatum* mostraram resultado negativo nas proteínas e positivo nos lipídios,

polissacarídeos e taninos. Os taninos mostraram declínio, porém sem desaparecerem, pois foram observados inclusive em células das glândulas senescentes sob a forma de depósitos granulosos (MONTEIRO, W.R., 1986).

1.3 Extração de tanino

Quanto à extração de taninos, em geral, é inconveniente a análise de tecidos frescos, tomando-se indispensável a realização da operação de secagem.

Outro ponto importante é a escolha do solvente. A presença de água em solventes orgânicos (metanol, acetona, etc) pode aumentar o rendimento da extração de compostos fenólicos. A acetona bloqueia a associação tanino-proteína, o que não ocorre com o metanol (HAGERMAN, 1988). Porém, a estabilidade dos taninos em meio acetona: água é inferior ao meio metanol : água.

Após o isolamento e purificação, pode-se obter taninos hidrolisáveis (os quais podem ser mantidos à temperatura ambiente) e taninos condensados (que devem ser mantidos em baixa temperatura e sem exposição à luz).

Geralmente, empregam-se ensaios na quantificação de fenóis totais, tais como métodos de Folin-Denis (SEIGLER et al., 1986), Folin-Ciocalteu (GLYPHIS & PUTTICK, 1988) e Price Butler (PRIE & BUTLER, 1977).

Esses métodos utilizam reações de oxi-redução (entre o reagente e a hidroxila fenólica) gerando complexos coloridos, que são quantificados por espectrofotometria. Para dosar taninos, além da Espectrofotometria (Farmacopéia Brasileira, 1996), são adotados métodos que utilizam a propriedade de precipitar-se com proteínas:

- Gravimetria (OMS, World, 1992);
- Hemoglobina (BATE-SMITH, 1973);
- Albumina bovina sérica (HAGERMAN & BUTLER, 1978).

1.4. Óleo Essencial

A “International Standard Organization”, citada por SIMÕES & SPITZER (1999), considera os óleos essenciais como constituintes da categoria de princípios ativos produzidos por vegetais, caracterizados por serem separáveis pelo arraste a vapor de água e produzidos em estruturas anatômicas e celulares definidas, como cavidades e pêlos glandulares. WATERMAN (1993) define os óleos essenciais como misturas complexas, contendo freqüentemente mais de 100 compostos. De forma geral, são substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também, podem ser chamadas de óleos voláteis, etéreos ou essenciais. Suas principais características são a volatilidade e a baixa massa molar (SIMÕES & SPITZER, 1999). Normalmente são

sintetizados nas folhas, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular, e constituídos basicamente de terpenos.

No caso de *Porophyllum ruderale*, as cavidades secretoras têm forma alongada, distribuindo-se, na folha, ao longo das margens, e espalhadas pela lâmina. Cada glândula, marginal ou laminar, está localizada em área intensamente vascularizada (Figura 2).



Figura 2- Ilustração da folha e glândulas de *Porophyllum ruderale*.

O conteúdo da glândula em questão é translúcido, na primeira observação, após extravasamento, seu aroma e sua reação positiva ao “sudan V” (FOSTER, 1949) fazem com que a glândula seja considerada como lipofílica.

Outro aspecto a ser mencionado é que as células glandulares das cavidades e dutos lipofílicos podem secretar somente terpenos, ou terpenos juntamente com carboidratos e outras substâncias (FAHN, 1979).

Quanto à composição química do conteúdo secretado pelas cavidades presentes nas folhas de *P. lanceolatum*, o que se sabe, de acordo com os testes histoquímicos realizados, é que naquele líquido vasado foram detectados lipídios, polissacarídeos e taninos (MONTEIRO, W.R., 1986). A produção dos compostos é intensa até certo estágio de desenvolvimento da glândula, e depois decresce, tendendo ao

desaparecimento. Além disso, o odor, que lembra o de óleos essenciais e resinas, desprendido pelo conteúdo que extravasa do lume da glândula, quando esta é lesada, indica que os terpenos têm aí uma presença nítida.

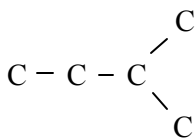
Na tribo Tagetae, da qual faz parte o gênero *Porophyllum*, é importante a presença de estruturas glandulares que contêm altas quantidades de óleos essenciais RODRIGUEZ & MABRY (1977), pois devido à sua volatilidade podem atrair polinizadores e repelir predadores. Nas plantas de três espécies do gênero *Porophyllum* são muito comuns constituintes voláteis, sendo eles, monoterpenos. A maioria dos monoterpenos são cíclicos (CROTEAU, 1987), sendo estes subdivididos segundo o arranjo dos esqueletos carbônicos (CROTEAU & JOHNSON, 1984). Podem ocorrer modificações nas suas estruturas pela adição ou remoção de duplas ligações, adição de oxigênio formando álcoois (-OH), cetonas (=O), aldeídos (-COH) e ésteres (-O-CO-).

A importância dos óleos essenciais na sociedade moderna é fato, em razão da sua ampla utilização em diversas indústrias como a farmacêutica, a cosmética e a alimentícia. Na indústria farmacêutica, é grande o seu uso como medicamentos analgésicos, anti-sépticos, sedativos, expectorantes, estimulantes e estomáquicos etc. (CRAVEIRO et al., 1981; citado por MARTINS, 1996). Na medicina popular, a preparação de diversas plantas aromáticas, na forma de infusões, procura extrair e utilizar os benefícios dessa classe de princípios ativos.

Tradicionalmente, os componentes dos óleos essenciais são vistos como produtos finais e estáticos do metabolismo, mas há evidências de que metabólitos, como os monoterpenos e sesquiterpenos, possam não ser simplesmente acumulados, mas podem ter atividade no metabolismo (LANGENHEIM, 1994).

Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo os últimos os que predominam (SIMÕES; SPITZER, 1999).

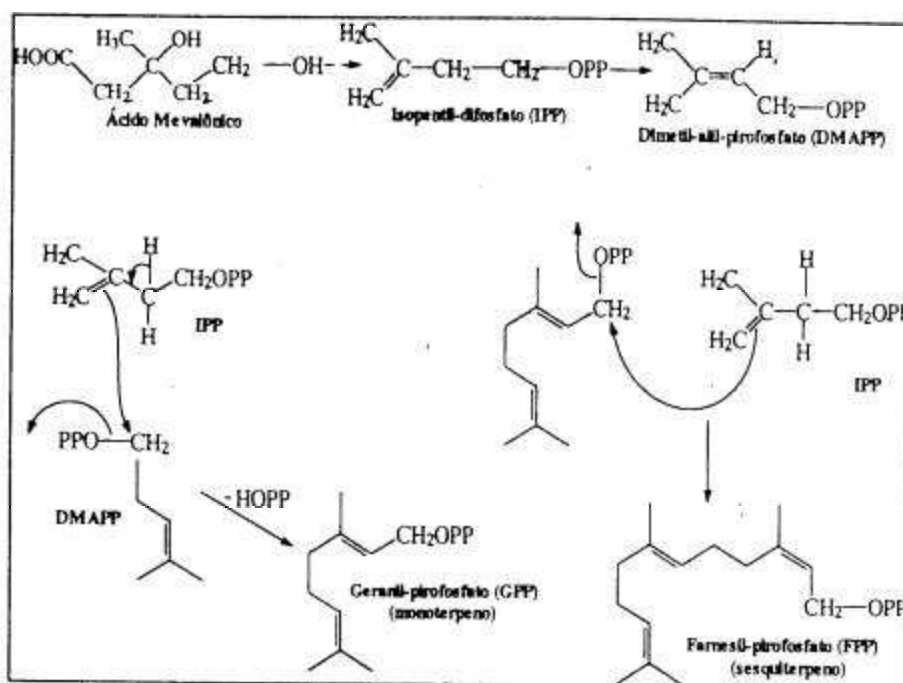
Os terpenos são formados pela junção de unidades isoprênicas, constituídas por cinco unidades de carbono (figura 3).



Fonte: WATERMAN (1993)

Figura 3 – Representação esquemática do esqueleto carbônico de uma unidade isoprênica.

Os terpenóides ou isoprenóides são biossintetizados a partir do isopentilpirofosfato (IPP) (Figura 4), que é o precursor universal destes compostos (KLEING, 1989). O IPP é produzido a partir do ácido mevalônico, componente que dá nome a uma das três rotas mais importantes do metabolismo secundário das plantas (WATERMAN, 1993). O 3,3 dimetilalilpirofosfato (DMAPP) é formado a partir do IPP; estas duas moléculas podem se combinar e produzir o geranylpirofosfato (GPP), que é o primeiro monoterpene produzido; com a adição ao GPP de uma molécula de IPP ou DMAPP, produz-se o farnesilpirofosfato (FPP), considerado sesquiterpene (WATERMAN, 1993; CROTEAU & JOHNSON, 1984). O GPP e FPP, após várias reações, originarão os demais mono e sesquiterpenos respectivamente.



Fonte: Martins (1996), adaptado de Waterman (1993).

Figura 4 – Biossíntese dos terpenóides.

Os sesquiterpenos originados da rota biossintética do ácido mevalônico, da qual também se originam os monoterpenos. Deve-se ressaltar que são conhecidas mais de 3000 estruturas sesquiterpênicas e cerca de 1000 monoterpênicas (WATERMAN, 1993).

A grande diversidade de sesquiterpenos decorre do maior número de carbonos presentes nesses compostos, o que permite maior variação estrutural e estereoquímica

(MARTINS, 1996). Os sesquiterpenos ocorrem com frequência nos óleos essenciais e são menos voláteis que os monoterpenos.

Os diterpenos, formados por 20 carbonos, originam-se do geranylgeranyl pirofosfato (GGPF) (BANTHORDE & CHARLWOOD, 1980). São constituintes minoritários nos óleos essenciais (WATERMAN, 1993). É incomum a presença dos diterpenos em extrações por arraste a vapor, em virtude de sua baixa pressão de vapor. São geralmente viscosos ou sólidos e com alta massa molecular (GUENTER & ALTHAUSEN, 1975).

Outra importância do óleo essencial é que a distinção de genótipos pode ser feita pela análise de óleo essencial, em que se identificam “quimiótipos”, que são constituídos de populações de plantas da mesma espécie, mas que apresentam distinção quanto às espécies químicas que produzem (HAY & SVOBODA, 1993).

A biossíntese dos monoterpenos nas plantas está associada à presença de estruturas secretoras especiais, como células produtoras de resinas e óleos ou epiderme glandular, que compartimentalizam todos os componentes tóxicos provenientes da atividade metabólica das células.

1.5 Extração de óleo essencial

Várias técnicas podem ser empregadas na extração de óleos essenciais, como a hidrodestilação, destilação por arraste a vapor de água, extração com solventes orgânicos ou com CO₂ líquido. Deve-se ressaltar que no último processo há ótimo resultado, mas com o inconveniente de ser extremamente caro (LOPES, 1997).

O processo mais utilizado nas extrações é o arraste a vapor de água, com bom rendimento, facilidade de execução e custo baixo (MANCINI, 1984; MARTINS, 1996; LOPES, 1997).

O método de extração deve ser escolhido de acordo com as características de cada espécie (CRESPINO et al., 1991). CHARLES & SIMON (1990) avaliaram três métodos de extração de óleo: extração por solvente, arraste a vapor e hidrodestilação, utilizando duas espécies aromáticas, *Ocimum kilimandscharicum* e *O. micranthum*. Eles verificaram que a quantidade obtida por arraste a vapor foi maior em comparação com os outros métodos.

O tempo de destilação pode alterar tanto o rendimento do óleo essencial quanto a sua composição, conforme citado por MANCINI (1984). Durante o processo de destilação, a água, o pH e a temperatura podem provocar a hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerizações e oxidações (SIMÕES & SPITZER, 1999), o que pode explicar a razão e a composição dos produtos obtidos por arraste a vapor d'água diferirem da mistura dos constituintes inicialmente presentes nos órgãos secretores do vegetal (SCHUMAUS & KUBECZA, 1985).

A fragilidade dos constituintes dos óleos voláteis é a propriedade que pode explicar porque a composição dos produtos por arraste a vapor d'água difere da mistura dos constituintes inicialmente presentes nos órgãos secretores do vegetal (SCHUMAUS; KUBECZKA, 1985).

A utilização de amostras recém-colhidas pode ser indispensável na detecção de alguns componentes específicos. Seu emprego traz a vantagem de evitar a presença de substâncias oriundas do metabolismo de senescência do vegetal (FALKENBERG et al., 1999). No entanto, a amostra deve ser processada imediatamente, ou conservada até a análise a baixas temperaturas.

1.6 Fatores que influenciam a produção e variabilidade dos óleos

Em razão da crescente valorização desses metabólitos secundários, as pesquisas têm visado maximizar a quantidade de óleo essencial produzido por planta, em várias espécies, sem perder a sua qualidade, ou seja, mantendo a concentração ideal de seus constituintes químicos de interesse (GONÇALVES, 2000).

O estudo da influência dos fatores que levam às variações na produção de metabólitos secundários de interesse é preocupação constante em trabalhos realizados com plantas medicinais, pois com os conhecimentos gerados, pode-se maximizar a produção dos fármacos, melhorando a qualidade das drogas sem, no entanto, acarretar custos adicionais ao processo produtivo (CASTRO, 1997).

O fato de os óleos essenciais serem produtos de metabolismo secundário das plantas pode implicar grandes variações em termos de quantidade e composição, de acordo com fatores como: parte da planta, horário e época de colheita, ataque de patógenos e/ou pragas, etc. As rotas do metabolismo secundário são produtos da resposta genética específica dos organismos, mas talvez sejam ativados durante determinado estágio de crescimento e desenvolvimento, ou durante períodos de estresse causado por limitação nutricional ou ataque de microrganismos e insetos (MANN, 1987). Assim, a regulação do metabolismo secundário depende da base genética da

planta em responder estímulos internos ou externos e da existência desses estímulos no momento apropriado (ANDRADE & CASALI, 1999). O teor de óleo essencial e, portanto, as propriedades terapêuticas podem ter alterações decorrentes de diversos fatores como: método de secagem, tratamento pós-colheita, época do ano, horário de colheita e local de cultivo (SILVA & CASALI, 2000).

Embora todos os órgãos da planta possam acumular óleos, sua composição pode variar segundo a localização, sendo também influenciada pela idade da planta, época e horário de colheita, condições climáticas e sistemas de cultivo. Portanto, o monitoramento dos princípios ativos e o estudo dos fatores envolvidos na variação destes compostos são fundamentais nas recomendações de manejo do ambiente físico e biótico, otimizando a produção destes compostos químicos desejáveis (CASTELLANI, 1997).

Os fatores ambientais podem ser divididos em bióticos e abióticos, considerando-se que determinada população está, ao mesmo tempo, sempre interagindo com o ambiente, recebendo influência e influenciando o meio (CASTELLANI, 1997).

Os fatores bióticos estão relacionados com as interações planta-microrganismos, planta-planta e planta-herbívoros, e constituem respostas dos mecanismos que variam de acordo com suas relações ecológicas locais e imediatas, resultando em situações que podem alterar os processos internos de síntese de metabólitos (ANDRADE & CASALI, 1999).

Entre os diversos fatores abióticos, encontram-se pressões de variações climáticas ou edáficas. Os fatores ambientais, além de alterarem a concentração dos princípios ativos, podem inclusive modificar as propriedades medicinais da planta (GONÇALVES, 2000). A adaptação a condições climáticas pode se processar por mecanismos de defesa, como componentes químicos, que podem ser utilizados pela humanidade como medicinais (ANDRADE & CASALI, 1999). Segundo SWAIN, citado por CROTEAU & JOHNSON (1984) estas substâncias são sintetizadas em resposta às necessidades ecológicas e de desenvolvimento da planta. Assim há compostos que atuam como fitoalexinas (contra fungos e bactérias), na atração de polinizadores, como repelentes e como inibidores da alimentação de animais (DEANS & WATERMAN, 1993; FAHN, 1979, CROTEAU & JOHNSON, 1984).

A época de colheita deve ser determinada visando não só o volume da massa verde colhida, mas também o teor mínimo de princípios ativos, sem o qual a matéria-prima não tem valor na produção de fitoterápicos (AMARAL et al., 1999). O ponto de colheita pode variar de acordo com as partes da planta, o estágio de desenvolvimento, a época do

ano e a hora do dia. O momento da colheita pode alterar a concentração e a composição do óleo essencial (MATOS, 1996).

A variação diurna no conteúdo do óleo essencial pode ocorrer não só em função de perdas por volatilização, como também pelo catabolismo dos seus componentes.

Segundo LOPES et al. (1997), na espécie *Polygonum punctatum* o nível de monoterpenos alcançou seu pico às 6 e às 21 horas.

Em *Strobilanthes callosus*, o teor de estragol passa por grande variação, de acordo com o estágio de desenvolvimento, sendo nulo após a floração; e o teor de 24% do estragol, presente no óleo essencial, ocorre antes da floração, o que altera substancialmente o aroma da referida espécie (WEYERSTAHL et al., 1992). Nas plantas de *Ocimum basilicum*, colhidas em plena floração, houve maior conteúdo de óleo essencial (BONNARDEAUX, 1992). Houve variações significativas no teor de óleos essenciais e de seus constituintes durante o dia, sendo que o eugenol não foi detectado em um dos horários de coleta realizados.

O horário de colheita genericamente recomendado na maioria das plantas medicinais é o período da manhã ou o final da tarde, pois fornece óleo mais aromático do que quando efetuado nos horários mais quentes do dia (HERTWING, 1986). No caso de *Porophyllum ruderale*, não foi encontrado na bibliografia consultada nenhuma pesquisa sobre o melhor horário de colheita.

BAETA et al. (1996) constataram em quatro espécies de Lamiaceae (*Mentha villosa*, *Ocimum americanum*, *Rosmarinus officinalis* e *Coleus barbatus*), variação no teor de fenóis totais das folhas em três épocas, mesmo mantendo o horário de colheita.

1.7 Análise qualitativa do óleo

A separação e a identificação do óleo essencial requerem técnicas e instrumentos apropriados (COLINS, 1997).

Os componentes que normalmente formam os óleos essenciais oferecem algumas dificuldades de separação e de identificação, devido à existência de diversos compostos isoméricos e da instabilidade de certos terpenos (RUDLOLFF, 1974).

A cromatografia gasosa é um dos métodos de separação e quantificação de substâncias componentes dos óleos essenciais. Apesar do seu alto poder de diferenciação, é um método simples. Como os óleos são suficientemente voláteis, a amostra é somente solubilizada em solventes, antes de ser injetada no cromatógrafo. A

identificação dos compostos individuais pode ser realizada por meio da comparação do tempo de retenção relativo à amostra com padrões (SIMÕES & SPITZER, 1999). Ainda na identificação utiliza-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), sendo esse o método mais indicado (WATERMAN, 1993). O espectrômetro de massas é o equipamento que bombardeia compostos com feixes de elétrons e registra quantitativamente o resultado na forma de fragmentos iônicos positivos, sendo este registro gráfico denominado espectro de massas (SILVERSTEIN et al., 1981). O espectro de massas geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. A massa molecular informa a classe da substância. O padrão de fragmentação pode ser comparado com aqueles constantes do banco de dados de espectros de massas, que, normalmente, é instalado no computador (SIMÕES & SPITZER, 1999).

A identificação dos compostos individuais pode ser realizada por meio da comparação do tempo de retenção relativo à amostra com padrões, com vistas a ser mais independente das variações do tempo de retenção, em condições diferentes da medida; foi introduzido o índice de Kovats, que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos (SIMÕES & SPITZER, 1999).

Realizou-se este trabalho com o objetivo de caracterizar a espécie *Porophyllum ruderale* quanto à composição de óleo extraído das folhas e botões florais, quando existentes; e quanto ao rendimento de óleo e de tanino, em três horários (experimento 1) e cinco épocas de colheita (experimento 2), visando encontrar o melhor horário e diferenciar as épocas de colheita quanto à produção destas classes de compostos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das plantas para as extrações:

- a) Primeiro experimento: a semeadura de *Porophyllum ruderale* foi realizada em junho de 2000. As sementes foram obtidas de uma única planta, coletada no campus da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se uma bandeja de isopor composta por 128 células, em cada célula foram colocadas três sementes. O substrato utilizado foi terra. As mudas foram transplantadas em Agosto de 2000, no Viveiro de Plantas Ornamentais da UFV, no espaçamento de 0,4 m entre linhas e plantas, totalizando 84 plantas. Na adubação, foi utilizado 0,5 L de húmus por cova. As irrigações foram realizadas quando necessário, além de capinas manuais periódicas quando a presença de invasoras tornava-se excessiva.
- b) Segundo experimento: a semeadura foi realizada em Fevereiro de 2001, com sementes obtidas da mesma planta-mãe do primeiro experimento. Utilizou-se novamente o substrato de terra em bandeja de isopor composta por 128 células, em cada célula foram colocadas três sementes. As mudas foram transplantadas em Abril de 2001 nos vasos de 8 L, contendo terra e 30% de húmus, totalizando 40 plantas.

2.2 Coleta e preparo das amostras:

- a) Primeiro experimento: realizou-se a coleta no período de floração, quando haviam botões florais bem formados, às 7, 13 e 18 horas. Na coleta, cortou-se na base do caule, pouco acima do solo, as plantas que compunham cada parcela, levando-as em seguida ao laboratório e procedendo a extração de óleo essencial, conforme descrito no item 2.3. Uma amostra das plantas foi submetida à secagem, em sala com desumidificador, e depois triturada antes da análise de tanino.
- b) Segundo experimento: foram realizadas colheitas em cinco épocas, no intervalo quinzenal, iniciando a primeira coleta 30 dias após o transplante. Na coleta, cortaram-se na base do caule duas plantas por parcela, as quais foram levadas em seguida ao laboratório visando à extração de óleo essencial. Uma amostra foi submetida à secagem, em sala com desumidificador, e, depois de triturada, submetida à análise de tanino. As coletas foram realizadas às 7 horas da manhã, conforme recomendado por MARTINS et al. (1996).

2.3 Extração do óleo essencial

Na extração do óleo essencial das folhas e botões florais de *Porophyllum ruderale* foi utilizado o aparelho “Clevenger” modificado, adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1000 ml (SKRUBIS, 1982; MING et al., 1996).

O balão de fundo redondo foi carregado com no máximo 100g da planta e 500 ml de água destilada, em cada extração, iniciando-se o processo de hidrodestilação. O tempo de extração foi 60 minutos.

Obtido o hidrolato (mistura de água + óleo), procedeu-se à extração com solvente orgânico pentano (3 x 30 ml), em funil de separação agitado vigorosamente por cerca de 10 segundos, repetindo-se a operação cinco vezes. O óleo solubilizou-se na fase orgânica e descartou-se a fase aquosa. A fração orgânica obtida foi tratada com sulfato de magnésio anidro para retirar a água presente. Após alguns minutos em repouso, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo a 40° C, até redução expressiva do volume do solvente, de onde foi transferida para um frasco com tampa rosqueada, devidamente tarado.

Após evaporação completa do solvente, o frasco foi pesado novamente, calculando-se assim o rendimento de óleo. Determinada a massa de óleo obtida, calculou-se a quantidade de óleo em mg/100g de folha ou de botão floral.

As amostras foram mantidas em geladeira até o momento da análise cromatográfica.

Posteriormente, procedeu-se à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa para identificação dos constituintes do óleo essencial de *Porophyllum ruderale*.

2.4. Extração de tanino

O método adotado na determinação de tanino foi o preconizado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Esse método se fundamentou na redução do ácido fosfomolibídico – fosfotungístico pelos taninos em meio básico, produzindo coloração azul-forte, que é medida espectrofotometricamente no comprimento de onda 760 nm.

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Mineral do Departamento de Fitotecnia da UFV.

- a) Extração de tanino (fenóis totais): Na extração de tanino tomou-se 100 mg da planta desidratada e triturada, submetendo a três extrações consecutivas com

metanol (3 ml) a quente (aproximadamente a 62°C), sendo cada extração com duração de 10 minutos. Os extratos resultantes foram pipetados e filtrados em algodão, no balão volumétrico, e o volume foi completado para 10 ml com metanol.

- b) Preparo da curva-padrão: No preparo da curva-padrão, foram adicionados em tubos de ensaio: solução padrão de ácido tânico (0; 0,2; 0,4; 1,6; 0,8 e 1,0 ml), 7,5 ml de água destilada, 0,5 ml do reagente Folin-Denis e 1,0 ml de solução saturada de Na₂CO₃, diluindo-se a 10 ml com água. Misturou-se bem e foi determinada a absorvância, depois de 30 minutos, em 760 nm, obtendo-se a curva-padrão com a absorvância em função de mg de ácido tânico/ 100ml. A concentração da solução de ácido tânico e o modo de preparo dos reagentes encontram-se no apêndice.
- c) Leitura em espectrofotômetro: As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U – 2000. Na preparação da amostra destinada à leitura de absorvância, pipetou-se 0,1 ml do extrato em tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 7,5 ml de água destilada, 0,5 ml do reagente Folin-Denis e 1 ml de solução saturada de carbonato de sódio, sendo completado o volume de 10 ml com água destilada. Após adição dos reagentes, esperou-se 30 minutos para leitura de absorvância em 760 nm. Determinada, de acordo com a curva-padrão, a concentração das amostras em mg de ácido tânico/100ml, estas foram convertidas em porcentagem de tanino por 100 mg de amostra de planta desidratada.

2.5 Análise Qualitativa do óleo essencial

A análise qualitativa do óleo foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando o aparelho Shimadzu GC-17 A.

Utilizou-se a coluna cromatográfica do tipo capilar SBP5 de sílica fundida, com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e filme de 0,25 mm. Utilizou-se nitrogênio como gás carreador, na vazão de 1 ml/minuto.

As temperaturas foram 220°C no injetor e 240°C no detector FID. A programação da temperatura da coluna durante as análises foi 60°C a 240°C, sendo acrescentados 3°C por minuto.

Utilizou-se diclorometano como solvente das amostras que foram diluídas a 21500 ppm imediatamente antes da injeção, de modo a evitar volatilização excessiva do

solvente, o que alteraria a concentração das amostras, dificultando a comparação dos cromatogramas obtidos. Injetou-se 1 μL de amostra.

Após análise dos cromatogramas, tomou-se amostra representativa, ou seja, que continha o maior número de picos de constituintes do óleo essencial, visando à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) (ZECHINI D'AULERIO et al., 1995).

Os espectros obtidos na CG-EM foram comparados com os existentes no banco de dados do equipamento, procedendo-se à identificação de alguns compostos da amostra.

2.6 Análise estatística

Na interpretação dos dados de produção de óleo essencial e ta nino realizaram-se análises de variância e regressão. A análise estatística foi feita utilizando o programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento de óleo essencial

Verificou-se que o teor de óleo essencial nas plantas foi influenciado significativamente pelo horário e época de colheita, ocorrendo maior teor no período de floração e nos horários de 7 e 13 horas. De acordo com o modelo de regressão ajustado para óleo essencial total, os dados, a partir de 60 dias após o plantio, constam da figura 5. Nas tabelas 1 e 2 têm-se as médias dos conteúdos de óleo.

Quando se considerou a matéria fresca, não houve diferença significativa entre a colheita pela manhã (7 horas) e aquela realizada no início da tarde (13 horas). No entanto, a diferença foi significativa quando a primeira colheita (7 horas) foi comparada com aquela do fim da tarde (18 horas). Até o início da tarde, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores dos teores de óleo na matéria fresca, possivelmente porque as taxas de perda de turgescência (redução de umidade) e de óleo por volatilização, se equilibram. Entre a manhã e o início da tarde permanece o equilíbrio entre estas taxas, pois não ocorrem diferenças significativas entre os conteúdos de óleo na matéria fresca. O desequilíbrio nestas taxas foi detectado quando se considerou o início da manhã (7 horas) e o final da tarde (18 horas), pois houve redução significativa no conteúdo de óleo na matéria fresca, ou seja, a perda de turgescência é proporcionalmente inferior à perda de óleo por volatilização. Esta variação durante o dia (teor de umidade maior de manhã) se deu em função do desbalanço entre a transpiração e a absorção de água. Caso não houvesse perda de óleo por volatilização durante o dia, não deveria haver variação entre os horários de colheita para matéria fresca, resultado que concorda com o observado por MARTINS (1996); e, vem confirmar a recomendação de alguns autores de que as plantas ricas em óleo essencial devem ser colhidas preferencialmente no período da manhã, pois o período de exposição ao sol pode provocar perda quantitativa importante deste princípio ativo do vegetal (MARTINS, 1996).

A variação diurna no conteúdo do óleo essencial pode ocorrer não só em função de perdas por volatilização, como também pelo catabolismo dos seus componentes (ADAMS & HAGERMAN, 1977).

O óleo essencial de *Porophyllum ruderale* localiza-se em estruturas glandulares superficiais (MONTEIRO, 1986), sendo estas fragilizadas pelo ambiente que favoreceria sua volatilização. Tal fato pode estar relacionado ao menor teor de óleo encontrado nas plantas colhidas às 18 horas. O óleo pode ter sido volatilizado durante o

dia, em decorrência do aumento da temperatura (MARTINS, 1996) e também catabolizado pela planta.

Tabela 1 – Valores médios do teor de óleo (mg/100 g) em *Porophyllum ruderale*, no primeiro experimento conduzido no período de Junho a Outubro de 2000.

Órgão	Horários		
	Manhã (7 horas)	Meio-dia (13 horas)	Tarde (18 horas)
Folhas + Botões	17,4 A	17,0 A	10,1 B

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2 - Valores médios do teor de óleo (mg/100 g) em *Porophyllum ruderale*, no segundo experimento conduzido no período de Fevereiro a Maio de 2001.

Órgão	Épocas				
	I (60 dias)	II (75 dias)	III (90 dias)	IV (105 dias)	V (120 dias)
Folhas	13,8	7,5	23,1	10,6A	12,5A
Botões	–	–	–	45,1A	23,0B
Total	13,8CD	7,5D	23,1BC	55,8A	35,6B

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quando foi considerada a produção total de óleo (folha e botão floral), ocorreram diferenças significativas entre as épocas de colheita. Ocorrendo o mesmo entre as partes colhidas nas épocas IV (105 dias) e V (120 dias).

Verificou-se que nas plantas colhidas na época IV (105 dias), período de floração, houve maior teor de óleo do que nas colhidas em outras épocas. Resultado que concorda com o obtido por CORREA JÚNIOR (1991), em trabalho realizado com *Melissa* e *Mentha*; ressaltando que existem recomendações sobre a colheita das plantas com finalidade de extração dos seus óleos essenciais em épocas próximas ou na própria floração, pois é a época em que as plantas produzem maior quantidade de princípios ativos.

Verificou-se também que na época IV (floração) foi maior o teor de óleo nos botões florais do que nas folhas, nas quais o teor de óleo diminuiu quando comparado com a época anterior. A existência de diferença no rendimento do óleo entre as partes da planta e a época de coleta pode ser indicativo de que na época de plena floração, as plantas realoquem parte do óleo essencial existente para as sumidades floridas, o que estaria dentro das expectativas, uma vez que, ao se comportar dessa forma, a planta anual, como é o caso de *Porophyllum ruderale*, estaria favorecendo sua perpetuação; levando em consideração que entre as funções dos óleos essenciais destaca-se a proteção contra herbívoros e a atração de insetos polinizadores (TAIZ & ZEIGER, 1991), fatos desejáveis que ocorram nos órgãos reprodutivos.

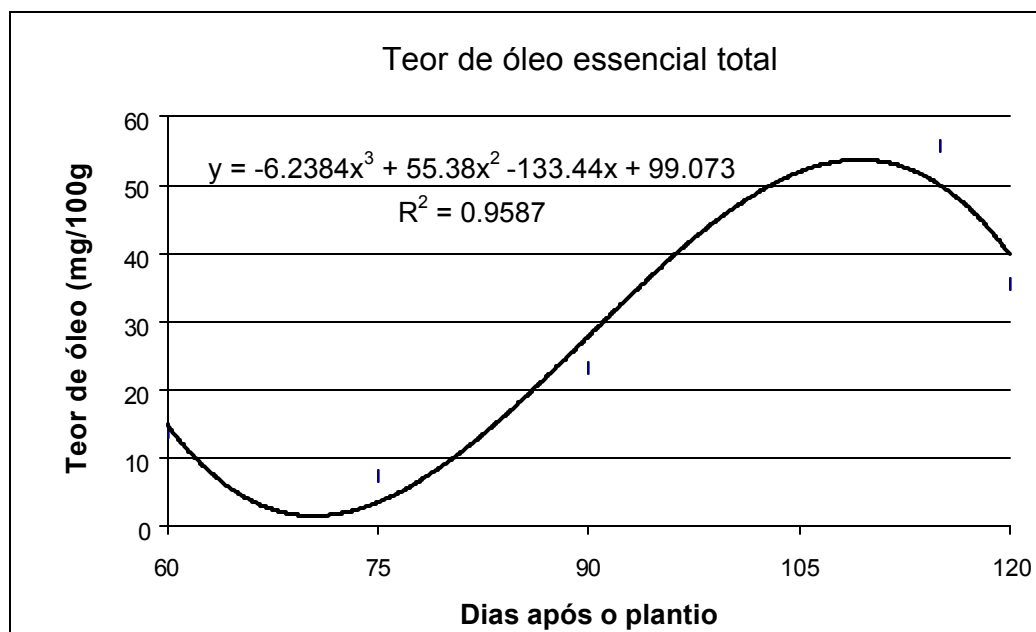


Figura 5 – Estimativa de óleo essencial total de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*), no segundo experimento, no período de 23 de Março a 22 de Maio de 2001, em Viçosa – MG.

3.2 Rendimento de tanino (%)

Na figura 6, tem-se o modelo de regressão ajustado para rendimento de tanino, a partir de 60 dias após o plantio.

Aos 120 dias de idade constatou-se maior teor de tanino (plena floração), resultado em concordância com o encontrado por SÁ (1992), o qual observou maior concentração de tanino em *Bacharis myriocephala*, no período de plena floração, concluindo que a quantidade de compostos químicos produzidos está relacionada com

os períodos de vida do vegetal, havendo maior produção na época da floração, quando o metabolismo torna-se mais intenso. O aumento do teor de tanino ao longo do desenvolvimento da planta tem sido encontrado em muitas espécies de plantas perenes.

PEREIRA et al. (1996) estudaram tanino em *Maytenus aquifolium*, classificando o teor de tanino em: alto (4,4%), médio (3,4%) e baixo (2,5%), utilizando o método de análise espectrofotométrico da AOAC. Comparando os resultados deste trabalho com os encontrados por PEREIRA et al. (1996), os rendimentos de taninos podem ser considerados baixos nas épocas I (60 dias), II (75 dias) e III (90 dias), e médios nas épocas IV (105 dias) e V (120 dias), no período de Março a Maio de 2001, realizando-se a colheita às 7 horas da manhã. Quanto aos teores de tanino analisados no mês de Outubro de 2000, em três horários de colheita, podem ser classificados como médios na colheita realizada às 7 horas e altos nas colheitas realizadas às 13 e às 18 horas.

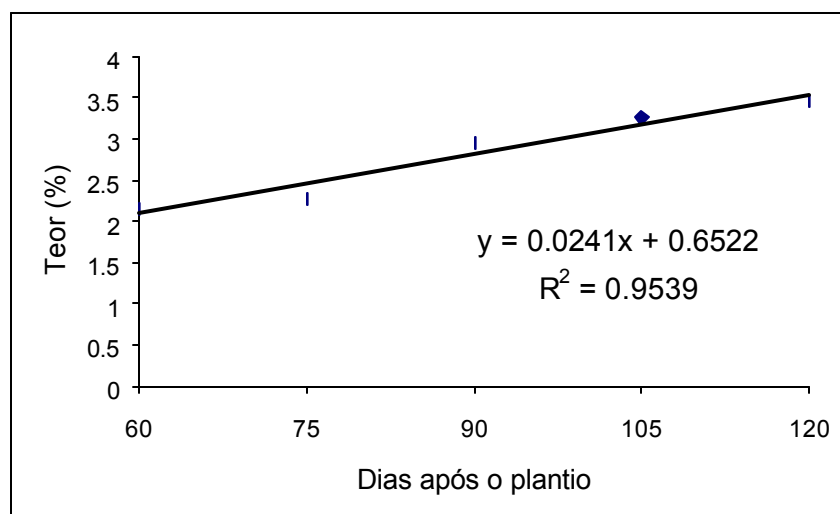


Figura 6 – Estimativa do rendimento de tanino em *Porophyllum ruderale* no segundo experimento, no período de 23 de Março a 22 de Maio de 2001, em Viçosa – MG.

Pela análise das tabelas 3 (experimento 1) e 4 (experimento 2), verificam-se o horário e a época em que as folhas produziram mais tanino.

Tabela 3 – Valores médios do teor de tanino (%) em *Porophyllum ruderale*, no primeiro experimento conduzido no período de Junho a Outubro de 2000.

Órgão	Horários		
	7 horas	13 horas	18 horas
Folhas	4,1 B	5,1 AB	5,8 A

Valores médios acompanhados de mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Verificou-se que na colheita das 18 horas o rendimento de tanino foi maior do que na das 7 horas.

Tabela 4 - Valores médios do teor de tanino (%) em *Porophyllum ruderale*, no segundo experimento conduzido no período de Fevereiro a Maio de 2001.

Órgão	Épocas				
	I (60 dias)	II (75 dias)	III (90 dias)	IV (105 dias)	V (120 dias)
Folhas	2,0 B	2,2 B	3,1 AB	3,3 A	3,6 A

Valores médios acompanhados de mesma letra na mesma linha não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O maior teor de tanino, dentro do período estudado, foi obtido aos 120 dias, na fase de plena floração.

3.3 Análise qualitativa do óleo

De acordo com o trabalho de PATITUCCI et al. (1995), ao utilizar coluna cromatográfica e condições de operação específicas, é possível a separação de compostos terpênicos que possam existir num extrato vegetal, agrupando-os em classes, conforme o tempo de retenção de mono, sesqui, di e triterpenos presentes no extrato. A injeção de padrões mono-funcionalizados dessas classes de terpenos permitiu a determinação dos tempos de retenção para cada classe, que foram: monoterpenos – 4 a 12 minutos; sesquiterpenos – 12 a 19 minutos; diterpenos 19 a 27 minutos; e triterpenos 27 a 42 minutos.

Utilizando a mesma metodologia, pôde-se notar que o óleo essencial de *Porophyllum ruderale* contém mistura complexa, constituída basicamente por monoterpenos (Figuras 7 e 8).

Na Figura 7, encontram-se os cromatogramas de óleo essencial colhido de *Porophyllum ruderale*, no início da floração, no mês de Outubro de 2000, às 7, 13 e 18 horas. Pela análise dos espectros obtidos pela CG-EM, e comparação com os existentes no banco de dados do equipamento, puderam ser identificados os compostos encontrados na tabela 5.

Não se observou diferença entre os cromatogramas dos três horários de colheita, podendo-se inferir que o óleo essencial originado de plantas coletadas na época de plena floração, extraído de folhas + botões florais, não variou quanto à sua composição.

Tabela 5 – Compostos identificados no óleo essencial das folhas e botões florais de *Porophyllum ruderale*, colhidos às 7, 13 e 18 horas em Outubro de 2000.

Pico	Composto	TR (min)	Área (%)		
			7 horas	13 horas	18 horas
1	NI	8,99	4,00	–	3,80
2	Ácido 5- cianopentanóico*	12,96	–	–	1,96
3	Decanal	21,35	–	–	1,59
4	p-toli-propeno*	21,57	5,03	3,38	2,45
5	Sabinocetona*	21,77	26,47	31,75	28,41
6	terpin-4-ol*	22,39	3,09	2,27	1,69
7	Cuminaldeído*	24,37	6,26	7,40	8,12
8	decan-1-ol*	25,58	–	–	2,28
9	Cuminol*	26,70	7,43	9,54	5,75
10	<i>trans</i> -caran-2-ol*	28,04	2,70	5,85	4,73
11	NI	28,83	4,11	4,57	5,94
12	Felandral*	30,24	1,92	2,13	3,20
13	NI	30,91	1,58	3,29	2,15
14	NI	33,67	3,94	6,03	6,23
15	NI	34,03	–	–	1,91
16	NI	35,82	3,90	6,09	4,56
17	NI	36,11	–	–	3,63
18	NI	38,33	2,82	4,06	3,21
19	NI	40,06	7,11	2,81	5,71
20	NI	40,38	4,73	2,89	2,70

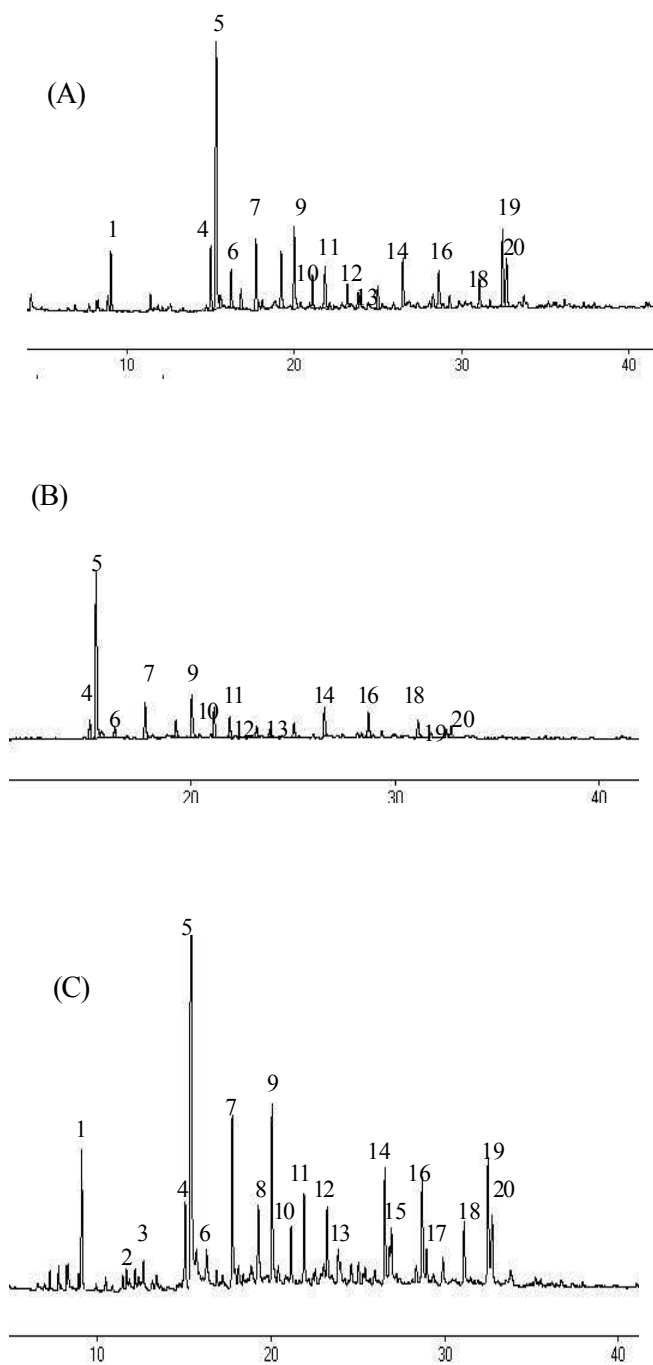
NI = Não-identificado

Ausente

TR = Tempo de Retenção

* compostos identificados na espécie pela 1ª vez

Figura 7 – Cromatogramas de óleo essencial extraído das folhas e botões florais de *Porophyllum ruderale*, cultivado em Viçosa – MG, em Julho de 2000, colhidos às 7 (A), 13 (B) e 18 horas (C).



Na Figura 8, encontram-se os cromatogramas de óleo essencial das folhas de *Porophyllum ruderale* colhido nos meses de Março a Maio de 2001, às 7 horas, cujos compostos identificados encontram-se na tabela 6.

Na Figura 9, encontram-se os cromatogramas de óleo essencial dos botões florais de *Porophyllum ruderale* colhido nos meses de Março a Maio de 2001, às 7 horas, cujos compostos identificados encontram-se na tabela 7.

Observou-se diferença entre os cromatogramas referentes às cinco épocas de colheita. A partir dos 90 dias após a emergência (DAE), o teor de monoterpenos (compostos 1 a 7) aumentou significativamente nas folhas e botões florais de *Porophyllum ruderale*. No óleo essencial extraído aos 120 DAE percebe-se também o aumento dos compostos 14, 15, 16 e 17. Sendo o composto 15 alqueno e os compostos 14, 15 e 17 provavelmente sesquiterpenos, de acordo com o trabalho de PATITUCCI et al. (1995). Nas épocas III (90 dias), IV (105 dias) e V (120 dias) o constituinte majoritário foi β -felandreno.

Tabela 6 – Compostos identificados no óleo essencial das folhas de *Porophyllum ruderale*, colhidas às 7 horas, aos 60, 75, 90, 105 e 120 dias após a emergência, em Maio de 2001.

Pico	Composto	TR (min)	Área (%)				
			60	75	90	105	120
1	α -pineno	12,137	–	–	6,00	6,24	7,92
2	β -pineno*	12,900	–	–	3,60	2,49	3,21
3	α -felandreno*	13,814	–	–	2,09	–	–
4	β -felandreno*	14,136	–	–	35,92	43,69	56,47
5	(z)- β -ocimeno*	14,802	–	–	2,26	5,17	6,67
6	Terpinen-4-ol*	21,383	–	–	–	0,46	0,44
7	Sabinacetona*	21,809	–	–	9,12	2,87	1,22
8	Acetato de fendrila*	23,494	–	–	2,99	0,92	0,38
9	Cuminaldeído*	24,419	–	–	2,78	–	–
10	Decan-1-ol*	25,628	–	19,18	3,20	0,38	–
11	Cuminol*	26,748	–	–	3,13	–	–
12	5-metil-undec-1-eno*	28,084	–	–	2,88	–	–
13	NI	28,879	–	–	3,09	–	–
14	NI	30,310	–	–	2,62	3,08	0,99
15	Alqueno	33,713	–	10,14	4,28	9,19	3,32
16	NI	35,629	–	–	2,36	–	–
17	NI	35,862	18,76	15,34	4,24	9,77	3,12
18	NI	35,901	–	–	2,44	–	–
19	NI	38,354	–	–	3,50	1,58	0,91
20	Hexadec-1-eno*	39,971	6,73	–	–	–	–
21	Hexadecano*	40,281	–	–	1,16	–	–
22	Longipinenoepóxido*	40,406	–	–	2,82	0,44	0,31
23	Benzoato de benzila*	47,228	4,11	–	–	–	–
24	Octadec-1-eno*	47,810	7,98	–	–	–	–
25	•	•	•	•	•	•	•
26	•	•	•	•	•	•	•
27	Heptadecanal	54,919	6,07	–	–	–	–
28	Octadecanal*	58,950	14,04	5,47	–	–	–
29	Alqueno	61,500	3,04	–	–	–	–
30	Alqueno	70,307	18,08	–	–	–	–

NI = Não-identificado

• Ftalato (contaminante)

– Ausente

TR = Tempo de Retenção

* compostos identificados na espécie pela 1ª vez

Figura 8 – Cromatogramas de óleo essencial extraído das folhas de *Porophyllum ruderale*, cultivado em Viçosa – MG, em Fevereiro de 2001, colhidas às 7 horas, aos 60 (A), 75 (B), 90 (C), 105 (D) e 120 (E) dias após o plantio.

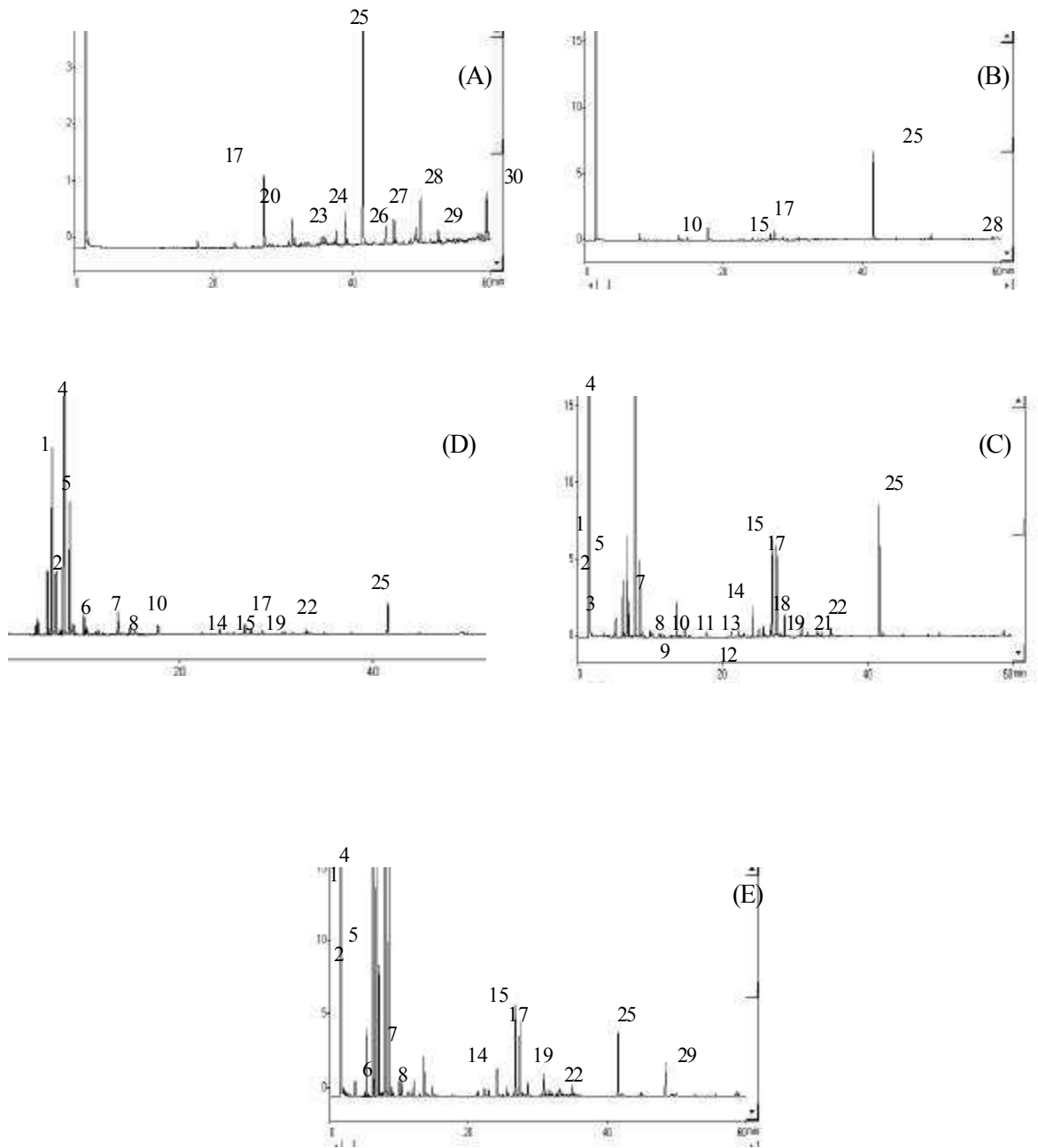


Tabela 7 – Compostos identificados no óleo essencial dos botões florais de *Porophyllum ruderale*, colhidos às 7 horas, aos 105 e 120 dias após a emergência, em Maio de 2001.

Pico	Composto	TR (min)	Área (%)	
			105	120
1	α -pineno	12,137	12,41	6,27
2	β -pineno*	12,900	3,78	1,58
3	α -felandreno*	13,814	0,12	0,06
4	β -felandreno*	14,136	62,01	44,56
5	(z)- β -ocimeno*	14,802	7,99	9,55
6	Terpinen-4-ol*	21,383	1,04	1,63
7	Sabinacetona*	21,809	0,49	1,08
8	Acetato de fendrila*	23,494	0,37	0,87
9	Cuminaldeído*	24,419	–	0,06
10	Decan-1-ol*	25,628	0,31	1,09
11	Cuminol*	26,748	–	–
12	5-metil-undec-1-eno*	28,084	–	–
13	NI	28,879	–	–
14	NI	30,310	0,33	3,44
15	Alqueno	33,713	0,79	9,31
16	NI	35,629	–	–
17	NI	35,862	0,79	9,69
18	NI	35,901	–	–
19	NI	38,354	–	–
20	Hexadec-1-eno*	39,971	–	–
21	Hexadecano*	40,281	–	–
22	Longipinenoepóxido*	40,406	0,07	0,30
23	Benzoato de benzila*	47,228	–	–
24	Octadec-1-eno*	47,810	–	–
25	•	•	•	•
26	•	•	•	•
27	Heptadecanal	54,919	–	–
28	Octadecanal*	58,950	–	–
29	Alqueno	61,500	–	–
30	Alqueno	70,307	–	–

NI = Não identificado

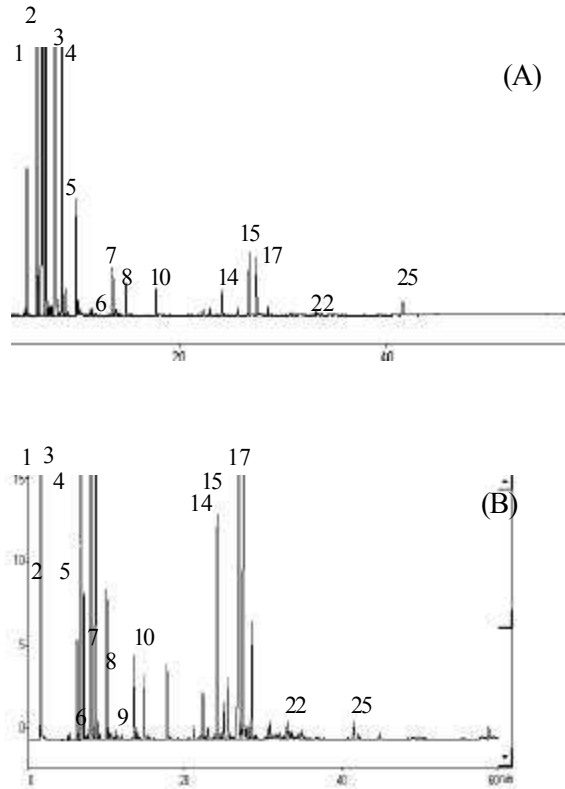
• Ftalato (contaminante)

– Ausente

* compostos identificados na espécie pela 1ª vez

TR = Tempo de Retenção

Figura 9 – Cromatogramas de óleo essencial extraído dos botões florais de *Porophyllum ruderale*, cultivado em Viçosa – MG, em Fevereiro de 2001, colhidos as 7 horas, aos 105 (A) e 120 (B) dias após o plantio.



4. CONCLUSÕES

4.1 Óleo

- O melhor horário de colheita é o início da manhã ou o início da tarde;
- Há grande perda de óleo a partir das 13 horas;
- O teor de óleo essencial total (folhas e botões florais) foi maior no período entre 105 a 120 dias após o plantio;
- As inflorescências proporcionam maior conteúdo de óleo essencial do que as folhas;
- O óleo essencial constitui-se de mistura complexa, formada principalmente por compostos monoterpênicos;
- De junho a outubro, o componente majoritário do óleo essencial foi a sabinocetona;
- De fevereiro a maio, o componente majoritário do óleo essencial, no período de 90 a 120 dias após o plantio, foi o β -felandreno.

4.2 Tanino

- O melhor horário de colheita é o final da tarde;
- O teor de tanino é maior no estágio reprodutivo em plena floração, aos 120 dias após o plantio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P., HAGERMAN, A. Diurnal variation in the volatile terpenoids of *Juniperus scopulorum* (Cupressaceae). **American Journal of Botany**, v.64, n.3, p.278-285, 1977.
- ALMASSY JÚNIOR, A.A. **O Programa Fitoverde e o Grupo Entre Folhas: a fitoterapia nas esferas governamental e não-governamental**. Viçosa, MG: UFV, 2000, 124p. Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- AMARAL, C.L., OLIVEIRA, J.E.Z., CASALI V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV – Departamento de Fitotecnia, 1999. 153p.
- ANDRADE, F.M.C., CASALI, L. A. **Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa: UFV – Departamento de Fitotecnia, 1999. 139p.
- ASSOCIATION OF AGRICULTURAL CHEMIST - A.O.A.C. **Official methods of analysis**. 11.ed. Washington, D.C.: 1970. 1015p.
- BAERHEIM SVENDSEN, A., SCHEFFER, J.J.C. (eds.). **Essential Oils and Aromatic Plants**. Dordrecht: Nijhoff / Dr. Junk, p.127-134, 1985.
- BAETA, E.C.M.A., CASALI, L.A., PIMENTA, D.S. SCIO, E. Variação sazonal de componentes químicos de plantas medicinais da família Labiatae. In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2, Lavras, MG, 1996. **Anais...** Lavras: UFLA, 1996, p.20.
- BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A., WORTELE, E.S. et al. Natural plant chemical source of industrial and medicinal materials. **Science**, v.228, p.1154-1160, 1985.
- BALBAA, S.I. Satisfying requirements of medicinal plant cultivation. **Acta Horticulturae**, v.132, p. 75-84, 1983.
- BANTHORDE, D.V., CHARLWOOD, B.V. The isoprenoids. In: BELL, E.A., CHARLWOOD, B.V. (Eds.). **Encyclopedia of plant physiology – new series – vol. 8 – Secondary plant products**, p.185-220, 1980.
- BATE-SMITH, E.C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, v.12, p.907-912, 1973.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.
- BERNARDINI, A.C., POZETTI, G.L. Chemical study of the *Porophyllum ellipticum* (L.) Cass. (*Porophyllum ruderale*, Griseb.). **Ver. Fac. Farm. Odontol. Araraquara**, 10, 245-253 (1976); **Chem. Abst.**, 89, 143372w (1976).

- BOHLMANN, F., BARUAH, R.N., DOMINGUEZ, X. A further dithienyl derivative from *Porophyllum escoparia*. **Planta Médica**, v.1, p.77-78, 1985.
- BOHLMANN, F., JAKUPOVIC, J., ROBINSON, H. & KING, R.M. A dithienylacetylene from *Porophyllum ruderale*. **Phytochemistry**, v.19, p.2760, 1980.
- BOHLMANN, F. & ZDERO, C. Uber dimere terpeneketone aus *Tagetes graciles*. **Phytochemistry**, v.18, p.341-343, 1979.
- BOHLMANN, F., ZDERO, C., KING, R.M. & ROBINSON, H. Thymol derivatives from *Porophyllum riedelii*. **Phytochemistry**, v.22, p.1035-1036, 1983.
- BONNARDEAUX, J. The effect of different harvesting methods on the yield and quality of basil oil in the ord river irrigation area. **Journal of Essential Oil Research**, v.4, n.1, p.65-72, 1992.
- BROWN JÚNIOR, K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, v.18, n.1, p.291-303, 1988.
- CASTELLANI, D.C. **Crescimento, anatomia e produção de ácido erúico em *Tropaeolum majus* L.** Viçosa, MG:UFV, 1997, 108p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- CASTRO, D.M. **Caracterização Izozimática, da anatomia foliar, do óleo essencial e germinação de *Leonurus sibiricus* L.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- CHAN, G.F.Q., LEE, M.M., GLUSHKA, J. & TOWERS, G.H.N. Photosensitizing thiophenes in *Porophyllum tessaria* and *Tagetes*. **Phytochemistry**, v.18, p.1566, 1979.
- CHARLES, D.J., SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **J. Am. Soc. for Hort. Sci.**, v.115, n.3, p.458-462, 1990.
- CHUNG, K.T., WONG, T.Y., WEI, C.I., HUANG, Y.W. Tannins and human health: a review. **Critical Review in Food Science Nutrition**, v.38, n.6, p.421-464, 1998.
- COLLINS, H.C., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** Campinas, SP: UNICAMP, 1997. 279p.
- CORREA JÚNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas.** Curitiba: EMATER – PR, 1991. 151p.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**, 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, 1975. 988p.
- CRESPO, M.E., JIMENEZ, J., NAVARRO, C. Special methods for the essential oil of the genus *Thymus*. In: LINSKENS, H.F., JACKSON, J.F. (Eds.). *Modern methods of plant analysis*. New Series, v.12, **Essential oils and waxes**. Berlin: Springer-Verlag, p.41-62, 1991.

- CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chemical Review**, v.87, p.929-954, 1987.
- CROTEAU, R., JOHNSON, M.A. Biosynthesis of terpenoids in glandular trichomes. In : RODRIGUEZ, E., HEALEY, P.L., MEHTA, I. Ed. **Biology and chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum Press, p.133-186, 1984.
- DEANS, S.G. WATERMAN, P.G. Biological activity of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman Group, p.97-109, 1993.
- DEVINCENZI, I.A.A., HONDA, N.K., BRUM, R.L., MOREIRA, R.M. Atividade fungitóxica e citotóxica do óleo essencial de *Porophyllum ruderale*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, SC, 1996. **Anais ...** Florianópolis, SC: UFSC, 1996.
- D'MELLO, J.P.F., DUFFUS, C.M., DUFFUS, J.H. **Toxics substances in crop plants**. Royal Society of Chemistry, 1991. 339p.
- DOWNUM, K.R., KEIL, D.J. & RODRIGUEZ, E. Distribution of acetylenic thiophenes in the Pectidinae. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 13, n.2, p.109-113, 1985.
- DOWNUM, K.R. & TOWERS, G.H.N. Analysis of thiophenes in the Tageteae (Asteraceae) by HPLC. **J. Nat. Prod. (Lloydia)**, v.46, n.1, p.98-103, 1983.
- ECHEVERRY, S.H., MUNÓZ, J.E., TAMAYO, C.H. Estudio del crecimiento y fenología de las especies de albahaca, *Ocimum basilicum* L., *Ocimum minimum* L. y *Ocimum gratissimum* Hook. **Acta Agrônômica**, v.40, n.1/2, p.51-63, 1990.
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: RIBEIRO, D. (Ed.). **Suma etnológica brasileira**. Petrópolis: FINEP, v.1, p.135-150, 1986.
- ESTELL, R.E., FREDERICKSON, E.L., HAVSTAD, K.M. Chemical composition of *Fluorensia cernua* at four growth stages. **Grass and Forage Science**, v.51, n.4, p.434-441, 1996.
- FAHN, A. & BENOUAICHE, P. Ultrastructure, development and secretion in the nectari of banana flowers. **Ann. Bot.**, v.44, p.85-93, 1979.
- FALKENBERG, M.B., SANTOS, R.I., SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise de fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS; Ed. UFSC, 1999. 812p.
- Farmacopéia Brasileira**, 4.ed. SP: Atheneu, 1996. Monografia *Hamamelis virginiana*.
- FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. D. van Nostrand Co., Inc. New York. 1949.
- GLYPHIS, J.P., PUTTICK, G.M. Phenolics in some southern African Mediterranean shrubland plants. **Phytochemistry**, v.27, p.743-752, 1988.

- GOMMERS, F.J. & GEERLINGS, J.W.G. Lethal effect of near ultraviolet light on *pratylenchus penetrans* from root of tagetes. **Nematologica**, v.19, p.389-393, 1973.
- GONÇALVES, L.A. **Os tricomas glandulares de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae) e o desenvolvimento da espécie em dois níveis de radiação solar.** Viçosa, MG: UFV, 2000, 105p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- GUENTHER, E., ALTHAUSEN, D. **The essential oils.** Huntington: Robert, E., Krieger Publishing Company, v.6, 1975.
- GUILLET, G., BÉLANGER, A., ARNASON, J.T. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): identification, localization and insecticidal synergism with α -terthienyl. **Phytochemistry**, v.49, n.2, p.423-429, 1998.
- GUILLET, G., LORENZETTI, F., BÉLANGER, A., ARNASON, J.T. & BERNAYS, E.A. Production of glands in leaves of *Porophyllum* spp. (Asteraceae): ecological and genetic determinants and implications for insect herbivores. **J. Ecology**, v.85, p.647-655, 1997.
- HAGERMAN, A.E. Extractions of tannin from fresh and preserved leaves. **J. Chem. Ecol.**, v.14, p.453-461, 1988.
- HAGERMAN, A.E., BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **J. Agric. Food Chem.**, v.26, p.809-812, 1978.
- HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods.** 2.ed. Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. 288p.
- HARBORNE, J.B. **Methods in plant biochemistry.** New York. Academic Press, v.1, 1989.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.
- HASLAM, E. **Plant polyphenols.** Cambridge: Cambridge University, 1989.
- HATTORI, M., KUSUMOTO, L.T., NAMBA, T., ISHIGAMI, T., HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.38, p.717-720, 1990.
- HAY, R.K.M., SVOBODA, K.P. Botany. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. ed. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production.** Avon: Longman Group, p.5-22, 1993.
- HERZ, W., de GROOTE, A., MURARI, R., KUMAR, N. Sesquiterpene lactones of *Eupatorium serotinum*. **J. Org. Chem.**, v.44, p.2784-2788, 1979.
- HERTWING, V.I.F. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem e comercialização.** São Paulo, SP: Ícone, 1986. 441p.

- HORTON, E.W. & FELIPPE, G.M. An acetylcholine-like substance in *Porophyllum lanceolatum*. **Biologia plantarum**, v.15, n.2, p.150-151, 1973.
- KAY, S.J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York. An. Avi. Book, 1991. 532 p.
- KLEING, H. The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. **Annual Review of Plant Molecular Biology**, v.40, p.39-59, 1989.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1986. 319p.
- LEDESMA, N.R. Mapa fenológico del trigo em la Republica Argentina. **Meteoros**, v.1-2, p.50-64, 1952.
- LANGENHEIM, J.H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemistry Ecology**, v.20, n.6, p.1223-1269, 1994.
- LOCOCK, R.A., BEAL, J.L., DOSKOTCH, R.W. Alkaloid constituents of *Epatarium serotinum*. **Lloydia**, v.29, p.201-205, 1966.
- LOPES, R.C. **Caracterização isozimática, divergência genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell.** Viçosa – MG: UFV, 1997. 91p. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- LOZOYA, M.M. & GASPAR, I. Phototoxic effect of methanolic extracts from *Porophyllum macrocephalum* and *Tagetes erecta*. **Fitoterapia**, v.64, n.1, p.35-41, 1993.
- MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G., coord. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: EDUSP, v.1, p.333-350, 1985.
- MANCINI, B. Influência do tempo de destilação na composição quali e quantitativa de óleos essenciais. I.- essência de hortelã do Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.6, p.1-7, 1984.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1987. 374p.
- MARQUESINI, N.R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Pará e Santa Catarina, Sul do Brasil. Família Asteraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. **Anais ...** SC: UFSC, 1996.
- MARSTON, A., HOSTEFFMANN, K. Plant Molluscides Review. **Phytochemistry**, v.24, p.639-652, 1985.
- MARTINS, E.R. **Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** Viçosa – MG: UFV, 1996. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1996. 220p.

- MARWAN, A.G., NAGEL, C.W. Microbial inhibitors of cranberries. **J. Food Sci.**, v.51, p.1009-1013, 1986.
- MATOS, M.B. **Plantas medicinais: aspectos agronômicos**. Brasília, DF: 1996. 51p.
- MECKES-LOZOYA, M. & GASPAR, L. Phototoxic effect of methanolic extracts from *Porophyllum macrocephalum* and *Tagetes erecta*. **Fitoterapia**, v.64, n.1, p.35-41, 1993.
- MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. UFSC, 1999. 821p.
- MEYER, M.W. & KARASOV, W.H. Chemical aspects of herbivory in arid and semiarid habitats. In: Palo, R.T. and Robbins, C.T. (eds.). **Plants Defenses Against Mammalian Herbivory**. Boca Raton: CRC Press, p.167-187, 1991.
- MONTEIRO, W.R. **Estruturas secretoras da folha de *Porophyllum lanceolatum* DC (Asteraceae): estudos morfológicos, histoquímicos e ultra-estruturais**. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de livre-docente em botânica. São Paulo, 1986.
- MOSER, M.B. Serie: From conception through infancy. **Ibdi.**, v.35, p.201-210, 1970.
- MING, L.C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Hort. Bras.**, v.12, p.3-9, 1994.
- MING, L.C., FIGUEIREDO, R.O., MACHADO, S.R., ANDRADE, R.C.M. Yield of essential oil and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citrates* (DC) Stapf). Poaceae. **Acta Horticulturae**, v.246, p.555-559, 1996.
- MUNZ, P.A. & KECK, D.D. **A California flora**. University of California Press, Berkeley, 1973.
- NETO, M.A., CUNHA, A.N., SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Porophyllum ruderale* Cass. **J.Essent. Oil Res.**, v.6, p.451-417, 1994.
- OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v.24, p.639-652, 1985.
- OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Médica**, v.55, p.117-122, 1989.
- OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v.32, p.507-521, 1993.
- OLIVEIRA, J.R. de. **Idade da folha e suscetibilidade do cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e a *P. syringae* pv *garcae***. Viçosa, MG: UFV, 1988. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.

- OOSHIMA, T., MINAMI, T., AONO, W., IZUMATANI, A., SOBUE, S., FIJIWARA, T., KAWABATA, S., HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v.27, p.124-129, 1993.
- PATITUCCI, M.L., VEIGA JR, V.F., PINTO, A.C. et al. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos vegetais. **Química Nova**, São Paulo, v.18, n.3, p.262-266, 1995.
- PEREIRA, A.M.S., BERTONI, B.W., PAGOTO, L.A.Z., FRANÇA, S.C., Influência de período e condições de armazenamento no teor de fenóis totais em *Maytenus aquifolium*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 1996, p.32.
- PICCOLO, A.L.G. & GREGOLIM, M.I. Fenologia de *Melia azedarach* L. no Sul do Brasil. **Turrialba**, v.30, n.1, p.107-109, 1980.
- POZO, L.A. **Estudo “in vitro” do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais sobre *Clostridium difficile***. Viçosa: UFV, 1997. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PRIE, M.L., BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.**, v.25, p.1268-1273, 1977.
- ROBBINS, N.S., PHARR, D.M. Leaf area prediction models for cucumber from linear measurements. **Hortscience**, v.22, p.1264-1266, 1987.
- RODRIGUEZ, E. & MABRY, T.J. **Tagetae chemical review**. In: The biology and chemistry of the Compositae. Heywood, C.V.H., HARBORNE, J.B. & TURNER, B.L., eds. Academic Press. London, p.785-797, 1977.
- RUDLOFF, E.V. Gas-liquid chromatography of terpenes. In: GIDDINGS, J.C., KELLER, R.A. (Eds.). **Advances in Chromatography**. New York: Marcell Dekker, Inc., v.10, p.173-229, 1974.
- SÁ, M.F.A. **Estudo anatômico e ensaios fitoquímicos de *Baccharis myriocephala* D.L. carqueja**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1992. 91p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1992.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico de origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTS, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS Ed. UFSC, 1999. 821p.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.
- SCHEFFER, M.C. Conservação, manejo e legislação da extração de plantas medicinais: é possível fazer manejo de plantas medicinais. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATU, 2, Botucatu, 1996. **Anais...** Botucatu: UNESP, 1996, p.12-16.

- SCHUMAU, G., KUBECZKA, K.H. The influence of isolation conditions on the composition of essential oil containing linalool and linalyl acetate. In: BAERHEIM S.A., SCHEFFER, J.J.C. **Essential oil and aromatic plants**. Dordrecht: Nijhoff / Dr. Junk. p.127-134, 1985.
- SEIGLER, D.S., SEILHEIMER, S., KEESY, J., HUANG, H.F. Tannins from four common *Acacia* species of Texas and southern Mexico. **Econ. Botany**, v.40, p.220-232, 1986.
- SILVA, S.A.R., ARAÚJO, L.C.L., AKISUE, M.K. Estudo das atividades farmacológicas (antiinflamatória e antiulcerogênica) e determinação da toxicidade aguda do extrato bruto hidroalcoólico de *Porophyllum ruderale* (JACQ.) Cassini. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. **Anais ... SC: UFSC**, 1996.
- SILVA, F., CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleo essencial**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2000. 153p.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 451p.
- SIMÕES, C.M.O., SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: Farmacognosia da planta ao medicamento. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTS, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS Ed. UFSC, 1999. 821p.
- SOUZA, A. de. **Avaliação agroclimática para o manejo da cultura do arroz, para as microrregiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba**. Viçosa, MG: UFV, 1989. 91 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1989.
- SKRUBIS, B.G. The drying of laurel leaves. **Perfumer & Flavorist**, v.7, n.5, p.37-40, 1982.
- SWAIN, T. 1979. Phenolics in the environment. p.624-637. In: T-Swain, J.B. Harbone and C.F. Van Sumere (ed.). **Recent Advances in Phytochemistry**. v.12. Plenum Press, N.Y.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. In: **Plant Physiology**, Redwood City: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., 1991, p.318-345.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, 1998. 792p.
- THOMÉ, V.M.R. Crescimento, desenvolvimento e rendimento de grãos de uma cultivar de feijoeiro de hábito de crescimento arbustivo determinado, em função da época de semeadura, espaçamento entre linhas e densidade de plantas. Porto Alegre: UFRS, 1985. 139p.

- TOWERS, G.H.N., WAT, C.K., GRAHAM, E.A. BANDONI, R.J., CHAN, G.F.Q., MITCHELL, J.C., LAM, J. **Lloydia**, v.40, p.487, 1977.
- VERLET, N. Essential oils: supply, demand and price determination. **Acta Horticulturae**, v.344, p.9-16, 1993.
- ZECHINI D'AULERIO, A., ZAMBONELLI, A., BIANCHI, A., et al. Micromorphological and chemical investigation into the effects of fungal diseases on *Melissa officinalis* L., *Mentha x Piperita* L. and *Salvia officinalis* L. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.143, p.179-183, 1995.
- ZHU, M., PHILLIPSON, J.D., GREENGRASS, P.M., BOWERY, N.E., CAI, Y. Plant polyphenols: biologically active compounds or non selective binders to protein. **Phytochemistry**, v.44, n.3, p.441-447, 1997.
- ZUCKER, W.V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, v.121, n.3, p.335-365, 1983.
- WAAGE, S.K., HEDIN, P.A., GRIMLEY, E. A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. **Phytochemistry**, v.23, p.2785-2787, 1984.
- WAGNER, H., IYENGAR, M.A., DÜLL, P., HERZ, W. Flavone o-und c-glykoside in *Eupatorium serotinum*. **Phytochemistry**, v.11, n.4, p.1506, 1972.
- WATERMAN, P.G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman Group, 1993, p. 47-61.
- WEYERSTHAL, P., MARSCHAL, H., MANTEUFFEL, E. Volatile constituents of *Agastache rugosa*. **Journal of Essential Oil Research**, v.4, n.6, p.585-587, 1992.
- World Health Organization**, Quality Control Methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO/Pharm/92.559, 1992, p.35.

APÊNDICE

1 – Modo de preparo dos reagentes utilizados na análise do rendimento de tanino em *Porophyllum rurerale*:

- a) Folin-Denis: foram adicionados em 75 ml de água, 10g de tungstato de sódio, 2g de ácido fosfomolibídico e 5 ml de ácido fosfórico. A mistura foi refluxada por duas horas, e, após resfriamento à temperatura ambiente, completou-se o volume para 100 ml;
- b) Solução saturada de carbonato de sódio: adicionaram-se 35 g de Na_2CO_3 anidro em 100 ml de água destilada, dissolvido a 70-80°C. Deixou-se resfriar por toda a noite e, então, a solução saturada com cristais de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ foi filtrada;
- c) Solução padrão de ácido tânico: foram dissolvidos 25 mg de ácido tânico em 250 ml de água destilada. Em cada determinação da curva-padrão preparou-se solução-padrão de ácido tânico fresca.

2 - Clima

O clima de Viçosa, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwa, com umidade relativa média do ar de 80%, temperatura média anual de 21 °C e precipitação anual média de 1341mm.

As características do clima nestes períodos se encontram na tabela abaixo:

Tabela 1 - Características do clima de Viçosa no período de Junho a Outubro de 2000 e Fevereiro a Maio de 2001.

Mês	Temperatura (°C)			P T (mm)	U R (%)	E T (mm)	I M (horas)
	Mínima	Média	Máxima				
Junho	10,620	16,179	24,790	0,480	87,200	2,727	8,107
Julho	11,363	15,669	22,653	0,453	86,967	2,503	5,426
Agosto	11,387	17,612	25,597	0,637	84,608	4,071	6,590
Setembro	15,503	18,941	24,393	2,763	87,583	2,753	4,367
Outubro	17,050	22,432	29,810	2,223	73,567	4,390	6,229
Fevereiro	19,518	10,389	32,425	1,664	73,866	4,275	8,175
Março	18,226	9,666	30,106	4,748	80,419	3,155	7,297
Abril	16,950	9,362	29,860	1,120	77,650	3,197	8,610
Maio	14,933	20,567	25,553	1,600	76,667	4,600	11,200

PT – Precipitação Total, UR – Umidade Relativa, ET – Evaporação Total, IM – Insolação Média.

3 - Solo

O solo do primeiro experimento foi analisado no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Os resultados do solo do final do experimento estão apresentados no quadro abaixo.

Quadro 1 - Análise química do solo

pH H ₂ O	P	K	Na	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H + Al
7,5	37,6	209	-	6,46	0,78	0,00	0,00

P e K – extrator Melich 1;

Ca, Mg e Al – extrator KCl 1 mol/L;

H + AL – extrator acetato de cálcio 0,5 mol/L – pH 7,0.

Análise realizada pelo laboratório de Análises Químicas do Solo, do Departamento de Solos da UFV.

4 – Análises de variância

Tabela 2 - Resumo da análise de variância das variáveis: altura (ALT), número de folhas (NF) e número de nós (NN) em *Porophyllum ruderale*, no período de 23 de Março a 22 de Maio de 2001.

FV	GL	Quadrados médios		
		ALT	NF	NN
Blocos	2	3,875	0,398	4,047
Épocas	4	190,321**	27,742**	11,811**
Resíduo	8	13,242	1378,674	0,704
CV (%)		4,087	15,49	7,052

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância do conteúdo de óleo essencial em *Porophyllum ruderale*, no primeiro experimento realizado de Junho a Outubro de 2000.

FV	GL	Quadrados médios
Horários	2	98,286*
Blocos	6	36,936
Resíduo	12	18,508
CV%	35,0	

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância do conteúdo de óleo essencial em *Porophyllum ruderale*, no segundo experimento realizado de Fevereiro a Maio de 2001.

FV	GL	Quadrados médios
Épocas	4	1104,825**
Blocos	2	17,668
Resíduo	8	21,910
CV%	17,218	

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância dos dados de tanino em relação aos horários de colheita (primeiro experimento), no ensaio realizado em *Porophyllum ruderale*, no período de Junho a Outubro de 2000.

FV	GL	Quadrado médio
Blocos	6	1,087
Horário de colheita	2	5,108**
Resíduo	12	0,652
CV%	16,065	

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância dos dados de tanino em relação às épocas de colheita (segundo experimento) no ensaio realizado em *Porophyllum ruderale*, no período de Fevereiro a Maio de 2001.

FV	GL	Quadrado médio
Blocos	2	0,066
Épocas de colheita	4	1,025*
Resíduo	8	0,252
CV%	17,819	

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.