

NAIR BIZÃO

**INTERAÇÃO GENÓTIPO x AMBIENTE, CARACTERIZAÇÃO
ISOENZIMÁTICA, DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA EM *Eclipta*
alba (L.) HASSK**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

Ao Reino Vegetal, pela fabulosa diversidade de metabólitos especiais, possibilitando a fantástica oportunidade de realização de pesquisas e amplo uso na terapêutica.

OFEREÇO.

À Vitória, minha filha e ao Devanir , meu esposo, sempre meus companheiros, com muito amor e carinho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pelas graças concedidas para o meu crescimento profissional e pela presença constante.
- À Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Mato Grosso pela oportunidade de realizar o curso.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PICDT) pela concessão da bolsa de estudo.
- Ao professor Vicente Wagner Dias Casali, pela orientação profissional, pelas críticas e principalmente pelos conselhos no exercício com plantas medicinais.
- À minha mãe, irmãs, irmão e demais entes queridos pela confiança e participação nesta etapa da minha vida.
- À professora Suzilei de Castro França por permitir a realização das análises fitoquímicas na unidade de Biotecnologia (Laboratório de Química de Produtos Naturais) da UNAERP.
- Ao professor Paulo Sérgio Pereira (UNAERP) que não poupou esforços para que análises fitoquímicas dos experimentos fossem viabilizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais e pelos valiosos ensinamentos.
- Ao técnico de laboratório Francisco Ribeiro pela participação no árduo trabalho de confecção dos géis de isoenzimas.
- Aos professores Fernando Luiz Finger, Paulo Roberto Cecon pelas valiosas sugestões.
- Ao professor e amigo Antônio Jacinto Demuner pelas excelentes sugestões sobre quimiotaxonomia e pela confecção das estruturas químicas dos princípios ativos desta tese.

- Ao meu esposo Devanir Mitsuyuki Murakami pela ajuda nas análises estatísticas dos dados, apoio e compreensão em todos os momentos.
- Ao amigo Lucas pelo auxílio em algumas análises estatísticas e pela amizade.
- A todos os amigos do grupo Entre Folhas pela amizade, convivência e crescimento emocional.
- Ao senhor Vicente Rosado e Seu Quim-Quim, pela valiosa colaboração na condução de trabalhos de campo.
- À todos os colegas da UNAERP: Ana Maria, Bianca, Ana Helena, Ronaldo, Ademar, Saulo, em especial à Luciana pela imensa colaboração nas análises fitoquímicas.
- Ao professor Acelino Couto Alfenas pela amizade e disposição em ajudar.
- Aos professores Wagner Otoni, Luís Orlando de Oliveira e Cláudio Brukner por participarem do meu exame de qualificação e despertando-me para os assuntos como: cultura de tecido, conservação de recursos genéticos e mutação aplicados às plantas medicinais.
- Aos professores Maria de Fátima Coelho e Rodrigo da Universidade Federal de Mato Grosso (FAMEV) pela amizade e incentivo.
- Ao José Emílio Zanzirolani de Oliveira pelo constante incentivo e companherismo.
- À Reginalda Célia Lopes pelo auxílio na formatação final do texto.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho, e que não foram relacionados. A todos serei sempre grata.

BIOGRAFIA

NAIR BIZÃO, filha de Alexandre Bizão Sobrinho e Ursolina Zago Bizão, nasceu em 11 de novembro de 1957, em Sacramento Minas Gerais. Graduiu-se no curso de Ciências e Habilitação Plena em Biologia, na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras Barão de Mauá, Ribeirão Preto – SP, em 1982.

Em 1989, graduou-se no Curso de Farmácia na Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO. Em 1992, iniciou o curso de Mestrado na área de Genética e Melhoramento de Plantas, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Jaboticabal – SP.

Em 1998, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa. Professora da Universidade Federal de Mato Grosso (Departamento de Biologia - Campus de Pontal do Araguaia) desde 1989.

INDÍCE

RESUMO	página vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA, DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE OITO ACESSOS DE <i>Eclipta alba</i> (L.) HASSK	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. HISTÓRICO	3
2.2. A PLANTA <i>Eclipta alba</i> (L.) HASSK	5
2.2.1. SINONÍMIA	5
2.2.2. ORIGEM E CITOGENÉTICA	6
2.2.3. DESCRIÇÃO	6
2.3. FITOTERAPIA	8
2.4. ISOENZIMAS	10
2.4.1 ASPECTOS GERAIS E INTERPRETAÇÃO DE ZIMOGRAMAS	10
2.4.2 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS E IMPORTÂNCIA COMO MARCADORES	14
2.4.3 UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS EM PLANTAS MEDICINAIS	16
2.4.4. VARIABILIDADE GENÉTICA	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. SISTEMAS ISOENZIMÁTICOS E TAMPÕES, ÓRGÃOS E ESTÁDIOS ONTOGENÉTICOS	21
3.2. AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS	22
3.3. PREPARO DO GEL	22
3.4. APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS E ELETROFORESE	23

3.5. FATIAMENTO, COLORAÇÃO, FIXAÇÃO E SECAGEM DOS GÉIS	24
3.6. LEITURA DOS ZIMOGRAMAS E DOCUMENTAÇÃO DOS RESULTADOS	25
3.7. ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR PADRÕES DE BANDAS ISOENZIMÁTICAS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS	26
4.1.1 FOSFOGLUCOMUTASE (PGM)	30
4.1.2 CHIQUIMATO DESIDROGENASE (SKDH)	30
4.1.3 FOSFOGLUCOSE ISOMERASE (PGI)	30
4.1.4. MALATO DESIDROGENASE (MDH)	35
4.1.5. ESTERASE	37
4.2. ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR PADRÕES ISOENZIMÁTICOS	39
5. RESUMO E CONCLUSÕES	42
 CAPITULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE OITO ACESSOS DE <i>Eclipta alba</i> (L.) HASSK	 44
1. INTRODUÇÃO	44
2. REVISÃO DE LITERATURA	46
2.1. VARIABILIDADE QUÍMICA EM PLANTAS MEDICINAIS	46
2.2. A NECESSIDADE DE CARACTERIZAÇÃO	48
2.3. PLANTAS MEDICINAIS POLIPLÓIDES	52
2.4. PLANTAS MEDICINAIS HÍBRIDAS	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO	55
3.2. CARACTERES AVALIADOS E PROCEDIMENTOS NA COLETA DE DADOS	56
3.3 METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COUMESTANOS: DEMETILWEDELOLACTONA E WEDELOLACTONA	57
3.4. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICOS	60
4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICOS	62
4.2.1. ANÁLISES DE REGRESSÃO	62
4.3. CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICOS	67
4.4. ACÚMULO DOS COUMESTANOS POR ÓRGÃO	71
5. RESUMO E CONCLUSÕES	74
 CAPITULO 3. INTERAÇÃO GENÓTIPO x AMBIENTE E PLASTICIDADE FENOTÍPICA DE CARACTERES MORFOMÉTRICOS E QUÍMICOS EM TRÊS GENÓTIPOS DE <i>Eclipta alba</i> (L.) HASSK .	 76
1. INTRODUÇÃO	76
2. REVISÃO DE LITERATURA	78
2.1. METABOLISMO SECUNDÁRIO	78
2.2. FLAVONÓIDES E SUA IMPORTÂNCIA	79

2.3. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES EDÁFICAS SOBRE OS PRINCÍPIOS ATIVOS	82
2.4. EFEITO DA IRRADIÂNCIA NOS CARACTERES VEGETATIVOS E FITOQUÍMICOS EM PLANTAS MEDICINAIS	82
2.5. PLASTICIDADE FENOTÍPICA	84
2.5.1. CARACTERÍSTICAS PLÁSTICAS MORFOLÓGICAS E QUÍMICAS	85
2.5.2. MEDIDAS DE PLASTICIDADE	86
3. MATERIAL E MÉTODOS	88
3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS	88
3.2. MULTIPLICAÇÃO DAS PLANTAS	89
3.3 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	89
3.4 CARACTERES AVALIADOS E COLETA DOS DADOS	90
3.4.1. CARACTERES MORFOMÉTRICOS	90
3.4.2. CARACTERES FITOQUÍMICOS	91
3.4.2.1. METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS E SUA QUANTIFICAÇÃO	91
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	92
3.5.1. ANÁLISES DE VARIÂNCIA DA INTERAÇÃO GENÓTIPO x AMBIENTE	92
3.5.2. ANÁLISES DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA	93
3.5.2.1. ESTIMADORES DA PLASTICIDADE	94
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1. ANÁLISE QUÍMICA DOS SUBSTRATOS	95
4.2. ANÁLISES DA INTERAÇÃO GENÓTIPO x AMBIENTE	96
4.2.1. EFEITOS PRINCIPAIS	96
4.2.2. ANÁLISES DAS INTERAÇÕES	100
4.2.2.1. NÚMERO DE FOLHAS (NF)	100
4.2.2.2. PESO DA MATÉRIA FRESCA DA PARTE AÉREA (PMFA)	101
4.2.2.3. PESO DA MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA (PMFA)	103
4.2.2.4 PESO DA MATÉRIA FRESCA DA RAIZ (PMFR).....	103
4.2.2.5. PESO DA MATÉRIA SECA DA RAIZ (PMSR)	103
4.2.2.6. PESO DA MATÉRIA FRESCA TOTAL (PMFTo)	105
4.2.2.7. PESO DA MATÉRIA SECA TOTAL (PMSTo)	105
4.2.2.8. CONTEÚDO DE DEMETILWEDELOLACTONA NA RAIZ (DWR)	107
4.2.2.9. CONTEÚDO DE DEMETILWEDELOLACTONA NA PARTE AÉREA (DWA)	108
4.2.2.10. CONTEÚDO DE WEDELOLACTONA NA PARTE AÉREA (WA)	109
4.3. PLASTICIDADE FENOTÍPICA	111
5 RESUMO E CONCLUSÕES	117
CONCLUSÕES GERAIS	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
APÊNDICE	143

RESUMO

BIZÃO, Nair, D.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2002. **Interação genótipo x ambiente, caracterização isoenzimática, diversidade genética e química em *Eclipta alba* (L.) Hassk.** Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Conselheiros: Fernando Luiz Finger e Paulo Roberto Cecon.

Oito acessos de *Eclipta alba*, foram estudados quanto aos padrões isoenzimáticos, caracteres morfométricos e quantificação dos coumestanos demetilwedelolactona e wedelolactona. Nas plantas dos acessos estudados detectou-se polimorfismo para os sistemas esterase (EST), fosfoglucoisomerase (PGI), malato desidrogenase (MDH), fosfoglucomutase (PGM), sendo o sistema esterase o mais polimórfico. Utilizando-se da matriz de dissimilaridade obtida pelo complemento Aritmético do Índice de Similaridade de Jaccard, agruparam-se os indivíduos pelo Método de Otimização de Tócher e formaram-se quatro grupos. Nos acessos AFR e CEM houve superioridade na maioria dos caracteres morfométricos, destacando-se número de capítulo por axila com média de 4,40 e nos demais acessos com média 2,0. Invertendo a situação os dois acessos produziram o menor teor de wedelolactona nas folhas e capítulos florais, com média de 0,6510 mg/g de matéria seca foliar, enquanto nos outros seis acessos detectou-se 4,6906 mg/g da matéria seca. Nos capítulos florais, a média foi de 0,3282 mg de wedelolactona/g de matéria seca nos acessos AFR e CEM e de 2,3959 mg/g de matéria seca nos demais. Os caracteres morfométricos, bioquímicos e químicos diferenciais entre os acessos permitiram o estabelecimento de duas variedades taxonômicas. Utilizando três genótipos caracterizados pelo sistema esterase, estudou-se a interação genótipo x ambiente e a plasticidade fenotípica de caracteres morfométricos e das substâncias fitofarmacêuticas, visando o conhecimento dos fatores

ambientais e genéticos que influenciam na produção desta espécie como medicinal. Os três genótipos foram cultivados em quatro ambientes, constituídos pela combinação de dois tratamentos de adubação (sem adubação e com adubação orgânica – humus de minhoca) e dois ambientes (casa-de-vegetação, com sombrite 30% e em ambiente, a pleno sol). No estudo da interação genótipo-ambiente foi possível eleger o genótipo C como o mais produtivo, de demetilwedelolactona na raiz, e o genótipo A como o mais produtivo de wedelolactona na parte aérea; e ambos devem ser cultivados no substrato com ausência de humus de minhoca e a pleno sol. No estudo da plasticidade fenotípica, nos caracteres morfométricos relacionados com a produção de biomassa detectaram-se os maiores valores nos três genótipos, enquanto que os caracteres fitoquímicos foram menos influenciados pelo ambiente, apresentando os menores valores de plasticidade.

ABSTRACT

BIZÃO, Nair, D.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2002. **Interaction between genotype and environment, isozimatic characterization, diversity genetic and chemical in *Eclipta alba*.** Advisor: Vicente Wagner Dias Casali. Committee members: Fernando Luiz Finger and Paulo Roberto Cecon.

Eight accessions of *Eclipta alba* were studied the patterns concerning isozimatic, characteres morphometric and quantification of isoflavonoids demethylwedelolactone and wedelolactone. The plants of acessions studied presented polymorphism in systems esterase (EST), phosphoglucoisomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM), malate dehydrogenase (MDH), nevertheless the system esterase was more polymorphic. Using the dissimilarity matrix obtained by Jaccard Arithmmetics Complement of similarity Index, the individuals were put into four groups by Tocher's Optimization Method. Whatever characteres morphometric in acessions AFR and CEM detected superiority between whole acessions, detaching number of capitula by armpit with average of 4.40 and others acessions with average 2.0. Reversing the situation the two accession producted the minor content of wedelolactone in leafs and capitulas with average of 0.6510 mg/g dry weight, while others six acessions detected 4.6906 mg/g of dry weigth. In capitula the average were of 0.3282 mg/g dry weight in acessions AFR and CEM and 2.3959 in the others. The differentiated morphometric, biochemical and phytopharmaceutical characteres between the acessions enabled the establishment of two taxonomic varieties. Using three genotypes appropriatement characterized through system esterase studied the interaction between genotypes and environment and the phenotypic plasticity characteres morphometric and of chemical substance, directing the knowledge of the factor environmental and genetics that

influence in the production of this species as medicinal plant. The three genotypes were grown in four environments, constituted by combination of two treatments fertilizer (without fertilization, with organic fertilization- eartworm humus) and were utilized two environments (in greenhouse, with 30% of shading and absolute sun, in environment). In the interaction between genotypes and environment was possible to elect the genotypes C how the most productive of demethylwedelolactone in root and the genotype A how the most productive of wedelolactone in the aerial part, and both need to be cultivated in substrate without eartworm humus and absolute sun. The study of phenotypic plasticity the morphometric characteres which related with the biomass production showed the greastest values of plasticity in the three genotypes, while in phytochemical characteres were less influenciend by environment showing (presented) minores values of plasticity.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, buscam-se nas espécies vegetais novas fontes de medicamentos naturais, para atender às necessidades do bem-estar da população. Nessa busca desperta-se o interesse por pesquisas em plantas medicinais. Ao colhermos uma planta medicinal devemos estar cientes de que fatores de ordem genética, ambiental e técnica influenciam na síntese de princípios ativos, podendo ocorrer variações tanto na qualidade como na quantidade dos complexos químicos. Dentro desse tema, foi realizado esta pesquisa com *Eclipta alba* (L.) Hassk, visando conhecer a variabilidade genética, utilizando-se de isoenzimas, e a variabilidade química, quantificando-se dois coumestamos, wedelolactona e demetilwedelolactona, com propriedades anti-ofídica, anti-inflamatória, imunoestimulante e hepatoprotetora comprovadas.

Também estudou-se o efeito ambiental na produção dos dois fitofármacos através do estudo de interação genótipo x ambiente e plasticidade fenotípica de *Eclipta alba* (H.) Hassk. Três genótipos que foram multiplicados assexuadamente e cultivados em quatro ambientes, constituídos pela combinação de dois níveis de adubação (solo e solo mais humus de minhoca) e duas condições de ambiente (casa de vegetação com sombrite 30% e a pleno sol).

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA, DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE OITO ACESSOS DE *Eclipta alba* (L.) HASSK

1. INTRODUÇÃO

A planta de *Eclipta alba* (L.) Hassk é herbácea invasora sob o ponto de vista agrônômico, porém medicinal sob o ponto de vista fitoterapêutico. Popularmente, é conhecida como erva-botão, hoje presente nos cinco continentes e, amplamente, dispersa em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Há séculos é utilizada na medicina tradicional indiana e chinesa, para a cura de várias doenças. Os jesuítas aprenderam a usá-la, com os indígenas brasileiros, contra males do fígado, problemas de pele e, preventivamente, contra picadas de cobra. A partir de 1980, os trabalhos científicos com *Eclipta alba* (L.) Hassk intensificaram-se e muitos princípios ativos da planta, isolados confirmaram várias propriedades medicinais.

Em espécies com versatilidade ambiental, como *Eclipta alba* (L.) Hassk, a variabilidade genética é de suma importância no processo de adaptação e sobrevivência, enquanto, sob o ponto de vista evolucionário, a presença de isoenzimas indica a existência de variabilidade genética quanto à capacidade adaptativa.

São objetivos deste trabalho:

- 1) identificar e caracterizar a variabilidade isoenzimática e fitoquímica de oito acessos;

- 2) estimar a divergência genética entre os indivíduos, por meio de padrões isoenzimáticos, formar grupos de padrões similares e relacioná-los com aspectos fitoquímicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

A arte de cura pelas plantas é muito antiga. Os povos de épocas mais distantes tinham vastos conhecimentos sobre as ervas medicinais, cultivavam muitas delas e se orgulhavam desse conhecimento, passando-o de geração a geração. Com o surgimento dos grandes laboratórios de química, colocando os constituintes da planta puros à disposição do público e, mais tarde, sintetizando-os, houve abandono da medicina vegetal, fato este que não ocorreu no Japão, China e Índia.

O alto custo dos medicamentos alopáticos, associado ao rico potencial medicinal da flora brasileira, fez com que as plantas medicinais passassem a ser cogitadas, novamente, como recurso terapêutico viável. A Organização Mundial de Saúde, durante a 31^a assembléia, recomendou aos países membros que desenvolvessem pesquisas visando à utilização da flora nacional com propósito terapêutico. Atendendo a esse apelo, o Ministério da Saúde do Brasil implementou as Diretrizes e Prioridades de Investigação em Saúde (Portaria no 212, de 11/09/81), que incluem o estudo de plantas medicinais. Em 1988, a Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN) implantou a fitoterapia nos serviços de saúde pública, como prática oficial da medicina (SCHEFFER, 1991).

Há correlação entre o uso de plantas na medicina tradicional e as drogas delas obtidas posteriormente. Existem, em todo o mundo, 119 substâncias químicas derivadas de plantas que podem ser consideradas como drogas de uso importante.

Destas, 74% foram descobertas a partir de estudos químicos, fundamentados no uso da erva em medicina tradicional (FARNSWORTH *et al.*, 1985).

Houve exploração e exportação de plantas medicinais brasileiras, em épocas mais remotas, sendo que poucas foram cultivadas no Brasil, mesmo em pequena escala. Algumas estão sob ameaça de desaparecimento, como o jaborandi, o pau-rosa e, por esta razão, no ano de 2000 foi proibida a exportação da ipeca. Várias plantas têm seus princípios ativos patenteados por estrangeiros, como o ipê-roxo e a espinheira-santa que estão hoje sob domínio dos japoneses.

No Brasil, segmentos do governo (universidades, hospitais públicos, centros de pesquisa) e de iniciativa privada estão atentos à potencialidade dos recursos vegetais como fonte de produtos da indústria farmacêutica.

ARRUDA (1992), em levantamento bibliográfico sobre plantas medicinais usadas contra picada de cobras, enumera 82 espécies, sendo que poucas têm seu efeito antiofídico comprovado. *Eclipta alba*, hoje estudada na UFRJ, tem atividade antiofídica, reduzindo a ação miotóxica. Os acidentes com serpentes peçonhentas, no Brasil, são responsáveis por mais de 20.000 ocorrências e 100 óbitos por ano (JORGE e RIBEIRO, 1990). No Brasil, o soro antiofídico usado contra o envenenamento por cobras é produzido no Instituto Butantã desde 1899. No entanto, este processo é caro, demorado, cruel, complexo e, além disso, ocorre distante daquela região onde se encontram as cobras e os prováveis usuários. Na obtenção do atual soro antiofídico, é preciso inocular pequenas e periódicas doses de veneno de cobra em cavalos, que desenvolverão imunidade. Esses animais têm sua vida média reduzida a 4 anos e 20% deles podem morrer envenenados.

Paralelamente ao tratamento com o soro antiofídico produzido pelo Instituto Butantã, em São Paulo, ao longo do tempo está o uso das plantas. As referências de plantas usadas contra picada de cobra caracterizam-se pelo empirismo e poucos pesquisadores creem na possibilidade de algum extrato vegetal ser antiofídico, inclusive nos rebanhos, apesar da longa tradição popular.

2.2. A planta *Eclipta alba* (L.) Hassk.

Eclipta do grego “ekleipein” significa faltar, ser deficiente (o capítulo floral apresenta os flósculos centrais de cor verde-escuro, e as periféricas brancas, tendo isso servido, de comparação com o disco solar, quando eclipsado pela lua). Já alba é adjetivo latino, que significa alva: pela coloração das flores.

Segundo os autores PIO CORREA (1969), KISMAN e GROTH (1995) e LORENZI (2000), é conhecida pelos seguintes nomes populares: (1) erva-botão, (2) agrião-do-brejo, (3) pimenta-d’água, (4) suricuína, (5) tangaracá, (6) ervanaço, (7) cravo-bravo, (8) erva-lanceta, (9) lanceta, (10) sucurima, (11) quebra-pedra, (12) coacica e (13) coatiá.

2.2.1. Sinonímia

PIO CORREA (1969) cita, como sinonímia, os nomes científicos: (1) *Eclipta erecta* L., (2) *Cotula alba* L., (3) *C. prostata* L., (4) *Eclipta alba* (L.) Hassk., (5) *E. brachypoda* Michx., (5) *E. longifolia* DC., (7) *E. parviflora* DC., (8) *E. procumbens* Michx., (9) *E. prostata* L., (10) *E. thermalis* DC., (10) *E. zippeliana* DC., (11) *Micrelium asteroides* Forsk., (12) *M. tolak* Forsk., (13) *Verbesina alba* L., (14) *V. conyzoides* Trew., (15) *V. prostata* L. KISMAN e GROTH (1995) aceitam, como sinônimo as denominações 1, 3, 4, 13 e 15; enquanto, LORENZI (2000), aceita 1, 4, 9, 13 e 14, além de alguns sinônimos como: *Eclipta punctata* Jacq., *E. marginata* Boiss, *E. thermalis* Bunge, *Galinsonga oblonga* DC, *Polygyne inconspicua* Phil., *Wedelia psammophyla* Poep., *Wiborgia oblongifolia* Hook.

Pelas regras de nomenclatura atuais, que reconhecem como legítimo o primeiro nome (desde que atenda a certos critérios), esta planta seria *Eclipta prostata* (L.) L., nome que lhe foi dado em 1771, e não *Eclipta alba* (L.) Hassk., dado em 1848. Entretanto, o “International Code of Botanic Nomenclature”, Utrecht 1972, manteve o nome *Eclipta alba* (KISMAN e GROTH, 1995).

2.2.2. Origem e citogenética

Segundo KISMAN e GROTH (1995), a planta é originária da Ásia, estando presente nos cinco continentes e, amplamente, dispersada pelas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, pode ser encontrada em quase todo o território, excetuando-se as regiões com invernos rigorosos, sendo muito frequente nas áreas úmidas do Norte e Nordeste.

Pertence à família das Asteraceae, tribo Heliantheae. Conforme TRIVEDI e RAJESH (1984) o número de cromossomos, nesta espécie, é $2n = 22$, não tendo sido encontrados poliplóides.

2.2.3. Descrição

Segundo KISMAN e GROTH (1995), *Eclipta alba* (L.) Hassk é anual ou perene, dependendo das condições ambientais. Reproduz-se por semente, e tem crescimento muito rápido, podendo florescer com 4 – 6 semanas, frutificar entre 100 e 120 dias após a emergência. Nas sementes, geralmente, não há dormência inicial. Prefere o clima quente e úmido; após a fase juvenil, cresce bem em áreas permanentemente inundadas, com lâmina de água de pequena profundidade. As plantas jovens, todavia, não suportam esta condição. *Eclipta alba* (L.) Hassk tolera condições de temperatura mais amena e solos mais secos, suportando, inclusive solos salinos. Em áreas salinas sendo as outras condições adequadas, a planta tende a dominar o terreno. É ereta, subereta ou prostrada, raramente ultrapassando 60 cm de altura (Figura 1). O hábito de crescimento modifica-se conforme o ambiente, ou seja, solo inundado ou solo seco. O caule é sublenhoso na base e levemente carnoso nas porções mais novas, intensamente ramificado desde a base, os ramos em contato com o solo úmido tendem a ser radicantes a partir dos nós. Os ramos são cilíndricos, ocos, de superfície levemente áspera e coloração verde ou avermelhada; quando cortados ou quebrados, desenvolvem coloração azulada na superfície.

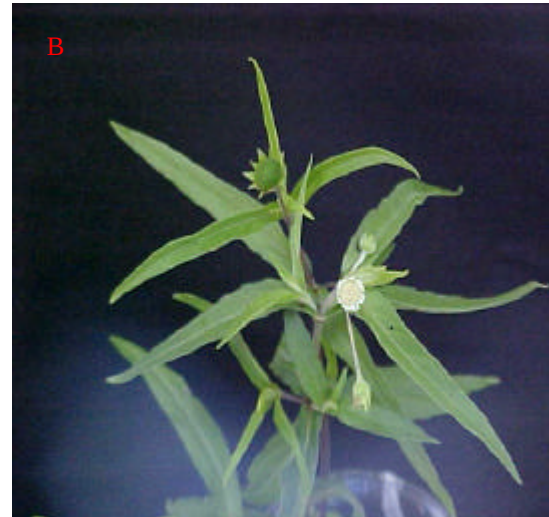


Figura 1 – *Eclipta alba* (L.) Hassk . (A) crescendo junto a uma lâmina de água sobre cimento do calçamento. (B) em detalhe.

O sistema radicular é do tipo pivotante, o enraizamento adventício ocorre a partir de nós em contato com o solo úmido. As folhas são simples, opostas, sésseis na parte superior da planta, com a base abraçando o caule ou ramo; na parte inferior da plantas, as folhas podem ser curto-pecioladas. Limbo oblongo-lanceolado, com até 12 cm de comprimento por 2,5 cm de largura, de base cuneada e ápice agudo, apresentando, frequentemente, um desvio lateral; margens inteiras ou denticuladas. Coloração verde-escuro na face ventral e pouco mais clara na dorsa. Pelos brandos, curtos, rígidos, de base entumescida e ápice agudo, ocorrendo em ambas as faces, com maior intensidade na face dorsal. Os pelos dão certa aspereza às folhas e são melhor observados com lupa (10x).

A inflorescência é constituída de capítulos isolados, ou pareados, sobre pedúnculo de 0,5-7,0 cm de comprimento, entumescido na extremidade superior. As flores formam os capítulos subglobosos com 0,5-1,0 cm de diâmetro. Invólucro campanulado, passando a plano, formado por duas séries de 5-6 filárias ovaladas e de ápice agudo, com pilosidade esbranquicada. Numerosos flósculos brancos, com cerca de 3mm de comprimento. Flósculos periféricos femininos, de corola ligulada, com ovário branco, hispido, de 1 mm de comprimento. Flósculos centrais em número de

30-40, hermafroditos, com corola tubulosa e ovário um pouco maior; androceu com 4 estames de anteras pardas, com apêndices basais aguçados.

Os aquênios são obovóide-comprimidos, às vezes levemente curvados, em seção transversal triangulados, com 2,1-2,2 a 2,8 mm de comprimento por 0,7-1,0 a 1,2 mm de largura; uma face mais larga do que as outras duas; base de truncada a subarredondada e mais atenuada. Um ângulo arredondado e os outros dois agudos; ápice plano ou, ligeiramente, convexo ou côncavo, com papilho reduzido a 2-3 pequenas projeções, de formas e tamanhos diferentes, circundado por alguns diminutos pelos brancos, caidços; superfície do pericarpo fosca, densamente rugosa-tuberculada, de coloração castanha a castanho-escuro, com projeções sempre mais claras.

É invasora muito frequente em solos úmidos, infestando lavouras de arroz de várzea, pastagens, culturas perenes e beira de estradas. Tem grande capacidade de adaptação a vários tipos de solo, inclusive salinos. É hospedeiro alternativo do nematóide *Meloidogyne incognita* (LORENZI, 2000). No Brasil, é importante invasora em cultura de cebola, nas regiões Norte e Nordeste, na região do Vale do Rio São Francisco (KISMANN e GROTH, 1995).

2.3. Fitoterapia

Na medicina indiana tradicional é usada no tratamento de leucoderma, cegueira noturna e icterícia catarral, como emético, purgativa e antisséptica. O banho de vapor com suas folhas é excelente no tratamento e cura de hemorróidas. É utilizada para escurecer e promover o brilho dos cabelos. O suco de suas folhas, juntamente com o mel, previne o início da senilidade (PATNAIK, 1993).

Na Índia, Suriname e Filipinas, a planta inteira é usada, externamente, no caso de edemas de ouvidos do gado, feridas, pisaduras e chagas das costas de animais e nas doenças da pele e como anti-hemorragico humano. Durante a guerra do Vietnã, foi utilizada como antisséptico e homeostático humano (LANS, 2000).

Os jesuítas, na época do descobrimento do Brasil, conheceram a planta usada pelo índios, seus princípios ativos antiofídicos foram mais tarde, isolados e estudados por japoneses. Os mateiros usam-na preventivamente, tomando seu infuso antes de se

embrenharem nas matas a fim de se protegerem no caso de picadas de cobras venenosas.

MELO *et al.* (1994) constataram atividade antimiotóxica e anti-hemorragica em extratos e constituintes de *Eclipta prostrata*. Wedelolactona é o flavonóide presente em *Eclipta alba*, com atividade antiofídica em pequenos animais de laboratório que previamente tratados com esta planta suportaram até 3 vezes a dose letal de veneno de cascavel ou jararaca, desenvolvendo imunidade ao veneno após experimentação (MORS *et al.*, 1994). Esses efeitos foram interpretados, por MATOS (1994) como consequência da atividade antiproteolítica e antifosfolipase A₂ da planta. Esse autor, confirmou, também, sua atividade hepatoprotetora, regeneradora da célula hepática e imunoestimulante. MARTINS *et al.* (1995) reportam que wedelolactona estimula a síntese de interferon *in vitro*, que neutraliza o veneno de jararaca e tem utilidade no tratamento de pacientes com queda nas defesas orgânicas.

RANGEL *et al.* (1993) constataram atividade analgésica e antiinflamatória nos extratos hidroalcoólicos de *E. alba*, enquanto LEAL *et al.* (2000) atribuíram esses efeitos às cumarinas, flavonóides e taninos presentes nestes extratos, observando, também, atividades broncodilatadora e antinoceptiva dos mesmos.

O efeito hepatoprotetor de *Eclipta alba* foi comprovado, em estudos de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos. Esse trabalho mostrou que os extratos de *Eclipta alba* regulam os níveis da enzima microssomal, hepática que metaboliza a droga (SAXENA *et al.*, 1993); os extratos etanólicos de folhas e calos também demonstraram atividade hepatoprotetora (ZAFER e SAGAR, 2000).

Segundo LANS *et al.* (2000), ampla diversidade de constituintes químicos importantes é encontrada em *Eclipta alba*, tais como: resinas, peptídios contendo enxofre, coumestanos incluindo demetilwedelolactona e seu glicosídeo além de wedelolactona. Há também triterpenóides (alguns com atividade inseticida), e os flavonóides apigenina e luteolina. Alguns compostos antivirais são: tiofenos, alfa-tertienilmetanol, beta-amirina, fenóis, taninos, polipeptídeos, esteróides e alguns compostos nicotínicos inseticidas.

A wedelolactona de *Eclipta alba* (L.) Hassk tem propriedade antiinflamatória (WAGNER, 1993). O triterpeno glicosilado (ecliptasaponina C), o daucosterol e o estigmasterol-3-O-glicosídeo foram isolados de *Eclipta alba* (ZHANG e CHEN, 1996), sendo que daucosterol mostrou atividade antitumor (KAY, 1996).

Os poliacetilenos encontrados em *Eclipta alba* mostraram forte toxicidade contra *Candida albicans*, insetos e larvas (OLIVER-BEVER, 1986), além de propriedades antiinflamatórias desejáveis (WAGNER, 1993).

PERRUCCI *et al.* (1995) relataram que os monoterpenos com grupo funcional livre de álcool, ou fenol, têm boa atividade acaricida, sendo usados em veterinária contra sarna de cachorro.

BORTHAKUR *et al.* (2000) relatam que as raízes têm propriedades antissépticas e purgativas, sendo aplicadas, externamente como antisséptico de úlceras e feridas no gado. O extrato dos brotos têm propriedades contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2.4. Isoenzimas

2.4.1. Aspectos gerais e interpretação de zimogramas

Isoenzimas são definidas como múltiplas formas moleculares da enzima, com especificidade similar, ou idêntica por algum substrato, ocorrendo no mesmo organismo (MARKET e MOLLER, 1959; GOTTLIEB, 1971).

As isoenzimas podem ser originadas de diversos sítios gênicos, ou de alterações pós-transcripcionais, modificando sua estrutura original, ou por duplicação do gene ou do número de cromossomos, com mutações subseqüentes nos locos. Dessa maneira, é obtido mais de um gene que contribui na formação dessas enzimas, que, como outras, podem ser compostas por uma ou mais subunidades de um polipeptídio (SCANDALIOS, 1975). As modificações causadas pela mutação na seqüência de nucleotídios de genes estruturais poderão ter modificações nas cargas finais dos polipeptídios constituintes dessas enzimas. Consequentemente, durante a eletroforese, quando ocorre a migração dessas moléculas protéicas em meio-suporte pelo uso de

tampões adequados, a separação das isoenzimas pode ser processada por sua carga elétrica, tamanho e forma. Tais moléculas enzimáticas, na presença de substratos ou de corantes específicos, formam complexos insolúveis, permitindo a visualização de bandas coloridas nos locais correspondentes às suas posições de migração. As bandas que aparecem na análise eletroforética da mesma enzima, são denominadas isoenzimas (GOTTLIEB, 1971; SCANDALIOS, 1975).

Sob o ponto de vista evolucionário, a existência de isoenzimas visaria incrementar a versatilidade bioquímica do organismo e protegê-lo contra perda de funções, ocasionadas por mutação ou por estresse ambiental, implicando, necessariamente, em variação fenotípica (SHANNON, 1968). A detecção das isoenzimas envolve, basicamente, três passos: a extração de proteínas do tecido vegetal, a separação dessas proteínas por meio de eletroforese e a coloração histoquímica do gel, o que permite a visualização do produto da reação enzimática na forma de “banda” no gel (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). A variabilidade dos padrões isoenzimáticos de cada população, é geralmente, atribuída à segregação genética e designada polimorfismo. Segundo ALFENAS *et al.* (1991), as enzimas constituem importante fonte de marcadores genéticos, com as seguintes vantagens: a) permitem quantificar a variabilidade em nível mais próximo do DNA, por serem produtos diretos da ação gênica, sendo pouco influenciadas pelo ambiente celular onde se situam; b) há controle genético do polimorfismo isoenzimático, que parece ser monogêncio e cuja interação intra-alélica é do tipo codominante, possibilitando a identificação de heterozigotos; c) é possível analisar de vários locos, simultaneamente; e d) o método de análise é não-destrutivo e pouquíssimas quantidades de tecidos são suficientes para amostragem. De acordo com WEEDEN e ROBINSON (1986), a principal vantagem da eletroforese é das isoenzimas, em geral estarem livres de efeitos epistáticos, além de não influenciarem de forma marcante a adaptabilidade, o que permite que se mantenham estáveis na população.

As isoenzimas podem ser encontradas dentro do mesmo compartimento subcelular, ou não e podem ser produzidas em diferentes estádios de desenvolvimento dos organismos. Em plantas, o número de isoenzimas reflete, freqüentemente, o

número de compartimentos subcelulares, nos quais há necessidade da mesma reação catalítica (GOTTILIEB, 1982).

As isoenzimas são controladas geneticamente por um ou vários genes, situados no mesmo loco ou em locos diferentes (SCANDALIOS, 1969). Quando representam a expressão fenotípica de alelos situados no mesmo loco, são denominadas alozimas (CONKLE *et al.*, 1982).

Para um determinado loco, o número de bandas observadas no gel depende de seu estado alélico, homozigótico, ou heterozigótico e da estrutura quaternária da isoenzima codificada. Um loco homozigótico é representado por, somente, uma banda de migração específica, correspondente ao único tipo de aloenzima codificada. Os genótipos heterozigóticos são representados por número variável de bandas, de acordo com o número de polipeptídeos que formam a enzima ativa (Quadro). Assim, para uma enzima monomérica são vistas duas bandas correspondentes às duas aloenzimas monômeras codificadas (A e B). Para uma enzima dímica, três bandas, sendo duas correspondentes aos homodímeros (AA e BB) e uma intermediária, o heterodímero (AB), composto por dois polipeptídeos distintos (A e B) especificados por cada alelo parental (a e b). Quando a enzima tem estrutura tetramérica, o heterozigoto apresenta cinco bandas, dois homotetrâmeros (AAAA e BBBB) e três heterotetrâmeros (AAAB, AABB, ABBB) diferentes.

Quadro 1- Zimogramas de genótipos homozigóticos, o heterozigótico e segregação F₂ para um loco codificando as enzimas monômera, dímera e tetrâmera

Enzima	Genótipos			Segregação F ₂		
	Genitores		Híbrido	1 aa	2 ab	1 bb
Monômera	$\frac{3}{4}$ A		—A	—	—	
		—B	—B		—	—
Dímera	—AA		—AA	—	—	
			—AB		—	
		—BB	—BB		—	—
Tetrâmera	—AAAA		—AAAA	—	—	
			—AAAB		—	
			—AABB		—	
			—ABBB		—	
		—BBBB	—BBBB		—	—

A complexidade dos zimogramas aumenta, consideravelmente, com a expressão de mais de um loco e com as possíveis interações entre eles. Em determinadas situações, a interpretação dos fenótipos é facilitada pela análise dos zimogramas de grãos de pólen, haplóides, comparados àqueles dos tecidos somáticos diplóides (WEEDEN e GOTTLIEB, 1979). De qualquer forma a análise genética dos fenótipos eletroforéticos em progênies específicas é que caracteriza locos e alelos.

Certas situações excepcionais podem, entretanto, complicar a interpretação dos zimogramas (Quadro 2) tais como:

- a- Bandas heterodímeras que não migram, exatamente, na região mediana entre as bandas homodímeras (GOODMAN e STUBER, 1983);
- b- Bandas adicionais que resultam do armazenamento, da preparação das amostras, ou mesmo do processo da eletroforese (STAUB *et al.*, 1985);
- c- Bandas múltiplas oriundas de modificações pós-tradução das enzimas, frequentemente denominadas sombras ou bandas fantasmas. Essas bandas múltiplas e de migração concomitante podem comportar-se geneticamente, como alelos simples (RICK e FOBES, 1976; KAHLER, 1983; HARRY, 1986). Não se sabe, exatamente, se essas aloenzimas com padrão de bandas múltiplas são produzidas por modificações pós-tradução *in vivo* ou por mudanças conformacionais *in vitro*;
- d- Presença de *alelos nulos*, assim denominados porque ou não são transcritos ou codificam para polipeptídeos defeituosos, que resultam em ausência de atividade enzimática, alterando, assim, o número de bandas normalmente observadas nos genótipos heterozigotos (WENDEL e WEENDEN, 1989).

Quadro 2- Zimogramas de locos isoenzamáticos que apresentam heterodímeros atípicos, bandas múltiplas e alelos nulos

Enzima	Genótipos			Segregação F ₂		
	Genitores aa	bb	Híbrido ab	1 aa	2 ab	1 bb
Heterodímero atípico	$\frac{3}{4}$		— —	—	— —	
		—	—		—	—
Bandas múltiplas (monômero)	— —		— —	—	— —	
		—	—		—	—
Alelo nulo	—		—	—	—	

2.4.2. Eletroforese de isoenzimas e importância como marcadores genéticos

Existem vários métodos bioquímicos, que determinam a presença de isoenzimas. Entretanto, a eletroforese é o método que tem merecido mais atenção (SHANNON, 1968; PIERCE e BREWBAKER, 1973; BROWN, 1978).

A eletroforese consiste no movimento de partículas eletricamente carregadas em diferentes meios-suporte, ou solução com gradiente de densidade, de acordo com cargas elétricas, formas e pesos moleculares, sob a influência de um campo elétrico (BREWER e SING, 1970). Como meios-suporte, são utilizados papel de filtro, sílica gel, membranas de acetato de celulose, gel de agarose, amido, poliacrilamida, dentre outros. Os meios-suporte devem ser química e fisicamente inertes de modo a não interferir na mobilidade das moléculas (SARGENT e GEORGE, 1975). O método baseia-se na aplicação da diferença de potencial elétrico nas extremidades do gel, possibilitando o movimento das moléculas da amostra. As moléculas carregadas positivamente direcionam-se ao catodo, enquanto as moléculas carregadas negativamente direcionam-se ao anodo. Assim, cada isoenzima assumirá determinada

posição no gel, formando as bandas. O conjunto de bandas reveladas é denominado zimograma (PIERCE e BREWBAKER, 1973; ALFENAS *et al*, 1991).

As técnicas isoenzimáticas auxiliam na identificação quimiotaxonômica de espécies, principalmente medicinais (PIERCE e BREWBAKER, 1973). Os padrões isoenzimáticos têm sido, amplamente, utilizados na caracterização e identificação de acessos, genótipos, variedades e tipos, em espécies cultivadas ou silvestres, isto é, em avaliação da diversidade genética. SMITH (1972), utilizando padrões eletroforéticos de peroxidase e esterase em folha de *Digitaria* sp., caracterizou sete mil acessos e concluiu que este método pode ser útil na identificação de linhagens desta espécie.

As isoenzimas são importantes marcadores bioquímicos, muito utilizadas na análise de variabilidade genética e muitas vezes, são mais utilizadas do que os marcadores morfológicos, por serem menos influenciadas pelo ambiente (MILACH, 1998).

Na correta interpretação dos padrões de bandas isoenzimáticas, é necessário ter conhecimento prévio sobre o número de subunidades da enzima. Por exemplo, no padrão de bandas do indivíduo heterozigoto das enzimas diméricas, além das duas bandas correspondentes aos dois peptídeos, há a terceira banda intermediária resultante da conjugação dos dois peptídeos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996). Com esta técnica, é possível detectar se há, ou não, variabilidade em cada loco, pela simples análise do padrão de bandas. Assim, se uma banda aparece na mesma posição no gel, todos os indivíduos examinados pode-se supor que o gene que codifica esta enzima não variou. Por outro lado, é possível detectar a proporção de todos os locos variantes (polimorfismo), na amostra estudada (GOTTSLIEB, 1971).

Apesar das técnicas moleculares (análise de DNA) revelarem grande polimorfismo, as isoenzimas oferecem vantagens na obtenção de estimativas de variabilidade genética, sendo mais indicada nos estudos sobre sistemas de cruzamento, e estrutura de populações (PARKER *et al.*, 1998). O uso de isoenzimas é, particularmente, interessante na abordagem inicial de parâmetros genéticos populacionais, em espécies pouco estudadas (ROBINSON, 1998), como é o caso da maioria das plantas medicinais.

O polimorfismo isoenzimático também tem sido utilizado em estudos taxonômicos e filogenéticos, tais como: caracterização de germoplasma (ALFENAS *et al.* 1998; PERECIN e KAGEYAMA, 2002); determinação do modo de reprodução de espécie (BALLVÉ, 1992; MELLO, 1991; SOUZA, 2000); determinação da validade de cruzamentos controlados (LOPES, 1999); identificação de lotes de sementes; identificação de raças de fitopatógenos, obtenção da estimativa do nível de autogamia; análise de divergência genética, dentre outros fins (PIERCE e BREWBAKER, 1973; DEGANI e GAZIT, 1984; GOLDRING *et al.*, 1987; ALFENAS *et al.*, 1991).

A utilização de isoenzimas como marcadores genéticos tem, ainda, gerado informações, que permitem determinar métodos mais eficientes de melhoramento, orientando o manejo e a conservação de recursos genéticos (PIERCE e BREWBAKER, 1973; SOUZA, 2000).

2.4.3. Utilização de isoenzimas em plantas medicinais

As técnicas isoenzimáticas têm sido utilizadas em estudos sobre a diversidade genética de plantas medicinais, auxiliando a identificação e caracterização de acessos, de genótipos, de variedades e tipos. A partir de análises isoenzimáticas de duas populações de *Ocimum nidicaule*, realizadas por ALMEIDA e FIGUEIREDO-RIBEIRO (1986), foi possível a inclusão de duas variedades botânicas.

AMARAL e CASALI (2000), utilizando os resultados do polimorfismo das enzimas fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), peroxidase (PO) e chiquimato desidrogenase (SKDH), em duas populações de alfavaca (*Ocimum selloi*), detectaram variabilidade entre e dentro das duas populações. A separação dessas populações, foi possível empregando-se a análise conjunta desses sistemas polimórficos.

Na análise isoenzimática de sete acessos de *Bidens pilosa*, realizada por OLIVEIRA e CASALI (1999), foram detectados variantes isoenzimáticos de ACP, EST e PO. Nos acessos das altitudes extremas (5 e 1.160 m), houve variações mais marcantes. A diferença em número de bandas entre os acessos, coletados na menor e maior altitude, foi detectada em ACP, revelando dez e oito bandas, respectivamente.

Pelo grande número de bandas isoenzimáticas comuns a todos os acessos (27 das 35 bandas reveladas), a característica provavelmente é favorável à adaptação de *B. pilosa* nas altitudes.

Na determinação da biologia da reprodução em estévia (*Stevia rebaudiana*), BALLVÉ (1992) obteve resultados confirmadores de reprodução sexuada, nesta espécie. Trabalhos anteriores baseados em características morfológicas da flor haviam concluído ser esta espécie de reprodução assexuada (apomítica). Entretanto, os resultados contrários obtidos com variantes de fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e peroxidase (PO), além dos de leucina aminopeptidase (LAP), fosfoglicico isomerase (PGI) e fosfoglicomutase (PGM) permitiram a detecção de variação isoenzimática entre, e dentro, de progênes individuais, tratando-se de espécie alógama.

A separação de quatro espécies do gênero *Plantago* foi realizada, por PRAMANIK e RAYCHAUDHURI (1997), utilizando o polimorfismo isoenzimático de esterase (EST) e superóxido dismutase (SOD). Os autores observaram que apenas o uso da EST ou do SOD serviriam à separação das espécies, por esta razão, consideraram estes como sendo importantes marcadores bioquímicos na determinação de espécies do gênero *Plantago*. FUENTES-GRANADOS *et al.* (1998) utilizaram as análises isoenzimáticas, em estudo da herança isoenzimática das progênes de cinco populações de hissopo aniz (*Agastache foeniculum*) determinando a diversidade genética entre, e dentro, das populações. SEVESTRE-RIGOUZZO *et al.* (1993) utilizaram o polimorfismo isoenzimático na detecção de híbridos naturais entre *Catharanthus roseus* e *C. trichophyllus*. LOPES (1997) observou o potencial das isoenzimas, como marcadores genéticos no gênero *Polygonum*, uma vez que nos sistemas isoenzimáticos utilizados havia elevado polimorfismo.

Em *Spondias tuberosa* Arr. Cam., espécie alimentícia e também medicinal, SOUZA (2000) utilizou isoenzimas e classificou-a de fecundação cruzada predominante sendo que a maior proporção de variabilidade dentro das populações indicou que na coleta de germoplasma visando ao melhoramento genético, deve-se priorizar mais o número de plantas, por população, do que o número de populações. O autor recomenda o método de seleção visando ao melhoramento.

OLIVEIRA (2001), trabalhando com 7 sistemas isoenzimáticos, caracterizou e estimou a distância genética em 9 acessos de *Bidens pilosa*, bastante polimórficos tanto entre quanto dentro, sendo que a variabilidade detectada permitiu separar os indivíduos de todos os acessos em padrões individuais. PERECIN e KAGEYAMA (2002) observaram alta divergência genética, em populações naturais de espinheira-santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss, sugerindo que se deve privilegiar maior número de populações do que indivíduos dentro das populações, no caso de conservação das espécies em banco de germoplasma.

2.4.4. Variabilidade genética

As medidas mais usuais de verificação da variabilidade, utilizando isoenzimas, baseia-se na amostra aleatória de múltiplos locos em populações não hierarquicamente estruturadas. Diversos índices e coeficientes podem expressar medidas de dissimilaridade genética, entre amostras de populações. Alguns se baseiam nas frequências alélicas estimadas de modo convencional, enquanto outros, de modo arbitrário dos tipos 1 (presença) e 0 (ausência) de alelo.

As medidas de dissimilaridade podem ser calculadas com base em locos individuais, sendo a distância final obtida a partir da média das distâncias dos locos ou usando-se a combinação de todos os locos, sem individualização. A análise da divergência genética tem sido utilizada pelos melhoristas de plantas na investigação da proximidade das espécies, da diversidade de origem geográfica, da capacidade de combinação e da heterose (ALFENAS *et al.*, 1991). Como as isoenzimas seguem padrões mendelianos de segregação, é possível estimar o grau de divergência entre locos que codificam enzimas (GOTTLEB, 1971).

No caso dos fenótipos não-interpretáveis (em níveis de locos e alelos), é empregado o índice de similaridade de Jaccard, em razão de ser este mais adequado a dados do tipo presença/ausência de bandas isoenzimáticas (ALFENAS *et al.*, 1991). A análise direta dos índices de dissimilaridade é bastante trabalhosa, quando vários genótipos são estudados, de modo que poucas conclusões práticas são obtidas. Assim,

metodologias que simplifiquem essa gama de dados devem ser utilizadas e, neste contexto, a análise de agrupamento atende tal necessidade.

A aplicação de técnicas de análise de agrupamento permite dividir o grupo original de observações em vários subgrupos homogêneos, a partir de alguma medida de dissimilaridade (CRUZ, 1990; MORAIS, 1992). Dentre os métodos de agrupamento, destaca-se o método de otimização proposto por Tocher, que adota, como critério manter a distância média intragrupo sempre inferior a qualquer distância intergrupos, conforme descrito por CRUZ (1997).

Essas técnicas foram utilizadas em plantas medicinais, podendo-se citar o trabalho desenvolvido por LOPES (1997), na estimação do grau de variabilidade genética e caracterização de subgrupos de indivíduos, em oito acessos de erva-de-bicho (*Polygonum punctatum* Ell.).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram caracterizados oito acessos de *Eclipta alba*, totalizando 40 plantas, obtidas a partir de sementes oriundas dos municípios de Sacramento - MG e Viçosa - MG (Quadro 3). O local de coleta variou de zona urbana a zona rural, bem como o habitat da planta fornecedora das sementes. Como não havia disponibilidade estudos sobre isoenzimas com *Eclipta alba*, tornou-se necessário adaptar a técnica de eletroforese em gel de amido de maizena. Desta forma, os procedimentos foram otimizados, sendo dada maior ênfase à seleção do tecido, tampões do gel e eletrodos e estágio ontogenético. Foi usado material vegetal proveniente de plantas do experimento instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Além das análises isoenzimáticas, quantificou-se wedelolactona nas folhas, usando-se a metodologia de extração descrita no Capítulo 2 deste estudo. Nos estudos sobre o melhor tecido, utilizaram-se 120 plantas e outras 45 na escolha estágio ontogenético mais adequado.

Quadro 3 - Código do acesso, origem e habitat de coleta dos oito acessos de *Eclipta alba*

Código	Origem e local de coleta	Habitat
CEN	Viçosa – MG (zona urbana)	Terreno baldio isolado, crescendo próximo ao acesso CEM, (200 m)
JAN	Viçosa – MG (zona rural)	Sendo cultivado como planta medicinal
CV	Viçosa –MG- (Zona rural)	Ao lado de casa-de-vegetação, crescendo junto à grama
SAC	Sacramento _MG- Zona urbana	Terreno baldio, crescendo isolado.
AFR	Viçosa –MG – (Zona rural)	Ao lado de granja de suínos, crescendo junto à grama
HEN	Viçosa – MG- (Zona rural)	Nos barrancos de tanque de piscicultura
CEM	Viçosa – MG- (Zona urbana)	Terreno baldio, crescendo próximo ao acesso CEN, (200 m)
SIL	Viçosa – MG-Zona urbana	Crescendo junto a alambrado ao lado de grama

3.1. Sistemas isoenzimáticos e tampões, órgãos e estádios ontogenéticos

Inicialmente, foi necessário adaptar a técnica de eletroforese em gel de amido à *Eclipta alba*, uma vez que não havia disponibilidade de estudos sobre isoenzimas com a espécie. Desta forma, os procedimentos foram otimizados, sendo dada maior ênfase à seleção do tecido, ao estágio ontogenético e tampões do gel e eletrodo. Foram testados os seguintes sistemas isoenzimáticos:

Enzima	abreviação	código
Álcool desidrogenase	ADH	EC 1.1.1.1
Esterase	EST	EC 3.1.1.1
Fosfase ácida	LAP	EC 3.3.3.1
Glutamato desidrogenase	GDH	EC 1.4.1.3
Glutamato oxaloacetato desidrogenase	GOT	EC 2.6.1.1
Isocitrato desidrogenase	IDH	EC 1.1.1.42
Leucina aminopeptidase	LAP	EC 3.4.11.1
Malato desidrogenase	MDH	EC 1.1.1.37
Fosfoglucoase isomerase	PGI	EC 5.3.1.9
Fosfoglututase	PGM	EC 5.4.2.2
Peroxidase	PO	EC 1.11.1.7
Chiquimato desidrogenase	SKDH	EC 1.1.1.25

A qualidade da atividade (intensidade das bandas) e da resolução dos sistemas isoenzimáticos (bandas e separações entre bandas nítidas e ausência de borrões ou arraste) foram avaliadas, nas duas combinações tampão-gel-eletrodo (Quadro 4).

Tecidos radiculares e foliares foram submetidos à eletroforese com o objetivo de escolher o melhor órgão, neste caso, utilizando-se 120 plantas. Na escolha do melhor estágio ontogenético, utilizou-se apenas o órgão já eleito anteriormente, utilizando outras 45 plantas, das quais colheu-se material com 1 mês de idade (antes do florescimento), 2 meses de idade (início do florescimento) e aos 3 meses de idade (florescimento pleno). As amostras da primeira e segunda colheitas foram conservados a -80 °C e só foram utilizadas na corrida no mesmo gel, ao lado das amostras da terceira colheita.

3.2. Amostragem e preparo das amostras

As amostras dos oito acessos constituíam-se de folhas jovens de plantas adultas (2 meses de idade), que eram colocadas em papel-toalha e acondicionadas em caixa de isopor com gelo picado visando à integridade. No laboratório, as folhas foram maceradas em almofariz de porcelana, previamente resfriado, para evitar a elevação da temperatura e a consequente desnaturação das enzimas.

A proporção de tecido por volume de solução extratora (APÊNDICE –Quadro 01) foi de aproximadamente 1:3,0. Utilizou-se a solução extratora sugerida por ALFENAS *et al.* (1991), aumentando-se a concentração do PVP (polivinilpolipirrolidona) a 10% afim de remover compostos fenólicos (interferentes). Após a trituração com auxílio de pinça cirúrgica, o macerado foi adsorvido por tiras de papel do tipo mata-borrão, nas dimensões de 1,2 x 0,8 cm colocado sob gaze a fim de evitar levar resíduo do macerado. As tiras de papel foram armazenadas a -80 °C.

3.3. Preparo do gel

Empregou-se o sistema de eletroforese horizontal em gel de amido (ALFENAS *et al.*, 1991), utilizando-se amido nacional (maizena) na concentração de 11%.

O gel foi preparado a partir da suspensão de amido em solução-tampão do gel, à temperatura ambiente, em frasco Erlenmeyer com agitação constante. A solução-tampão do gel variou de acordo com o sistema isoenzimático (Quadro 2).

A suspensão de amido foi levada ao forno microondas, onde permaneceu por 5 minutos sob agitação, após cada fervura. Na combinação do tipo A agitou-se 2 vezes, enquanto na combinação do tipo B agitou-se 3 vezes. Em seguida, o conteúdo foi vertido, cuidadosamente em formas de acrílico. O gel foi coberto com uma placa de vidro para uniformizar a superfície e evitar o excesso de evaporação. Os géis, preparados à tarde, foram conservados em geladeira até o dia seguinte, quando se procedeu a eletroforese.

Quadro 4 - Combinações tampão-gel-eletrodo usadas nos sistemas isozimáticos

Tipo	Gel	Eletrodo	Enzima	Referência
A	Tris 0,015M Ác.cítrico 0,004M pH 7,8	NaOH 0,1M Ácido bórico 0,3M pH 8,6	EST, GDH, PGI, PGM, PO, LAP, ACP, GOT	SOLTIS <i>et al.</i> (1983)
B	Tris 0,009 M Ácido cítrico 0,0028 pH 7,0	Tris 0,135M Ácido citrico 0,043M Água destilada 1L pH 7,0	MDH SKDH ADH IDH	SHAW e PRASAD (1970)

3.4. Aplicação das amostras e eletroforese

Na manhã seguinte ao preparo do gel, a placa de vidro foi removida, sendo que, a cerca de 4,0 cm de uma das extremidades do gel, efetuou-se, com o auxílio de bisturi, um corte perpendicular atingindo a face inferior do gel. A porção menor do gel foi afastada e, sequencialmente, ao longo da face maior do gel, com o auxílio de uma pinça, as amostras adsorvidas nas tiras de papel foram aplicadas de modo a cobrir, completamente, a espessura do gel.

Em cada gel, foram utilizadas nove tiras, afastadas em aproximadamente 1,0 cm umas das outras. Papelotes de azul de bromofenol foram inseridos nas extremidades, para visualização da frente de migração. Em seguida, procedeu-se à junção das partes cortadas e o suporte do gel foi apoiado sobre as cubas. A conexão do gel às cubas dos eletrodos, contendo cada uma 100 mL do tampão adequado ao sistema, foi feita mediante uma ponte de pano do tipo perfex, dobrado uma vez.

O aparelho foi ligado, sendo realizada uma pré-corrida, durante 30 minutos a 150 V, visando à liberação das enzimas contidas nas tiras. Após esse tempo, o aparelho foi desligado e as cubas desconectadas, sendo as tiras removidas com o auxílio de uma pinça. Finalmente, as partes do gel foram reunidas, reconectando-se o gel às cubas e o aparelho ligado, reiniciando a corrida eletroforética, agora com a voltagem de 150 V, até que a frente de azul de bromofenol atingisse 9,0 cm.

3.5. Fatiamento, coloração, fixação e secagem dos géis

Com o auxílio de guias de vidro de 2,0 mm de espessura, e de um fio de náilon nº 20, procedeu-se ao corte horizontalmente do gel, em fatias de mesma espessura das guias. As fatias foram, cuidadosamente, retiradas e colocadas distendidas em formas do tipo pirex, onde foram imersas na solução corante específica de cada enzima (APÊNDICE - Quadros 2 a 13).

Após o período de incubação, a solução foi descartada e os géis lavados em água corrente, sendo, em seguida, feita a fixação em solução de glicerina a 10%, por cerca de 12 horas, em refrigerador a aproximadamente 4°C. Após a coloração e fixação, a secagem do gel foi realizada em placa de vidro, após este ter sido envolvido em papel celofane de celulose de madeira esticado. O conjunto gel-placa de vidro foi mantido à temperatura ambiente na posição vertical, por aproximadamente 24 horas. Após este tempo, secou-se o conjunto gel-placa de vidro em estufa a 37°C, por mais algumas horas, sendo, posteriormente identificado.

3.6. Leitura dos zimogramas e documentação dos resultados

Os géis foram colocados sobre diafanoscópio, e as bandas reveladas foram registradas. As bandas foram identificadas de acordo com a mobilidade relativa (MR), sendo atribuído o valor 1,0 à banda de maior migração, a partir do ponto de aplicação, enquanto a mobilidade relativa das demais bandas foi obtida, dividindo-se a distância percorrida pela referida banda pela distância percorrida pela banda de maior migração.

Posteriormente, foi feita a interpretação dos géis por região de migração, visando identificar o loco, ou locos envolvidos no controle das enzimas. Com o número e posição das bandas, por região de migração (loco), procurou-se determinar o número de locos e de alelos por loco na população envolvidos no controle genético da enzima na espécie.

3.7. Análise da divergência genética por padrões de bandas isoenzimáticas

A análise foi feita, utilizando-se distâncias genéticas entre indivíduos, a partir de dados isoenzimáticos. Utilizou-se a análise multivariada, estimando-se as medidas do complemento do índice de similaridade de Jaccard e o procedimento de agrupamento, obtido pelo método de otimização de Tocher. O programa computacional GENES (CRUZ, 1997) foi utilizado nessas análises.

Análises de variância (ANOVA) foram aplicadas aos dados do conteúdo wedelolactona na folha e o teste de Scott-Knott utilizado na comparação de grupos de médias entre os acessos, adotando-se o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise Isoenzimática

Os doze sistemas isoenzimáticos, inicialmente avaliados, foram agrupados em três grupos, quanto à atividade e resolução, quais sejam:

Grupo a- com boa resolução permitindo separar os acessos: PGI (fosfoglucoose isomerase), MDH (malato desidrogenase), EST (esterase), SKDH (chiquimato desidrogenase) e PGM (fosfoglucomutase). Elegueu-se para os estudos de realizados nos capítulos 1 e 3 apenas os sistemas PGM (fosfoglucomutase), PGI (fosfoglucoose isomerase), MDH (malato desidrogenase) e EST (esterase) com polimorfismo adequado às análises de divergência genética.

Grupo b- sem polimorfismo, não permitindo separar os acessos: LAP (leucina aminopeptidase), PO (peroxidase) e IDH (isocitrato desidrogenase).

Grupo c- pouquíssima, ou ausência, de atividade GOT (glutamato oxaloacetato transaminase), GDH (glutamato desidrogenase), ACP (fosfatase ácida) e ADH (álcool desidrogenase).

Os testes, visando à seleção do tecido e estágio de desenvolvimento da planta, mostraram que os tecidos foliares (Figura 2) são os mais indicados para análise isoenzimática de *Eclipta alba*. Da mesma, forma o 2º estágio ontogenético permitiu

formação de bandas nítidas, possibilitando o estudo de divergência genética. Na Figura 3, observa-se que bandas de interesse não estavam presentes no 1º estágio, e aquelas presentes no 2º estágio desapareceram no 3º estágio. O desaparecimento de bandas tem sido relatado em outras espécies. Em soja, GORMAN e KIANG (1978) observaram o desaparecimento das bandas de ADH, entre três a quatro dias após a germinação. MARTINS-CORDER *et al.* (1998) observaram, em *Eucalyptus globulus*, ausência de locos das enzimas ACP, GOT, e alfa-EST aos 60 dias após germinação das plantas.

Na interpretação dos zimogramas, tomou-se como base o conhecimento prévio sobre a estrutura quaternária, o número de locos, a localização celular e a classificação por grupo, (TORGLLER, 1995; ROBINSON, 1998) os quais estão sumarizados no Quadro 5.

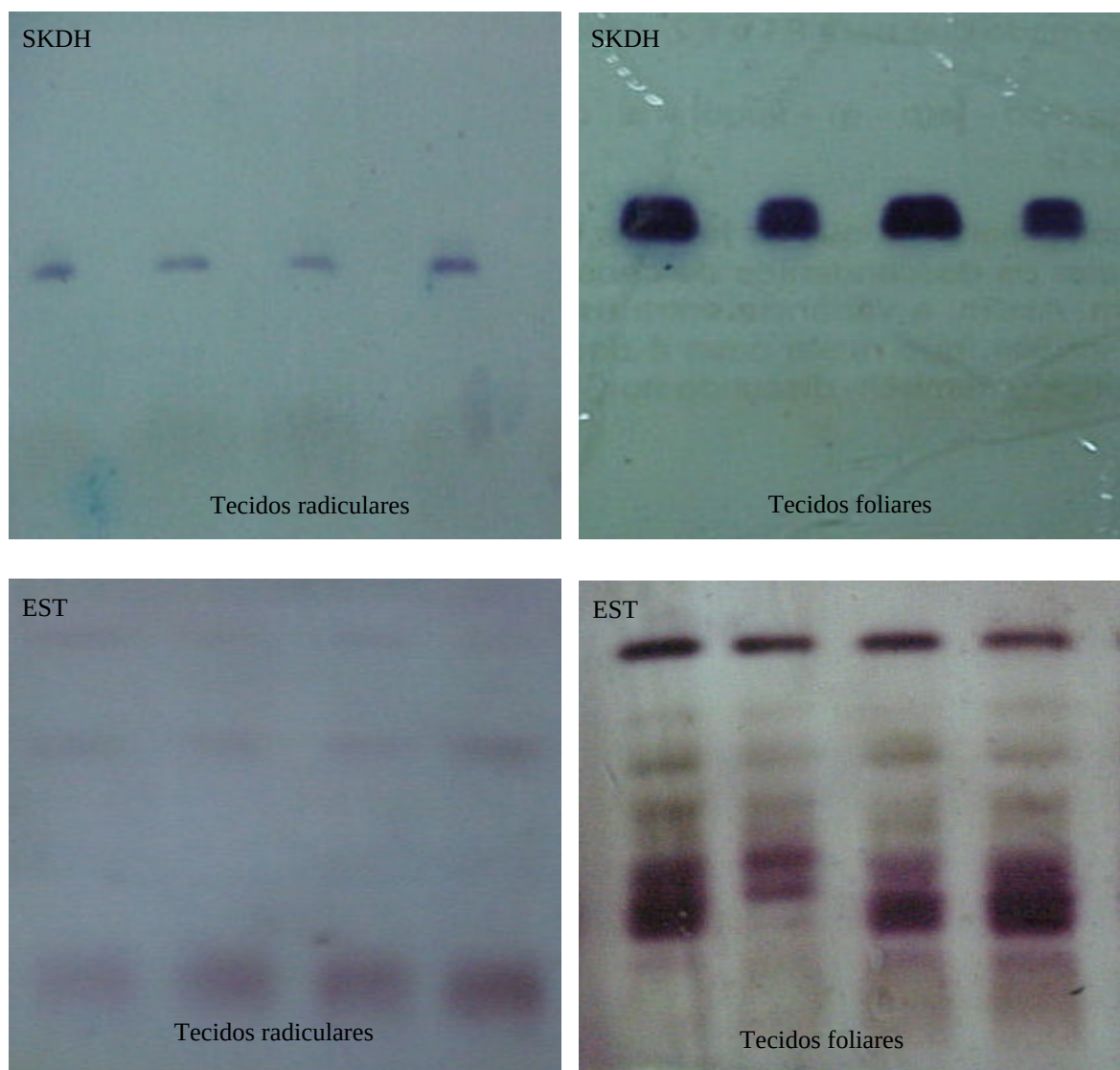


Figura 2- Diferenças entre os tecidos radiculares e foliares avaliados nos sistemas esterase (EST) e chiquimatodesidrogenase (SKDH).

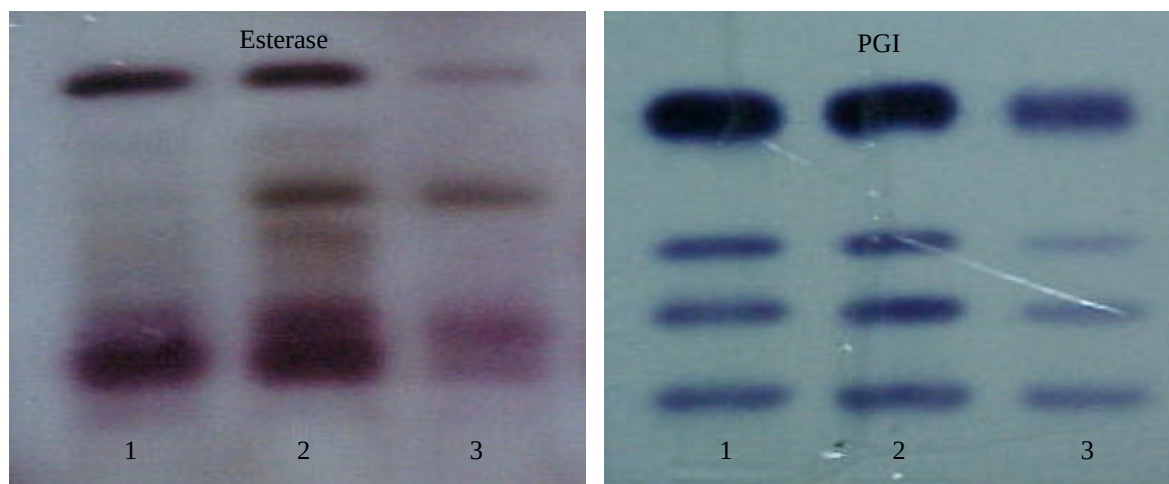


Figura 3- Diferentes estádios ontogenéticos (1 = 1 mês de idade, 2 = 2 meses de idade, 3 = 3 meses de idade) avaliados nos sistemas esterase e fosfoglucoisomerase.

Quadro 5 - Informação sobre o número de locos, a localização celular, a estrutura quaternária e a classificação das isoenzimas EST, MDH, PGI, PGM e SKDH

Enzima	Nº de locos	Localização celular	Estrutura quaternária	Grupo
EST	2-10	C/Mi	Mo e Di	II
MDH	3	C/Mi/Mit	Mo, Di e Tet	I
PGI	2	C/Pl	Di	I
PGM	2	C/Pl	Mo	I
SKDH	1-2	C/Pl	Mo	I

C= citosol, Mi = microcorpos, Mit = mitocôndrias, Pl = plastídeos.

Mo = monomérica, Di= dimérica, Tet = tetramérica.

4.1.1. Fosfoglucomutase (PGM)

Na enzima fosfoglucomutase (PGM) houve boa resolução nos tecidos foliares e resolução regular nas amostras radiculares. Nessa enzima foi detectada apenas atividade anodal. Na Figura 4, observa-se a presença de dois padrões, revelando-se duas bandas de mesma espessura e de intensidades diferentes entre os padrões. Segundo BRUNE *et al.* (1998), a PGM é monomérica e composta por apenas uma subunidade. Foram detectados dois locos isoenzimáticos, ou seja, Pgm1 e Pgm2, correspondendo aos homozigotos. Houve variação na intensidade de cor da banda, o que permitiu separar os acessos. O padrão A (banda de coloração de intensidade mais clara) estão os acessos CEM e AFR, enquanto no padrão B (banda de coloração de intensidade mais escura) estão os acessos CEN, CV, JAN, SAC, HEN, SIL.

4.1.2. Chiquimato desidrogenase (SKDH)

No sistema chiquimato desidrogenase (SKDH) houve atividade anódica no tecido foliar, sendo detectada a presença de apenas duas bandas, em apenas uma região de atividade, demonstrando ser monomórfica. Esta característica monomórfica da SKDH pode ser adaptativa, por estar envolvida no metabolismo secundário (rota do chiquimato) e na síntese de compostos de defesa da planta (TAIZ e ZEIGER, 1991).

ALFENAS *et al.* (1991) afirmam ser desconhecido o número de subunidades da enzima chiquimato desidrogenase. As bandas com diferença na intensidade de coloração, altura e largura formaram os padrões A e B, mas não permitiram separar os acessos, pois, distribuem-se, aleatoriamente, entre os acessos (Figura 5).

4.1.3. Fosfoglucose isomerase (PGI)

Na enzima fosfoglucosisomerase, constatou-se dois locos (Figura 6). O loco Pgi1 migrou mais no gel e houve polimorfismo, o que possibilitou separar com segurança os acessos. No loco Pgi2 observou-se menor migração e a presença de três bandas, que foi invariável em todas as plantas caracterizadas.

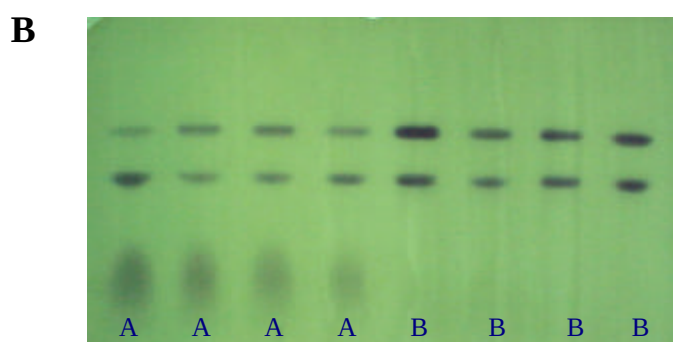
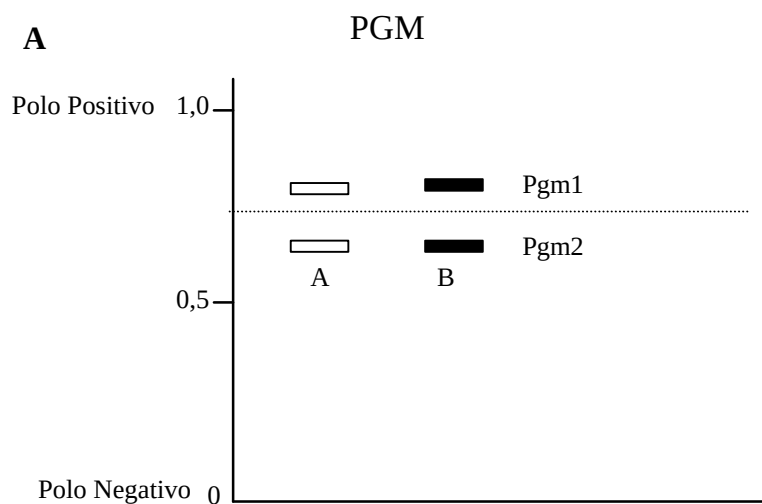


Figura 4- Representação esquemática com base na mobilidade relativa das bandas (MR), dos fenótipos isoenzimáticos da enzima fosfoglucomutase (PGM), observadas nas análises eletroforéticas de amostras obtidas de folhas de *Eclipta alba* (A). Imagem de um gel revelando a atividade da enzima PGM a partir de amostras de folha de *Eclipta alba* (B).

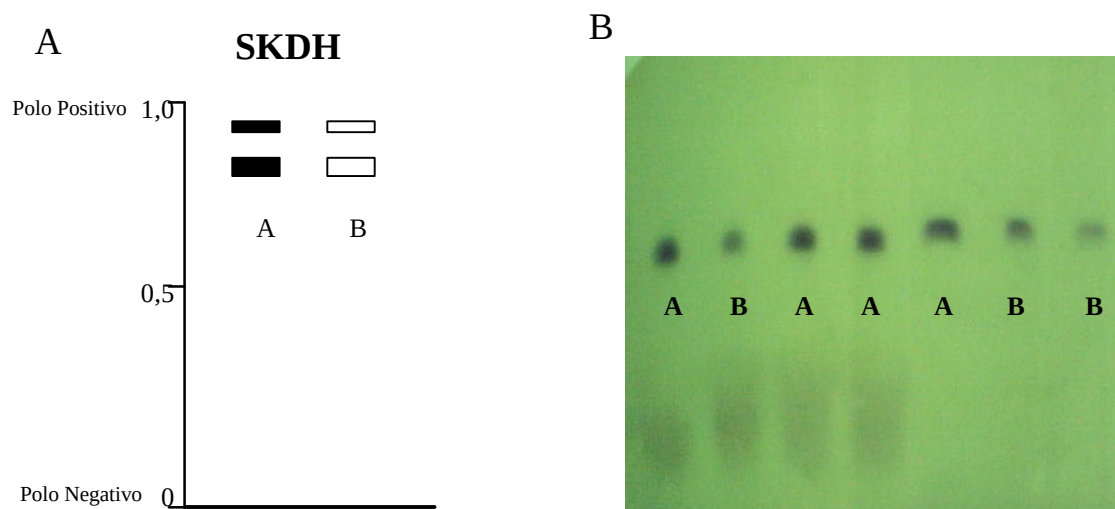


Figura 5 - Representação esquemática, com base na mobilidade relativa das bandas no gel (MR), dos fenótipos isoenzimáticos da enzima SKDH, observada nas análises eletroforéticas de amostras obtidas de folhas de *Eclipta alba* (A). Imagem de um gel revelando a atividade da enzima (B).

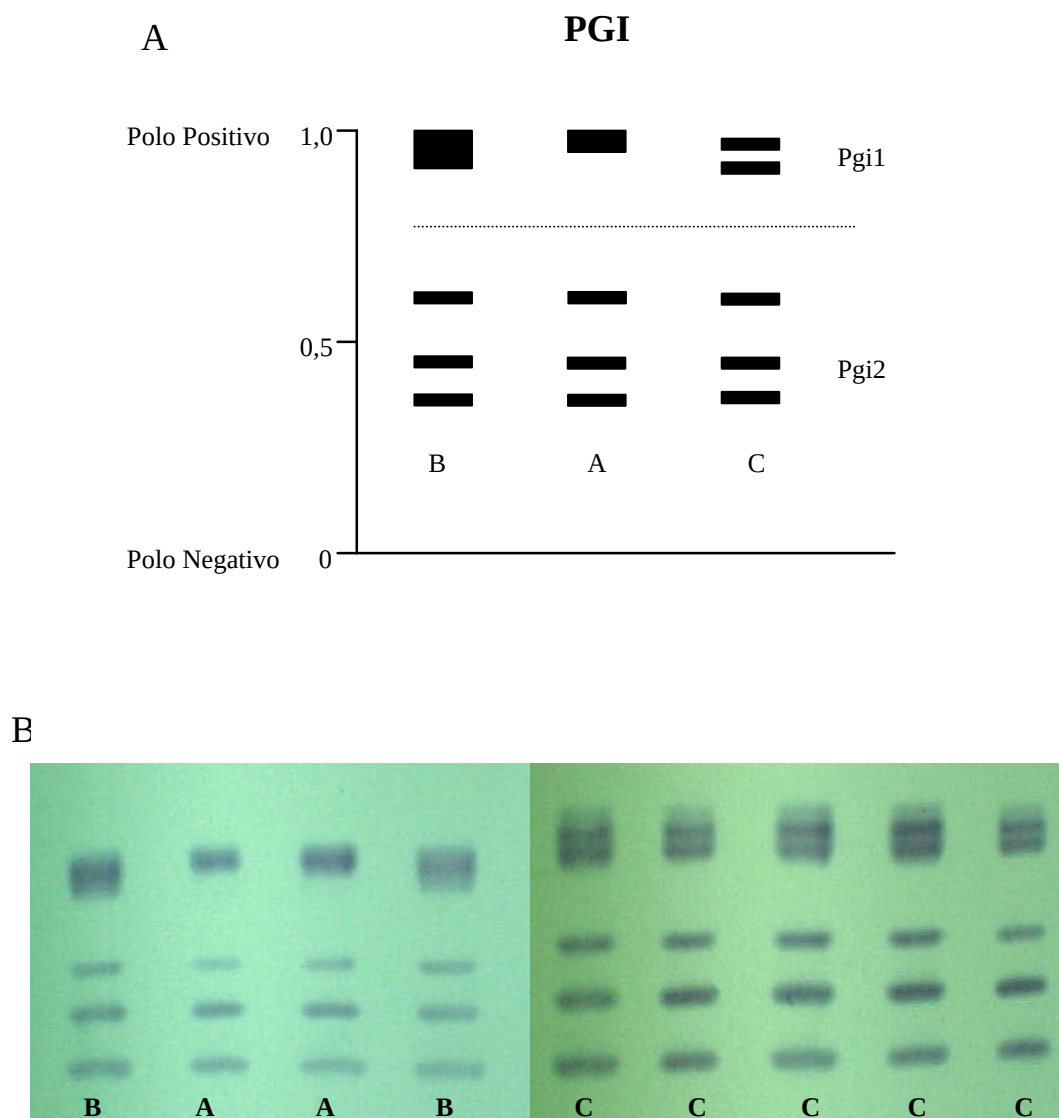


Figura 6- Representação esquemática, com base na mobilidade relativa das bandas no gel (MR), dos fenótipos isoenzimáticos da enzima PGI, observada nas análises eletroforéticas de amostras de folhas de *Eclipta alba* (A). Imagem de um gel revelando a atividade da enzima PGI a partir de amostras obtidas de folhas de *Eclipta alba* (B).

De acordo com BRUNE *et al.* (1998) e ALFENAS *et al.* (1991), esta enzima é composta de duas subunidades, sendo, assim, denominada dimérica, de modo que em heterozigotos deve ter três bandas, fato não encontrado neste trabalho em relação ao loco Pgi1. No padrão de banda A detectou-se uma banda estreita de cor intensa e de mobilidade relativa igual a 1,0. O mesmo aspecto foi observado no padrão B, mas a banda era muito larga e foi considerada como duas bandas sobrepostas na análise de divergência genética. Já no padrão C, observaram-se duas bandas finas e nítidas no loco Pgi1, que foram consideradas 3 bandas, também com o objetivo de facilitar a análise de divergência genética. O polimorfismo deste loco permitiu separar os acessos: padrão A- CEN, JAN, SAC, SIL, CV, HEN; padrão B- CEN; e padrão C- AFR e CEM. No Quadro 6, nota-se que o loco Pgi1 com três padrões isoenzimáticos separou os acessos, e o único acesso que mostrou variabilidade entre os indivíduos foi o CEN.

Quadro 6 - Distribuição de oito acessos de *Eclipta alba* nos padrões de bandejamento da enzima fosfoglucoisomerase (PGI)

Padrão	Bandas						Acessos
	Pgi1			Pgi2			
	1	2	3	4	5	6	
A	1	0	0	1	1	1	CEN, CV, JAN, SAC, SIL, HEN
B	1	1	0	1	1	1	CEN
C	1	1	1	1	1	1	CEM, AFR

4.1.4. Malato desidrogenase (MDH)

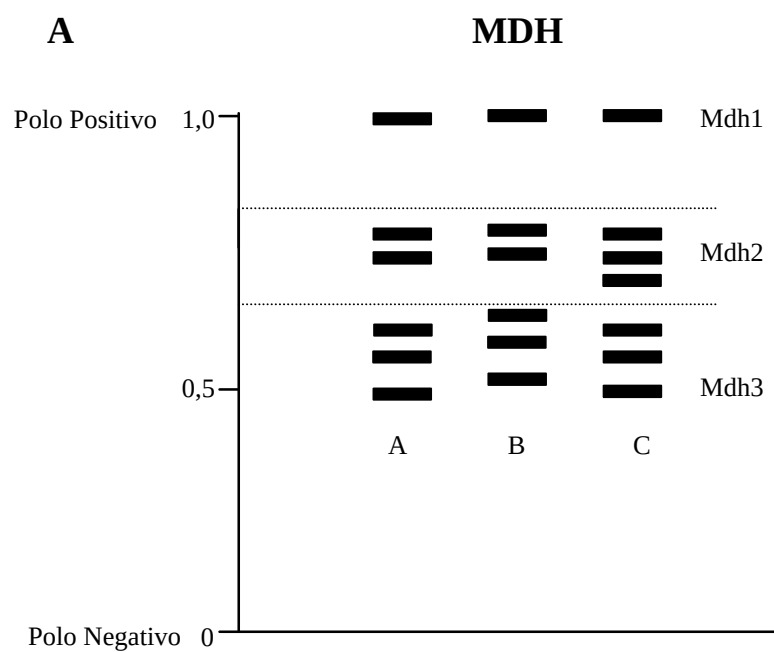
Na enzima malato desidrogenase, houve formação de três regiões de migração (Figura 7). Na região I, correspondente ao loco Mdh 1 monomórfico, os fenótipos isozimáticos observados demonstraram a presença de enzima monomérica, não demonstrando polimorfismo, apenas diferença na intensidade de coloração da banda o que, de certa forma, facilitou a separação dos acessos.

Na região 2, correspondente ao loco Mdh2 detectou-se dois padrões, o que permitiu facilmente separar os acessos (Quadro 7). Provavelmente é dimérica, mas pelo fato de não detectar os dois homozigotos, tornou-se difícil concluir sobre o comportamento da enzima. Esta dificuldade foi também encontrada por outros autores, quanto a algumas regiões de migração dessa enzima.

No loco Mdh3, houve formação de três bandas com mobilidades relativas diferentes, o que também favoreceu a formação dos padrões isoenzimáticos (Quadro 7). A ocorrência de enzimas monoméricas e diméricas, no sistema MDH, foi constatada por SCHUELTER (1996), em trabalho com pimenta, e por SOUZA (1996) e LOPES (1999), ambos trabalhando com acerola. Da mesma forma que os autores citados, na região de menor migração, observou-se 3 bandas monomórficas.

O estudo de herança das isoenzimas de malato desidrogenase, em plantas, tem sido considerado complexo, uma vez que essas isoenzimas encontram-se associadas a diferentes estruturas multicelulares, como mitocôndrias, microcorpos ou citosol, podendo promover a sobreposição de bandas (ARULSEKAR *et al.*, 1986; HARRY, 1983). Além disso, as isoenzimas do sistema MDH são, normalmente, tetraméricas, ainda que formas monoméricas e diméricas possam ocorrer (PASTEUR *et al.*, 1988).

A MDH de microcorpos tende a migrar muito devagar ao anodo, provavelmente devido a seu caráter básico e à tendência para formar agregados com alto peso molecular. Em contraste, as MDHs da mitocôndria e as citosólicas são relativamente ácidas, migrando rapidamente para o anodo (NEWTON, 1983).



B

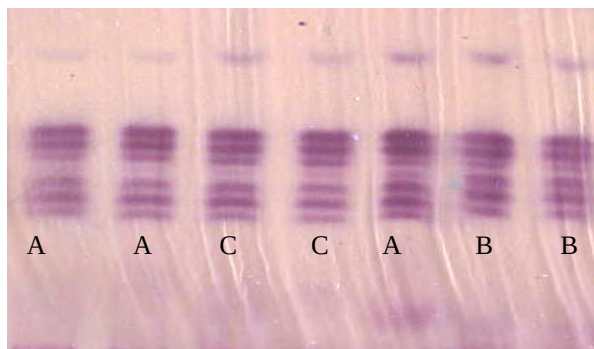


Figura 7- Representação esquemática, com base na mobilidade relativa das bandas no gel (MR), dos fenótipos isoenzimáticos da enzima MDH, observadas nas análises eletroforéticas de amostras obtidas de folhas de *Eclipta alba* (A). Imagem de um gel revelando a atividade da enzima MDH a partir de amostras obtidas de folhas de *Eclipta alba* (B).

Quadro 7 - Distribuição dos 8 acessos de *Eclipta alba* nos padrões de bandejamento da enzima malato desidrogenase (MDH).

Padrão	Bandas								Acessos
	Mdh1	Mdh2			Mdh3				
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	1	1	1	0	0	1	1	1	CEN, JAN, CV, SAC, SIL, HEN,
B	1	1	1	0	1	1	1	0	CEN
C	1	1	1	1	0	1	1	1	AFR, CEM

4.1.5. Esterase

No sistema esterase, foram propostos três locos, ou seja, Est1, Est2 e Est3 (Figura 8). No loco Est1, há apenas uma banda, com variação apenas na intensidade de coloração suficiente para separar os acessos, desde que atente que todas as plantas analisadas estejam na mesmo estágio ontogenético. O loco Est2, região mediana, não foi considerado por causa das bandas de coloração de intensidade fraquíssima, enquanto no loco Est3 ocorreram duas e três bandas com mobilidades diferentes, facilitando bastante a separação dos acessos. Portanto, neste sistema detectou-se bastante polimorfismo, observando quatro bandas e possibilitando a formação de 4 padrões isoenzimáticos (Quadro 8).

No sistema isoenzimático esterase da acerola, houve variação na espessura e intensidade de coloração de banda (SOUZA, 1996). Esta variação ocorre nas isoenzimas em razão do grau de ploidia, revelando-se no gel com maior número de bandas ou com aumento da intensidade e da espessura causado pela dose dos alelos presentes (GOTTlieb, 1982). Em espécies poliplóides, como trigo e centeio, foi possível detectar algumas bandas de esterase de coloração e espessura diferenciadas, mas com mesma mobilidade (SALINAS e BENITO, 1985).

Em *Eclipta alba*, a variação na intensidade de coloração de banda não ocorre devido ao grau de ploidia, pois, conforme TRIVEDI e RAJESH (1984), o número de cromossomos da espécie é $2n = 22$ cromossomos, não tendo sido relatado poliplóides. Esses autores encontraram duas populações, que diferiam morfológicamente, mas as

diferenças citogenéticas estavam relacionadas à posição do centrômero, ao comprimento total do cromossomo e T.F.%. Na população Ea 0776, o comprimento total do cromossomo foi 52,05 μm , sendo cinco pares metacêntricos, quatro pares submetacêntricos e dois acrocêntricos, enquanto na população Ea1476 com comprimento cromossômico total de 69,75 μm , foram quatro pares metacêntricos, cinco pares submetacêntricos e dois pares acrocêntricos. MEHRA *et al.* (1965) enfatizam que o número básico 11 deriva de séries ascendentes, a partir de 6, 8 e 9, na tribo Heliantheae.

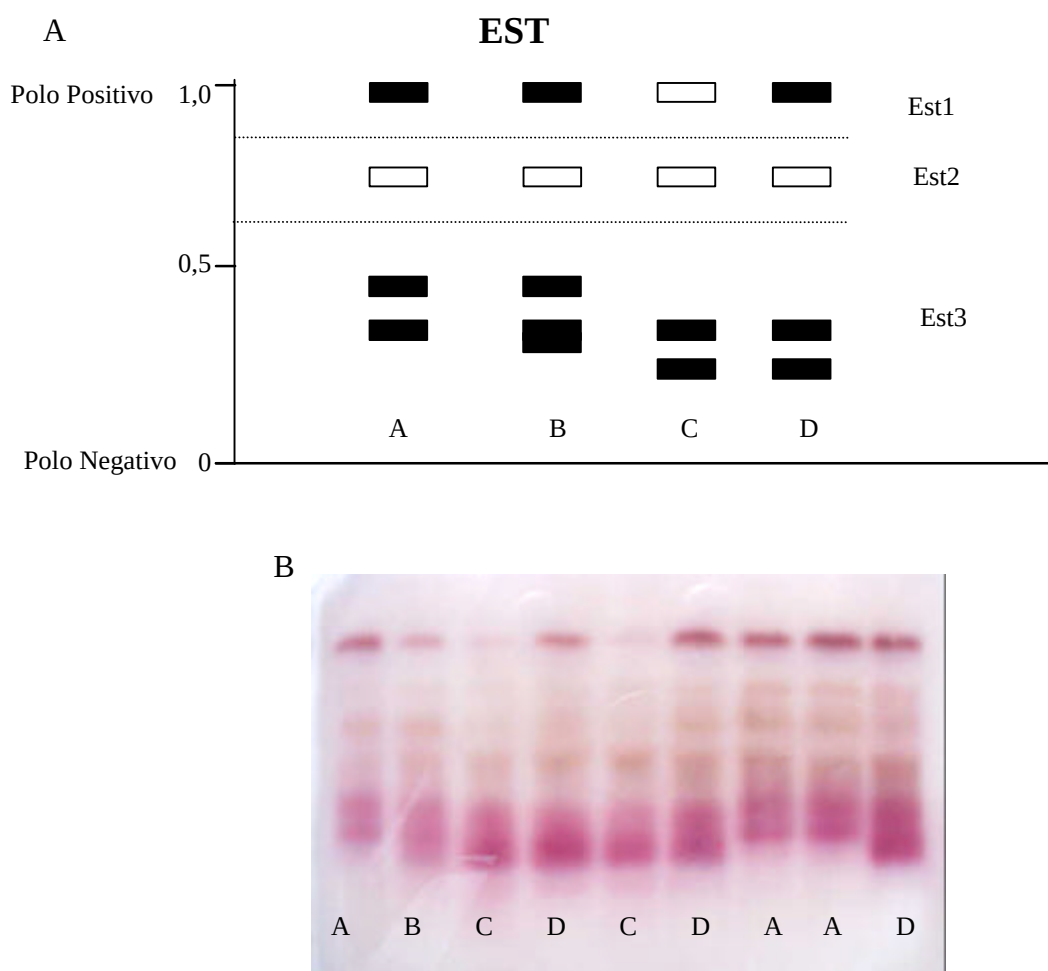


Figura 8 -Representação esquemática, com base na mobilidade relativa das bandas no gel (MR), dos fenótipos isoenzimáticos da enzima EST, observadas nas análises eletroforéticas de amostras obtidas de folhas de *Eclipta alba* (A). Imagem de um gel revelando a atividade da enzima EST a partir de amostra obtidas de folhas de *Eclipta alba* (B).

Quadro 8 - Distribuição dos oito acessos de *Eclipta alba* nos padrões de bandejamento da enzima esterase (EST)

Padrão	Bandas					Acessos
	Loco Est1	Loco Est2	Loco Est3			
	1	2	3	4	5	
A	1	1	1	1	0	CEN
B	1	1	1	1	1	CEN
C	0	1	0	1	1	AFR, CEM
D	1	1	0	1	1	JAN, CEN, SIL, CV, SAC, HEN

Dos cinco sistemas, quatro demonstraram ser polimórficos, dos quais o sistema esterase foi o mais polimórfico, fato este também verificado por LOPES (1997), BALVLEVÉ (1992) e OLIVEIRA (2001). Tal fato revela o potencial de uso das isoenzimas como marcadores genéticos, em trabalhos com erva-botão. Estes marcadores são úteis, por exemplo, em trabalhos de caracterização de germoplasma, divergência genética, identificação do modo de reprodução da espécie de interesse, dentre outros. Nos sistemas que permitem inferência sobre o tipo de herança, o potencial é mais amplo, podendo estes serem utilizados em estudos de genética de populações e na estimativa da taxa de cruzamento natural da espécie.

Da mesma forma que em PGI, no acesso CEN foi detectado maior número de padrões isoenzimáticos, refletindo maior variabilidade dentro deste acesso, fato este que ocorre devido à proximidade deste acesso com o acesso CEM e, possivelmente, esses novos padrões sejam híbridos. Nos outros acessos, não detectou-se variabilidade dentro, mas nos sistemas PGM, PGI, MDH e EST observou-se variação entre os acessos.

4.2. Análise da divergência genética por padrões isoenzimáticos

A partir dos dados isoenzimáticos, verificou-se a presença de padrões isoenzimáticos, na maioria dos indivíduos analisados. Por esta razão, procedeu-se ao

estudo de agrupamento baseado na similaridade genética, envolvendo a combinação dos indivíduos tomados dois a dois. A estimativa de similaridade foi obtida pelo Índice de Similaridade de Jaccard e, a partir desta, calculou-se o Complemento Aritmético do Índice de Similaridade de Jaccard, obtendo-se a estimativa da medida de dissimilaridade entre os indivíduos.

Após a aplicação do método de Agrupamento por Otimização de Tocher, foi possível a formação de quatro grupos (Quadro 9): grupo I- contendo dois indivíduos do acesso CEN; grupo II- contendo também dois indivíduos do acesso CEN; grupo IV- com apenas um indivíduo do acesso CEN e todos os indivíduos dos acessos CV, JAN, SAC, HEN e SIL. No grupo III, estão todos os indivíduos dos acessos CEM e AFR. Desta forma, conclui-se que *Eclipta alba* apresenta razoável grau de divergência genética, tanto entre quanto dentro dos acessos analisados.

As informações referentes às análises fitoquímicas encontram-se no capítulo 2 deste estudo e foram aqui utilizadas para visualizar a importância e entendimento dos dados isoenzimáticos. Após análise de variância quanto ao teor de wedelolactona na folha (mg/g de matéria seca), detectou-se diferença significativa entre os acessos e procedeu-se ao teste de comparação de grupos de médias (Quadro 10), observando-se a formação de dois grupos fitoquímicos, um com média de 0,6510 (plantas do grupo isoenzimáticos III, acessos AFR e CEM) e outro com médias entre 3,9367 e 5,4969 (plantas dos grupos isoenzimáticos I, II, IV, acessos CEN, CV, JAN, SAC, HEN, SIL).

Conforme Quadro 10, nos acessos dos grupos isoenzimáticos I, II e IV ocorreu rendimento do princípio ativo de 6 a 8,4 vezes maior do que nos acessos do grupo isoenzimático III. Desta forma, os marcadores genéticos isoenzimáticos em *Eclipta alba* mostraram ser ferramenta auxiliar à distinção de acessos e no controle de qualidade de matéria-prima.

Quadro 9 - Análise de agrupamento, pelo método de Otimização de Tocher, de indivíduos de *Eclipta alba* a partir de dados isoenzimáticos

Grupo	Padrão esterase	Acessos	Indivíduos
I	A	CEN	1 e 4
II	B	CEN	2 e 5
III	C	AFR, CEM	21-22-23-24-25-31-32-33-34 e 35
IV	D	CEN, SAC, CV, JAN, SIL, HEN	3-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-26-27-28-29-30-36-37-38-39 e 40

Quadro 10 - Valores médios do conteúdo de wedelolactona na folha (mg/g de matéria seca) de *Eclipta alba* (L.) Hassk, grupos isoenzimáticos e rendimento

Acessos	Wedelolactona	Grupos isoenzimáticos	Rendimento
CEN	3,9367 A	I, II, IV	6x
JAN	5,3510 A	IV	8x
CV	4,9059 A	IV	7,4x
SAC	4,0500 A	IV	6,2x
AFR	0,6390 B	III	
HEN	5,4969 A	IV	8,4x
CEM	0,6649 B	III	
SIL	4,3981 A	IV	6,7x

Grupos de médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott.

5 RESUMO E CONCLUSÕES

Visando caracterizar a variabilidade de oito acessos de *Eclipta alba* (L.) Hassk, foram feitas análises isoenzimáticas de 40 indivíduos, utilizando os sistemas PGM, SKDH PGI, MDH e EST, sendo que os três últimos apresentaram polimorfismo suficiente, permitindo a análise de agrupamento.

Desta forma, os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- 1- Em *Eclipta alba*, as análises isoenzimáticas revelaram variabilidade.
- 2- Detectaram-se polimorfismos nos sistemas isoenzimáticos: PGM, PGI, MDH e EST.
- 3- A folha, no estágio ontogenético de 2 meses de idade, a partir de semente, foi o órgão e a época eleitos no estudo isoenzimático em *Eclipta alba*.
- 4- O polimorfismo revelado pelos sistemas PGM, PGI, MDH e EST possibilitou a separação dos acessos de *Eclipta alba* em quatro grupos que, conforme o método de Otimização de Tocher, constituíram: grupo I- dois indivíduos do acesso CEN; grupo II – dois indivíduos do acesso CEN; grupo III – todos os indivíduos dos acessos CEM; e AFR e grupo IV- um indivíduo do acesso CEN e todos os indivíduos dos acessos SAC, CV, JAN, HEN e SIL, demonstrando, desta forma, variabilidade genética.
- 5- Houve variação entre os indivíduos do acesso CEN, o que ocorreu por que o mesmo foi colhido próximo ao acesso CEM, indicando a ocorrência de fecundação cruzada.

- 6- Nas plantas dos grupos isoenzimáticos I, II e IV, detectou-se produção de wedelolactona, nas folhas de 6 a 8,4 vezes maior do que nas plantas do grupo isoenzimático IV. Desta forma, por meio do uso de isoenzimas, pode-se distinguir os acessos quanto à produção de princípios ativos de interesse em *Eclipta alba*.

CAPITULO 2

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE OITO ACESSOS DE *Eclipta Alba* (L.) HASSK

1. INTRODUÇÃO

É provável que a utilização das plantas como medicamento seja tão antiga quanto o próprio homem (MARTINS *et al.*, 1994). No museu Britânico há registro de receitas sobre este uso datando de 3700 AC (GRAVES, 1945). Não só as plantas medicinais mas, também, as aromáticas tiveram e têm grande importância para as civilizações. É difícil determinar a época em que o homem começou a utilizar essas plantas; provavelmente tenha sido no período pré-histórico (ATAL e KAPUR, 1982).

Eclipta alba (H.) Hassk, conhecida popularmente como agrião-do-brejo ou erva-botão, é pertencente à família Asteraceae, subfamília Asteroideae, tribo Heliantheae. A planta é invasora de lavouras de arroz de várzeas, de pastagens e culturas perenes (LORENZI, 2000). Estudos científicos indicam que esta espécie tem ação antiofídica (MELO *et al.*, 1994), tendo sido encontrados os princípios ativos: cumarinas, flavonóides e taninos (LEAL *et al.*, 2000). Dentre os flavonóides, destacam-se dois coumestanos, isto é, a wedelolactona e a demetilwedelolactona (PEREIRA *et al.*, 1997). MATOS, (1994) recomenda seu uso no tratamento dos estados de queda das defesas orgânicas, durante a ocorrência de doenças infecciosas (como terapêutica auxiliar), durante a administração de medicamentos de ação tóxica

para o fígado, ou após o uso de substâncias tóxicas e, especialmente, no tratamento em casos de hepatite e suas consequências.

A variabilidade em populações naturais de plantas e animais é a base da resistência perante as pressões ambientais, possibilitando maximizar a adaptabilidade individual. Os fitofármacos são produzidos pelo vegetal, têm funções bastante específicas e são, geralmente, provenientes do metabolismo secundário com função relacionada à ecologia da planta (LUCKNER, 1972).

Há grande flexibilidade quimiossintética nos vegetais ao produzirem metabólitos secundários. Segundo BROWN JR. (1988), vários fatores podem influenciar a produção de substâncias do metabolismo secundário, destacando-se os genéticos e os fisiológicos, sendo que os fatores bióticos e abióticos são considerados ecológicos.

O objetivo deste trabalho é caracterizar morfo-fitoquimicamente oito acessos de *Eclipta alba* (L.) Hassk, para fins de sua classificação taxonômica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Variabilidade química em plantas medicinais

A variabilidade genética é inerente aos organismos vivos, capacitando-os a adaptarem-se aos diversos ambientes e interagirem com o meio, o qual exerce influência na capacidade de perpetuação de cada ser vivente (PATERNIANI, 1988). A variabilidade genética constitui a fonte primária das adaptações e da evolução das espécies (INGROUILLE, 1992), bem como do melhoramento genético, pois, promove combinações favoráveis. Consequentemente, na ausência de variabilidade, o melhoramento é impraticável, pois o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende da variabilidade genética dos genitores (WELSH, 1981).

No caso de espécies medicinais, devido à diversidade química, exige-se cuidado na generalização das propriedades medicinais e, ou tóxicas de indivíduos de uma mesma espécie. Por esta razão, uma amostra coletada na Floresta Amazônica pode ter propriedades terapêuticas distintas, ou com intensidade diferente, daquela amostra da mesma espécie coletada na Mata Atlântica.

Esta variabilidade pode ser de natureza genética ou ambiental. Variações genéticas podem ser detectadas com procedimentos apropriados e os indivíduos portadores podem ser preservados em coleções de germoplasma.

Considerando as diferenças qualitativa e quantitativa de óleo essencial em camomila, CORREA JR. (1995) descreveu a cultivar brasileira ‘Mandirituba’, a qual

continha percentual de óleo de 0,86% nos capítulos florais, situando-se acima da média mundial (0,70%). Quanto à composição do óleo essencial detectaram-se 27,17-35,02% de camazuleno (média mundial = 17%) e 7,13-11,72% de bisabolol, inferior, portanto, à média mundial que é de 16,72%.

As diferenças morfológicas, bioquímicas e químicas em *Ocimum seloi*, entre dois acessos, permitiram MARTINS (1996), propor duas variedades taxonômicas.

CASTRO (1998), trabalhando com *Leonurus sibiricus* L. de flor branca e de flor roxa, utilizou padrões isoenzimáticos, anatomia da epiderme e do mesófilo e germinação de sementes, que possibilitaram a separação dos dois fenótipos sem que houvesse diferença fitoquímica. CASTRO (1998) detectou diferença no conteúdo de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.), e pelos padrões isoenzimáticos do sistema esterase, houve variabilidade, entre e dentro dos acessos.

A única fonte de matéria-prima pode estar numa espécie silvestre, por exemplo, a ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) produz emetina e cefelina, usados na produção de fitoterápicos amebicidas, expectorantes e eméticos. ASSIS (1992), trabalhando com três populações de *Cephaelis ipecacuanha*, população 1 do Mato Grosso e Rondônia, população 2 da Mata Atlântica (BA, ES, RJ e MG) e população 3 da América Central e Colômbia, avaliou nove caracteres morfológicos por meio de análise dos componentes principais e não detectou variabilidade significativa entre as populações não sendo possível o reconhecimento de taxa intra-específica.

As populações de ipeca na América Central, Colômbia e Venezuela foram consideradas *Cephaelis acuminata* Karsten (TREASE e EVANS 1989), mas HATFIELD *et al.* (1981) e GUPTA *et al.*, (1986) propuseram que as diferenças, quanto à proporção dos alcalóides, são atribuídas a fatores ambientais ou genéticos, sendo admitidas como única espécie, mesmas conclusões de (ASSIS, 1992).

No Quadro 1, pode-se observar que há variação no conteúdo de emetina, em *Cephaelis ipecacuanha*, entre os acessos (FRANÇA, 2000). Assim, as plantas devem ser corretamente caracterizadas para posterior seleção, usando-se por exemplo marcadores genéticos bioquímicos ou moleculares. É possível o sucesso no melhoramento genético de ipeca pela seleção, pois, conforme MARTINS (2000) trata-se de espécie alógama. Desta forma, observa-se que a grande variabilidade existente

nas plantas medicinais, quanto os princípios ativos, deve ser caracterizada. Deve-se esgotar os procedimentos convencionais de melhoramento, antes de aplicar tecnologias sofisticadas e caras como, por exemplo, o uso de transformação genética.

Quadro 1 - Variações nos teores de emetina em raízes de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) a. Richard, coletadas em diferentes localidades

Acesso	Origem (UF)	Teor de emetina (%)
571.1-12	MT	1,53 fg
767.1-4	BA	2,24 b
594.1-137	MT	2,67 a
751.1-5	MG	2,36 b
610.1	RO	1,00 j
607.1-53	RJ	1,42 gh
760.1-53	ES	1,41 gh
595.1-115	MT	2,17 bc
596.1-76	MT	1,92 de
602.1-51	MT	1,30 hi
745.1-4	RJ	0,48 k
712.1-34	MT	1,98 cd
590.1-44	MT	1,72 ef
702.1-11	MT	1,19 ij
Cultura de tecido	PA	1,70 f
Cultura de tecido	MT	1,69 f

* Valores médios de emetina, seguidos pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey. (Fonte: FRANÇA, 2000).

2.2. A necessidade de caracterização

Caracterizar consiste na descrição e registro dos marcadores morfológicos, citogenéticos, fitoquímicos e moleculares pouco influenciados pelo ambiente. A caracterização dos acessos dos bancos de germoplasma é fundamental, tendo em vista a utilização em programas de pesquisa (VALOIS *et al.* 1996). A caracterização de acessos bem sucedida dos acessos envolve várias etapas, ou seja, a correta identificação botânica, o cadastro dos acessos e descrições. As descrições da

variabilidade podem ser feitas baseando-se nos aspectos morfológicos, fenológicos, reprodutivos e químicos, bem como no DNA e seus fragmentos, genes mutantes, cromossomos e, finalmente, nos seguintes marcadores genéticos: isoenzimas, (*Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Randon Amplified Polymorphic* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR), *Sequence Tagged Site* (STS) e microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

A variação no conteúdo do princípio ativo de plantas medicinais pode ocorrer, ao longo de diferentes eixos temporais e espaciais, tanto genéticos (indivíduo, população, taxonomia), quanto ecológico (pressões de variação em clima ou solos, parasitas, predadores, competidores, patógenos) e fisiológicos (estádio de desenvolvimento, ritmo estacional ou circadiano), alocação de energia, caminhos metabólicos alternativos, hormônios, estado reprodutivo e entre órgãos (BROWN JR., 1988).

Em plantas medicinais, é imprescindível a caracterização química que separe os acessos, quanto às substâncias farmacológicas, antes do estabelecimento de um programa de melhoramento. Em geral, esses acessos mantêm sua composição e teor de princípios ativos, mesmo quando cultivados em ambientes similares, sendo denominados quimiótipos, raças químicas ou quimodemes (HEAGNAUER, 1982). HAY e SVOBOBA (1993) definiram quimiótipo como populações quimicamente distintas, dentro da mesma espécie. No entanto, não se conhece o número de quimiótipos por causa da influência dos fatores ambientais e genéticos. O termo quimiótipo deve ser aplicado, quando não é possível a distinção morfológica.

FIGUEIREDO-RIBEIRO *et al.* (1978) detectaram, entre duas populações de *Ocimum nudicaule*, grande divergência nos constituintes do óleo essencial, havendo também diferenças morfológicas, o que possibilitou caracterizar cada população como variedade botânica e não como quimiótipo.

Marcadores desta natureza podem ser úteis e auxiliar, efetivamente, a seleção. A associação de caráter qualitativo (marcador morfológico) com caráter quantitativo é a base da utilização de marcadores nos caracteres associados à produção (AMARAL *et*

al., 1999). BRANDLE *et al.* (1998) detectaram a existência de plantas de estêvia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii) com produção diferenciada dos princípios adoçantes, isto é, quanto a esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii, houve correlação entre os caracteres morfológicos (hábito de crescimento e tipo de folha) e o conteúdo de esteviosídeo (TATEO *et al.*, 1998).

WALLAART *et al.* (2000) evidenciaram a existência de dois quimiótipos de *Artemisia annua*, baseando-se nas diferenças dos teores de artemisinina e seus bioprecusores nos genótipos estudados, demonstrando que populações oriundas do Vietnã produzem mais artemisinina do que as originárias da China. Esses resultados reforçam a existência de variação genotípica dentro da espécie *Artemisia annua*, a qual foi observada por CHEN e ZHANG (1987) e MAGALHÃES (1996). Também VEIT *et al.* (1989) detectaram dois quimiótipos em cavalinha (*Equisetum arvense*).

A caracterização de camomila disponível hoje, em 4 quimiótipos, baseou-se na composição do óleo essencial e, desta forma, a maior parte da camomila européia é do tipo oxidobisabolol A (tipo A). No tipo em que predomina o oxidobisabolol B (tipo B), enquadra-se a camomila Argentina; o tipo C também denominado Tipo (-)- α -bisabolol ou, simplesmente, bisabolol refere-se às flores de camomila, cujo óleo essencial é composto aproximadamente por 50% de α -bisabolol, sendo originária principalmente da Espanha. A camomila brasileira foi considerada quimiótipo D, onde o conteúdo de óleo essencial constitui-se da mistura de oxidobisabolol A e B, bem como do bisabolol, em teores aproximadamente iguais (CORRÊA JUNIOR, 1998).

Quando se ofertam ao mercado, plantas medicinais, aromáticas e condimentares, o maior interesse das indústrias transformadoras consiste em adquirir matéria-prima concentrada de princípios ativos. Diferentemente ocorre no caso de outras culturas, quando se espera quantidade de biomassa verde ou seca, grãos, etc, não tendo a preocupação fundamental com sua composição química (CORRÊA JUNIOR, 1998).

A produção de fitofármacos é quantitativa, influenciada por grande número de genes, cada qual com pequeno efeito no fenótipo e também recebe efeito do ambiente. Neste caso, à medida que é aumentado o número de alelos envolvidos, aumenta-se o número de fenótipos e tem-se na geração F₂ a curva de distribuição contínua. Como

exemplo, tem-se os resultados de SHUMACHER (1991) que, trabalhando com 3213 plantas de *Solanum laciniatum*, constatou plantas com excepcional produção de 4 a 5% de solasodina no peso da matéria seca, enquanto a média era de 1,6%, conforme a Figura 1.

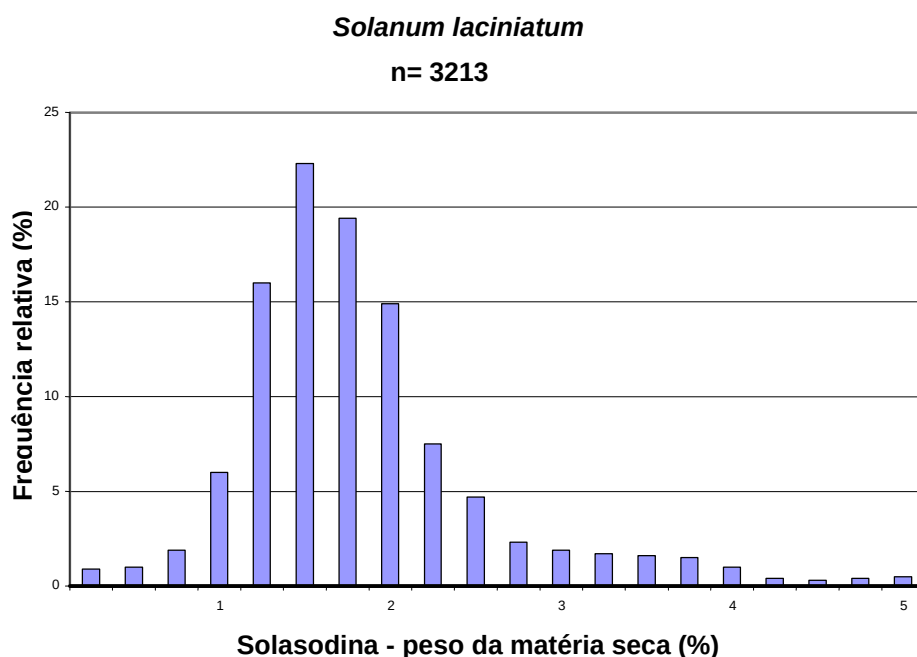


Figura 1 - Distribuição de frequência da concentração de solasodina (% peso da matéria seca) em folhas de *Solanum laciniatum*. (Adaptado de SHUMACHER, 1991).

Desta forma, os estudos genéticos são realizados a partir das estimativas da média, variância, coeficientes de regressão, correlação, etc. Com relação à composição e conteúdo de compostos farmacativos, encontraram-se altas herdabilidades nestas substâncias, facilitando o melhoramento por seleção (PALEVITCH, 1991) e (FRANZ, 1993). O método da seleção também foi aplicado em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, em que a herdabilidade do conteúdo de esteviosídeo foi de 83,3 (BRANDLE e ROSA, 1992).

Segundo GOTTLIEB *et al.* (1996), o estudo sobre a diversidade genética de plantas medicinais, apenas, por critérios morfológicos, ignorando suas relações com o metabolismo e outros níveis organizacionais do vegetal, dificulta o entendimento da biodiversidade e implica nova abordagem. Assim, OLIVEIRA e MARTINS (1998) consideram que a abordagem compreensiva, em muitas espécies medicinais importantes, teria que envolver o conhecimento multidisciplinar, buscando distinguir os componentes genéticos e ambientais responsáveis pela variação entre os indivíduos e entre as populações. Três seriam as avaliações que constituiriam os componentes desta abordagem não-convencional: 1) análise da diversidade genética intra e interpopulacional, por meio de marcadores moleculares; 2) quantificação dos compostos mais importantes, por meio de técnicas cromatográficas; e 3) mensuração das características morfológicas internas e externas, obtidas de modo tradicional.

A análise dos dados de diversidade genética, bioquímica e morfológica, bem como as correlações que poderiam existir entre as três categorias de dados poderiam, assim, gerar subsídios à identificação de populações divergentes, com relação às características analisadas. Uma vez identificadas, as populações poderiam ser amostradas apropriadamente e constituir germoplasma tipo nuclear, que representasse variabilidade genética ainda disponível (OLIVEIRA e MARTINS, 1998).

Tais coleções nucleares, detalhadamente caracterizadas quanto à diversidade genética e perfil fitoquímico-morfológico de seus membros, teriam inúmeras utilizações. Dentre elas estaria a possibilidade de fornecer germoplasma geneticamente valioso e, ou contrastante, aos programas de melhoramento genético. Poderiam também servir como fonte de germoplasma na reintrodução da espécie em unidades de conservação, preservando, assim, não somente exemplares avulsos da espécie em si, mas, também, a respectiva diversidade natural (OLIVEIRA e MARTINS, 1998).

2.3. Plantas medicinais poliplóides

A variabilidade química decorre da presença de poliplóides naturais, como foi observado em capim-limão, em que existe correlação positiva entre a concentração de

óleo essencial nas folhas e os citotipos autopoliplóides 2x, 4x, 6x, demonstrando a importância preliminar da caracterização reprodutiva (citogenética).

DHAWAN e LAVANIA (1996), relatam que em 28 plantas medicinais autopoliplóides obtidas artificialmente, na maioria houve acréscimo substancial na concentração do metabólito secundário de interesse. Além do aumento na quantidade, pode também haver aumento qualitativo a ser explorado.

Exemplos de plantas medicinais poliplóides, nas quais detectou-se, acréscimo na produção de princípios ativos de interesse, são a camomila, papoula, mil-folhas e alfazema (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Da mesma forma, já é possível a obtenção dos alopoliplóides e, às vezes, a heterose química tem sido a grande vantagem. Um exemplo foi observado na obtenção do anfidiplóide de *Ocimum gratissimum* (rico em eugenol) e *Ocimum viride*, (rico em timol) com altas concentrações dos dois princípios ativos (DHAWAN e LAVANIA, 1996), os quais devem estar bem caracterizados.

2.4. Plantas medicinais híbridas

Também é importante a caracterização dos híbridos em plantas medicinais, que existem de forma natural. As mentas e hortelãs comerciais são híbridos naturais. A vantagem de se trabalhar com híbridos em plantas medicinais deve-se à facilidade em obter quimiótipos farmacológicos diversos e também pelo fato de que a maioria delas tem ciclo curto. Além disso, são altamente produtivas quanto às classes de princípios ativos e, ou constituintes majoritários, sendo destinados a desenvolver variedades ou, ainda, prestam-se aos estudos genéticos (AMARAL *et al.*, 1999).

Na família Asteraceae, o interesse pela *Artemisia annua* é devido ao antimalárico artemisinina. O trabalho de pesquisa desenvolvido na MEDIPLANT (Suíça) e no CPQBA-UNICAMP (Brasil) baseia-se na obtenção de híbridos, com posterior seleção e melhoramento, priorizando genótipos de florescimento tardio alto, conteúdo de artemisinina e alta produção de biomassa (AMARAL *et al.*, 1999).

Segundo AMARAL *et al.* (1999), na família Labiatae há exemplo dos híbridos naturais *Lavandula x intermedia*, *Mentha x citrata*, *Mentha x gentilis*, *Mentha x*

piperita, *Mentha x verticillata* e *Mentha x vilosa*. Destacam-se como híbridos interespecíficos artificiais: *Mentha aquatica x Mentha longifolia*, *Mentha rotundifolia x Mentha longifolia*, *Ocimum americanum x Ocimum basilicum*, *Ocimum basilicum x Ocimum cannum*, *Ocimum basilicum x Ocimum kilimanscharicum*, *Ocimum gratissimum x Ocimum viride*, *Ocimum suave x Ocimum gratissimum* e *Ocimum viride x Ocimum suave*. Os híbridos também ocorrem na família Apocynaceae naturalmente entre *Catharanthus logifolius x Catharanthus roseus* e artificialmente entre *Catharanthus roseus x Catharanthus trichophyllus*.

A caracterização correta da planta medicinal, aliada às técnicas agronômicas adequadas ao cultivo, oferece muitas vantagens, quando o objetivo é a produção de fitoterápicos eficazes. Dentre estas pode-se destacar a produção de medicamentos de custos acessíveis à população carente, ao mesmo tempo que poderia também reduzir os custos com a importação de drogas sintéticas. Além disso, o sistema de produção de plantas medicinais ofereceria matéria-prima idônea e de qualidade às indústrias farmacêuticas, reduzindo, também, o extrativismo (OLIVEIRA e MARTINS, 1998). A prática extrativista tem promovido a redução da diversidade genética de muitas espécies de importância medicinal (GARCIA *et al.*, 1996), inclusive levando a seu desaparecimento local ou à extinção (BIZÃO e CASALI, 2000).

A exploração dos recursos das plantas medicinais brasileiras não é uma atividade nova. Até o fim do século XIX, o Brasil cultivava e exportava a salsaparrilha (*Smilas spp*) e o jaborandi (*Pilocarpus spp*). No início do século XX, em São Paulo, o Horto Oswaldo Cruz cultivou extensivamente a erva-da-santa-maria (*Chenopodium ambrosoides* L.), enquanto o lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium* Koenig.) foi cultivado no Horto Botânico do Museu Paulista. Embora não praticando o cultivo sistemático, o Brasil já foi grande exportador de ipeca (PIRES, 1984). De acordo com (PEREIRA, 2000), 590 plantas medicinais estão registradas no Ministério da Saúde para comercialização e produção de fitoterápicos. Entretanto, há apenas dois relatos oficiais de cultivo, em larga escala, para atender à demanda industrial: o *Pilocarpus jaborandi*, no Maranhão e *Duboisia sp* no norte do Paraná. Tal fato revela que a maior parte das plantas medicinais brasileiras, se não a totalidade, estão sendo colhidas de forma extrativista, comprometendo a biodiversidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instalação do experimento

As plantas utilizadas neste trabalho são os oito acessos utilizados no Capítulo 1, cujas sementes foram germinadas em vasos contendo solo e esterco de curral curtido (4:1) em 04/10/2000. Vinte dias após a semeadura, as maiores plântulas de cada acesso foram transplantadas nos copos plásticos (300 mL), onde permaneceram até o plantio definitivo no campo.

O experimento de campo, foi instalado em 24/11/2000, no viveiro da UFV, na Vila Gianete, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Cada parcela foi constituída por uma planta, com espaçamento de 1,0 m entre linhas e 0,70 m entre plantas. Após o plantio, cobriu-se todo o experimento com sombrite por 7 dias, garantindo a adaptação das plantas. As características de fertilidade do solo, onde foi instalado o experimento podem ser confirmadas nas análises químicas, conforme Quadro 2.

Durante a condução do experimento, perdeu-se uma planta em três acessos de modo que cinco acessos permaneceram com 5 repetições e três com 4 repetições.

Quadro 2 - Resultados das análises química de quatro amostras de solo, provenientes do viveiro da UFV, Vila Gianette- Viçosa

Amostra	mg/dm ³			cmol _c /dm ³							(%)		dag/kg
	pH (H ₂ O)	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO
1	7,3	134,0	46	7,97	0,77	0,0	0,0	8,86	8,86	8,86	100	0	2,72
2	7,4	158,7	50	8,39	0,82	0,0	0,0	9,34	9,34	9,34	100	0	3,17
3	7,5	158,7	71	7,65	0,96	0,0	0,0	8,79	8,79	8,79	100	0	3,61
4	7,4	178,2	56	7,85	0,92	0,0	0,0	8,91	8,91	8,91	100	0	4,06
Média	7,4	157,4	56	7,96	0,86	0,0	0,0	8,97	8,97	8,97	100	0	3,39

pH em água, KCl e CaCl₂ – relação 1:25.

P e K – extrator Mehlich 1.

Ca, Mg e Al – extrator: KCl – 1 mol/l.

H + Al – extrator acetato de cálcio 0,5 mol/l – pH 7,0.

SB = soma de bases trocáveis.

(t) = capacidade de troca catiônica efetiva.

(T) = capacidade de troca catiônica a pH 7,0.

V = índice de saturação de bases

m = índice de saturação de alumínio

MO = matéria orgânica = C. org x 1,724 – Walkley-Back.

3.2. Caracteres avaliados e procedimentos na coleta de dados

- 1- Número de ramos laterais principais (NRLP): no momento da colheita, realizada em 24/01/2001, contou-se todos os ramos laterais principais oriundos do caule principal de cada planta.
- 2- Número médio de capítulos florais por axila (NMCapA): contaram-se todos os capítulos de cada axila, de cada planta, e tirou-se a média de capítulo, por axila, por planta.
- 3- Número de folhas jovens (NFJv): consideraram-se como folhas jovens aquelas com bom estado fisiológico e, desta forma, tomou-se o número por planta.
- 4- Número de folhas senescentes (NFSn): foram consideradas folhas senescentes aquelas secas ou amareladas, que também foram contadas.
- 5- Peso da matéria fresca do caule (PMFCa), peso da matéria fresca dos capítulos florais (PMFCap), peso da matéria fresca das folhas jovens (PMFFJv), peso da matéria fresca das folhas senescentes (PMFFSn). As plantas foram colhidas no

período da manhã e, após o preparo das partes, foram pesadas em balança semi-analítica. Os valores foram expressos em gramas.

- 6- Peso da matéria seca da raiz (PMSRa), peso da matéria seca do caule (PMSCa), peso da matéria seca das folhas jovens (PMSFJv), peso da matéria seca das folhas senescentes (PMSFSn), peso da matéria seca dos capítulos florais (PMSCap) e peso da matéria seca total (PMSTo). Após a secagem de todas as partes, em sala de secagem de plantas medicinais, os dados foram obtidos em balança semi-analítica e os valores expressos em gramas.
- 7- Altura da planta (ALT): a avaliação da altura foi feita, semanalmente, durante seis semanas a partir do 14^o dia após o transplante definitivo. A medida foi tomada em cm, a partir do solo até à extremidade superior da planta.
- 8- Quantificação dos isoflavonóides (wedelolactona e demetilwedelolactona): a raiz e parte aérea (folha e capítulos florais) das plantas foram moídas, separadamente, e armazenadas em potes de polietileno. A extração e quantificação dos princípios ativos foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

3.3. Metodologia de extração e quantificação dos coumestanos: demetilwedelolactona e wedelolactona

A metodologia de extração e quantificação dos princípios ativos de interesse baseou-se nos procedimentos sugeridos por PEREIRA (2000)¹, conforme descrito a seguir: duzentos mg de matéria seca e moída foram submetidos à extração em 5 mL de metanol, em ultrassom por 1 hora. O extrato foi filtrado e o solvente evaporado. Depois, foram adicionados, ao extrato, 2 mL da mistura metanol/água (2:1) e mais 2 mL de hexano; após agitação, e a fase hexânica foi descartada, e à fase hidroalcoólica foram adicionados mais 2 mL de hexano e, após agitação, novamente a fase hexânica foi desprezada.

¹PEREIRA, P.S (2000) Ribeirão Preto. UNAERP (dados não publicados)

À fase hidroalcoólica foram adicionados 1 mL de água destilada e 2 mL de acetato de etila; após agitação, esperou-se formar as fases, sendo retirada a fase inferior que foi submetida à partição por 2 vezes com 2 mL de acetato de etila. As fases em acetato de etila foram agrupadas e o solvente evaporado à temperatura ambiente.

Os conteúdos de wedelolactona e demetilwedelolactona foram quantificados por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), no laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), São Paulo.

As condições foram: cromatógrafo Shimadzu (Mod. LC-10 AD) com injetor manual (Mod. 7725i) e detector de arranjo de diodo (Mod. SPD-M10A), operando na faixa de 200 – 400 nm e em coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 25 cm x 4,6 mm, de partícula de 5 µm). A fase móvel foi MeOH:H₂O (0,5% ácido acético) e fluxo de 1 mL/min.

Foi feita a quantificação por meio de curvas de calibração com padrões de wedelolactona ($t_R = 16,0$) e demetilwedelolactona ($t_R = 8,0$) isolados da parte vegetativa de *Eclipta alba* e identificados por comparações com amostras (CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa, RMN ¹H e ¹³C), usando detector fixado em 254 nm. A curva de calibração foi desenvolvida com amostras diluídas do composto padrão na faixa de 0,05 – 1,0 mg/mL. As amostras foram analisadas uma vez, e os resultados dos princípios ativos expressos em miligramas, por grama de matéria seca do respectivo órgão.

3.4. Procedimentos estatísticos

Nos caracteres morfofitoquímicos, foram realizadas análises de variância (ANOVA), considerando-se delineamento inteiramente casualizado, com 4 e 5 repetições. O teste de Scott-Knott foi utilizado naquelas médias em que foram constatados efeitos significativos dos acessos, pelo teste F.

Foram realizadas análises de regressão linear simples, por acesso, considerando-se as alturas de plantas (cm), obtidas a partir do 14^o dia após o transplante até o 51^o, medidas semanalmente. Na escolha das equações de regressão

ajustadas, foram considerados os coeficientes de determinação, as significâncias da falta de ajuste e a significância dos coeficientes de regressão. Procedeu-se, ainda, aos testes de identidade de modelo. Todas as análises foram realizadas com auxílio computacional do programa SAEG versão 5.0, desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, cujos procedimentos são descritos por GOMES (1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características morfológicas

Observando as plantas dos oito acessos, desde a emergência até à maturidade, foi possível reuni-las morfológicamente em dois tipos, conforme se segue:

Tipo A- coloração verde claro no caule; pelos (tricomas) perpendiculares ao caule; número de capítulos florais, por axila foliar, variando de 4 a 8 (Figura 2) e, em geral, independentes das condições ambientais; plantas mais vigorosas do que as do tipo B; plantas encontradas na região de Viçosa-MG e Sete Lagoas-MG, crescendo isoladas, ou ao lado das plantas tipo B.

Tipo B- coloração avermelhada no caule devido aa presença de antocianina na região da epiderme; tricomas paralelos ao caule (adpressos) e um a três capítulos florais nas axilas da folhas (Figura 2); plantas de porte menor do que as do tipo A, encontradas na região de Viçosa, Sete Lagoas-MG, Sacramento-MG, Ribeirão Preto-SP e Altinópolis-SP.

As excicatas destes dois tipos de *Eclipta alba* encontram-se no Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, sendo reconhecidas por VIC-25432 (planta do tipo B) e VIC-25343 (planta do tipo A), as quais foram identificadas pelo especialista em Asteraceae, Dr. Jimi N. Nakajima, da Universidade Federal de Uberlândia, que as considerou *Eclipta alba*. Os acessos AFR e CEM pertencem ao tipo A e os demais (CEN, CV, SAC, JAN, HEN e SIL) pertencem ao tipo B.



Figura 2- Segmentos caulinares de plantas tipo A de *Eclipta alba*, de coloração verde claro, com 4 capítulos florais por axila foliar e tricomas perpendiculares aos mesmos (A). Segmentos caulinares de plantas tipo B de *Eclipta alba*, de coloração avermelhada, com 2 capítulos florais por axila foliar e tricomas adpressos (B).

4.2- Características morfométricas:

Houve diferença significativa dos acessos, quanto às quinze características morfométricas (Quadro 3). Nas características número de ramos laterais principais (NRLP), peso da matéria fresca do caule (PMFCa), peso da matéria fresca da folha jovem (PMFFJv) e peso da matéria seca total (PMSTo) ocorreu o mesmo padrão de diferença, nos acessos CEN, JAN, CEM e AFR observou as maiores médias (Quadro 4). Os acessos CEN, JAN, CEM, AFR e SIL destacaram-se no grupo das maiores médias, quanto às características peso da matéria fresca de capítulos florais (PMFCap) e peso da matéria seca de capítulos florais (PMSCap) (Quadro 4).

Nas características peso da matéria fresca de folhas senescentes (PMFFSn) e peso da matéria seca de folha jovem (PMSFJv), houve formação de três grupos, sendo que as maiores foram detectadas nos acessos CEN, AFR e CEM. (Quadro 4). Os acessos AFR e CEM destacaram-se com as maiores médias de número de capítulos por axila, ou seja, com média de 4,8 e 4,0, respectivamente; enquanto a média dos demais variou de 2,0 a 2,4.

Segundo ECHEVERRY *et al*, (1990), em *Ocimum*, o crescimento em altura das plantas está relacionado ao número de nós. Esse autor experimento verificou que, nos acessos onde foram detectadas as maiores médias na altura (ALT), também observou-se as maiores médias de número de ramos laterais principais (NRLP) (Quadro 4). Em geral, os acessos AFR e CEM (plantas do tipo A) destacaram-se, permanecendo no grupo das maiores médias em todas as características morfométricas, (Quadro 4).

4.2.1- Análises de regressão

Constatou-se efeito significativo na regressão linear simples, quanto à altura de plantas em função do tempo, em todos os acessos testados (Apêndice- Quadro 14). A falta de ajuste não significativa associada aos valores elevados de coeficiente de determinação ($r^2 > 0,873$), confirma que a regressão linear simples foi adequada, representando o crescimento das plantas, no intervalo de 14^o a 51^o dias após o transplante.

Quadro 3 - Resumo da análise de variância para os caracteres morfométricos: número de ramos laterais principais (NRLP), peso (g) da matéria fresca do caule (PMFCa), peso (g) da matéria fresca das folhas jovens (PMFJv), número de folhas jovens (NFJv), peso (g) da matéria fresca das folhas senescentes (PMFFSn), número de folhas senescentes (NFSn) e número médio de capítulos florais por axila (NMCapA), média geral e os respectivos coeficientes de variação

FV	GL	Quadrados médios						
		NRLP	PMFCa	PMFJv	NFJv	PMFFSn	NFSn	NMCapA
Acesso	7	22,62 **	30.571,63 **	1.554,52 **	162.846,32 *	159,87 **	1.406,80 **	5,45 **
Resíduo	29	4,99	3.184,04	375,88	64.317,33	12,48	181,87	0,12
CV (%)		12,78	31,75	34,54	39,81	29,69	32,63	12,94
Média		17,48	177,68	56,12	637,07	11,89	41,32	2,70

**, * F significativo aos níveis de 1 e 5%, respectivamente.

Continuação - Resumo da análise de variância para os caracteres morfométricos: peso (g) da matéria fresca dos capítulos florais (PMFCap), peso (g) da matéria seca da raiz (PMSRa), peso (g) da matéria seca do caule (PMSCa), peso (g) da matéria seca das folhas jovens (PMSFJv), peso (g) da matéria seca das folhas senescentes (PMSFSn), peso (g) da matéria seca dos capítulos florais (PMSCap) e peso (g) da matéria seca total (PMSTo) e altura (cm) de plantas no momento da colheita (ALT), média geral e os respectivos coeficientes de variação

		Quadrados médios							
FV	GL	PMFCap	PMSRa	PMSCa	PMSFJv	PMSFSn	PMSCap	PMSTo	ALT
Acesso	7	697,57 **	8,22 *	541,61 **	85,39 **	0,34 *	12,48 **	1.436,00 **	777,58 **
Resíduo	29	148,96	2,86	56,00	15,30	0,11	2,67	173,14	67,57
CV (%)		57,84	17,72	23,77	21,07	35,26	53,54	20,55	9,05
Média		21,09	9,54	31,74	18,56	0,96	3,05	64,02	90,75

**, * F significativo aos níveis de 1 e 5%, respectivamente.

Quadro 4: Valores médios dos caracteres morfométricos: número de ramos laterais principais (NRLP), peso (g) da matéria fresca do caule (PMFCa), peso (g) da matéria fresca das folhas jovens (PMFJv), número de folhas jovens (NFJv), peso (g) da matéria fresca das folhas senescentes (PMFFSn), número de folhas senescentes (NFSn) e número médio de capítulos florais por axila (NMCapA) para os respectivos acessos

Acessos	Médias estimadas						
	NRLP	PMFCa	PMFJv	NFJv	PMFFSn	NFSn	NMCapA
CEN	19,00 ^A	251,32 ^A	82,18 ^A	910,4 ^A	19,90 ^A	64,20 ^A	2,20 ^C
JAN	17,80 ^A	196,30 ^A	64,28 ^A	847,0 ^A	12,54 ^B	39,40 ^B	2,00 ^C
CV	15,00 ^B	91,29 ^B	37,71 ^B	405,4 ^B	6,25 ^C	23,00 ^B	2,00 ^C
SAC	14,50 ^B	103,28 ^B	50,21 ^B	533,0 ^B	4,75 ^C	22,25 ^B	2,00 ^C
AFR	19,80 ^A	262,73 ^A	62,40 ^A	573,0 ^B	16,43 ^A	60,40 ^A	4,80 ^A
HEN	16,75 ^B	113,93 ^B	41,23 ^B	415,0 ^B	8,23 ^C	38,25 ^B	2,25 ^C
CEM	20,75 ^A	288,73 ^A	77,15 ^A	698,0 ^A	18,68 ^A	56,50 ^A	4,00 ^B
SIL	16,20 ^B	108,48 ^B	33,91 ^B	660,2 ^A	7,54 ^C	25,50 ^B	2,40 ^C

Grupos de médias seguidas de mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Quadro 4 - Continuação - Valores médios dos caracteres morfométricos: peso (g) da matéria fresca dos capítulos florais (PMFCap), peso (g) da matéria seca da raiz (PMSRa), peso (g) da matéria seca do caule (PMSCa), peso (g) da matéria seca das folhas jovens (PMSFJv), peso (g) da matéria seca das folhas senescentes (PMSFSn), peso (g) da matéria seca dos capítulos florais (PMSCap), peso (g) da matéria seca total (PMSTo) e altura (cm) de plantas no momento da colheita (ALT) para os respectivos acessos

Acessos	Médias estimadas							
	PMFCap	PMSRa	PMSCa	PMSFJv	PMSFSn	PMSCap	PMSTo	ALT
CEN	26,59 ^A	11,35 ^A	48,84 ^A	25,29 ^A	1,15 ^A	3,95 ^A	84,60 ^A	99,40 ^B
JAN	24,58 ^A	11,26 ^A	34,83 ^A	19,36 ^B	1,40 ^A	3,42 ^A	71,29 ^A	90,20 ^B
CV	6,94 ^B	7,68 ^B	19,49 ^B	14,02 ^C	0,69 ^B	0,93 ^B	42,44 ^B	81,40 ^C
SAC	4,72 ^B	8,45 ^B	19,62 ^B	16,86 ^B	0,60 ^B	0,68 ^B	46,23 ^B	70,50 ^C
AFR	34,59 ^A	9,39 ^B	41,16 ^A	19,93 ^A	0,98 ^B	4,62 ^A	76,11 ^A	112,20 ^A
HEN	10,30 ^B	8,83 ^B	22,40 ^B	14,34 ^C	0,81 ^B	1,62 ^B	48,50 ^B	78,75 ^C
CEM	38,55 ^A	10,05 ^A	46,17 ^A	23,69 ^A	1,19 ^A	4,91 ^A	86,08 ^A	95,75 ^B
SIL	20,52 ^A	9,09 ^B	26,01 ^B	14,88 ^C	0,82 ^B	3,88 ^A	54,70 ^B	92,40 ^B

Grupos de médias seguidas de mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Cada acesso apresentou uma equação de regressão particular, não sendo possível o agrupamento de nenhuma delas, segundo o teste de identidade de modelos. Como se pode verificar no Quadro 5, o acesso com maior incremento de crescimento foi o AFR ($\hat{b}_1=2,097828$), enquanto o SAC foi o menor ($\hat{b}_1=1,425456$). Valores de $\hat{b}_1$ indicam o incremento, em centímetros, na altura de planta na variação de um dia, sendo que como cada acesso teve valores diferenciados, pode ser inferido que há variabilidade genética entre os acessos quanto ao crescimento de plantas.

Quadro 5 - Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação em oito acessos de *Eclipta alba* (L.) Hassk, na variável altura em função do tempo (X), no período de 07 de dezembro de 2000 a 24 de janeiro de 2001

ACESSOS	EQUAÇÃO DE REGRESSÃO	r^2
CEN	$\hat{y} = 4,328660 + 1,932796^{**} X$	0,9389
JAN	$\hat{y} = 8,438\ 679 + 1,680448^{**} X$	0,9093
CV	$\hat{y} = - 4,356063 + 1,693553^{**} X$	0,9283
SAC	$\hat{y} = - 2,273214 + 1,425456^{**} X$	0,8851
AFR	$\hat{y} = 8,437629 + 2,097828^{**} X$	0,9504
HEN	$\hat{y} = 1,516643 + 1,558164^{**} X$	0,9176
CEM	$\hat{y} = 14,240535 + 1,681412^{**} X$	0,8731
SIL	$\hat{y} = 9,085702 + 1,696356^{**} X$	0,8983

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.3. Características fitoquímicas

Nas curvas, os padrões de demetilwedelolactona e wedelolactona (Figura 3) foram identificados com os tempos de retenção de 8,0 e 16,0 minutos, respectivamente. Baseando-se na área obtida da integração dos picos de padrões, nas cinco concentrações (0,013; 0,094; 0,189; 0,944 e 1,887 mg de demetilwedelolactona/mL), foi determinada a equação $\hat{y} = 139.252,94369 + 44.662.644,47763 X$, que relacionou a concentração de demetilwedelolactona com a resposta do detector com alto coeficiente de determinação, $r^2=0,998834$. Da mesma forma, foi determinada a equação para wedelolactona, sendo $\hat{y} = 498.473,6934 + 56.329.354,7169 X$, com $r^2=0,998781$, onde se utilizou duas injeções com as concentrações de 0,02; 0,1; 0,2 e 1,0 mg de wedelolactona/mL. Nessas equações, a variável “X” corresponde à concentração, em mg/mL, de demetilwedelolactona e wedelolactona. Os valores do conteúdo demetilwedelolactona e wedelolactona foram transformados em mg/g de matéria seca, a fim de determinar o conteúdo.

Após as análises fitoquímicas dos princípios ativos de interesse, em cada órgão, não foi possível proceder à análise de wedelolactona na raiz, devido a presença de quantidades traço. Dessa forma, foram feitas as análises estatísticas de 5 características fitoquímicas: conteúdo de demetilwedelolactona na raiz (DWRa), folha (DWFo) e capítulos floral (DwCap), e do conteúdo de wedelolactona na folha (WFO) e capítulo floral (WCap).

No Quadro 6, observa-se que houve efeito significativo dos acessos nas características wedelolactona nas folhas (WFO) e wedelolactona nos capítulos (WCap). No Quadro 7, na característica wedelolactona na folha (WFO), houve formação de dois grupos, ou seja, plantas do tipo A (AFR e CEM) com as menores médias e plantas do tipo B com as maiores. Na Figura 4, observam-se as diferenças dos cromatogramas das plantas do tipo A e B. Nos acessos AFR e CEM (plantas tipo A), também detectaram-se as menores médias de wedelolactona nos capítulos (WFO).

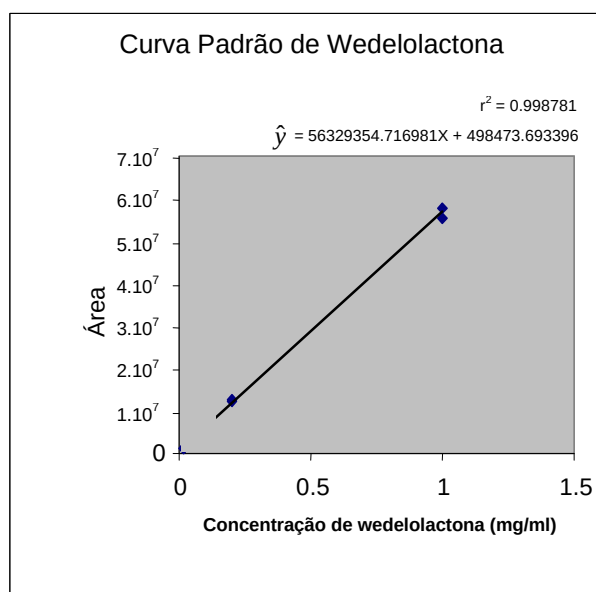
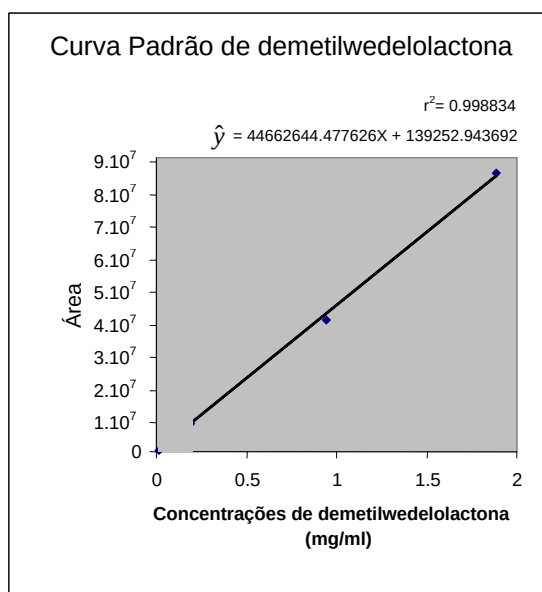


Figura 3 – Curvas padrão de demetilwedelolactona e wedelolactona, respectivas equações de regressão e coeficiente de determinação.

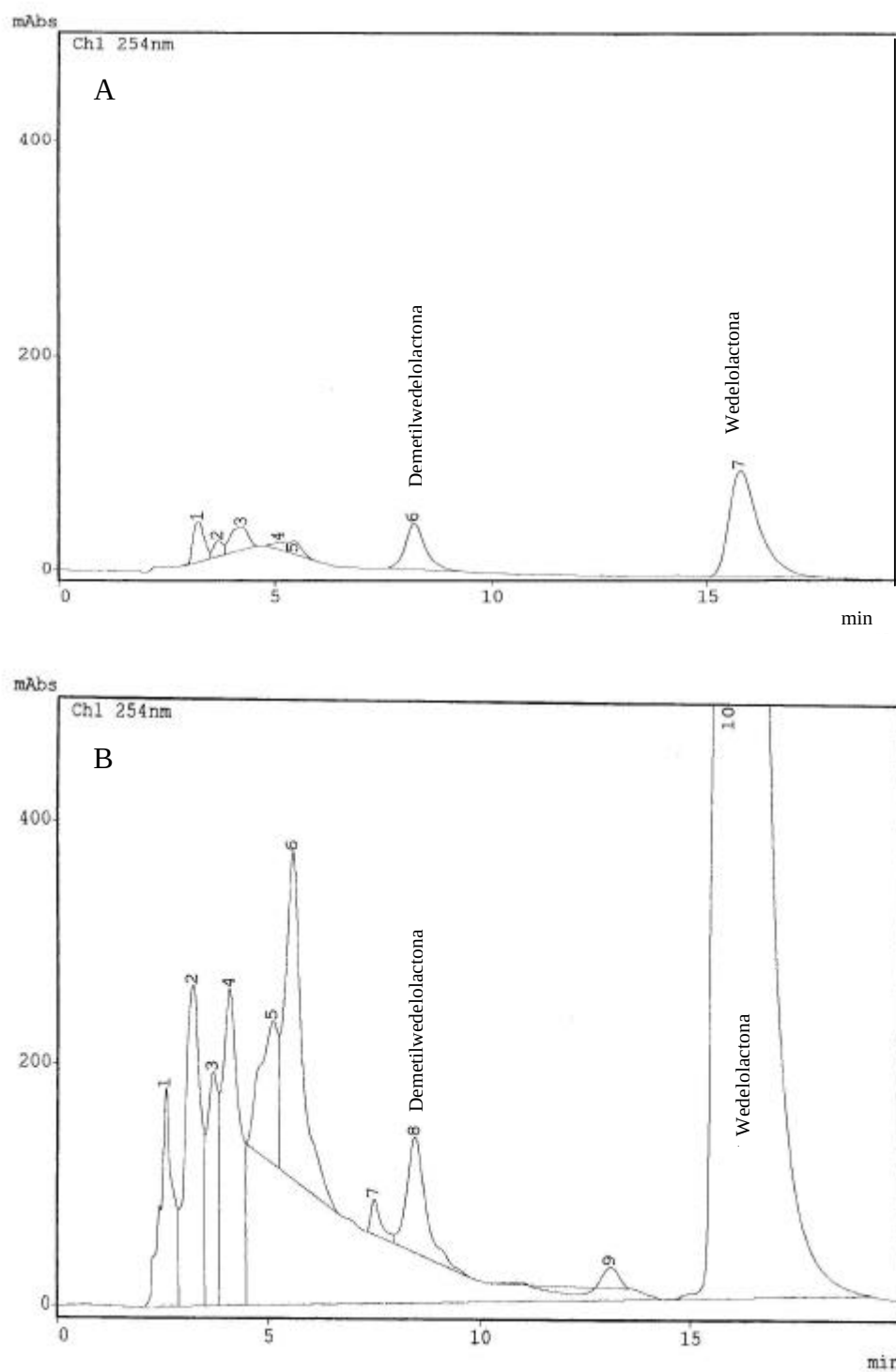


Figura 4 – Cromatogramas (CLAE) de demetilwedelolactona e wedelolactona em folhas de A- plantas de *Eclipta alba* tipo A, B- plantas do tipo B.

Quadro 6 - Resumo da análise de variância do conteúdo (mg/g de matéria seca) de: demetilwedelolactona na raiz (DWRa), demetilwedelolactona nas folhas (DWFo), wedelolactona nas folhas (Wfo), demetilwedelolactona nos capítulos florais (DWCap) e wedelolactona nos capítulos florais (WCap), média geral e os respectivos coeficientes de variação

FV	GL	Quadrados médios				
		DWRa	DWFo	Wfo	DWCap	Wcap
Acesso	7	0,0829 ^{ns}	0,0358 ^{ns}	17,2477**	0,1065 ^{ns}	5,278**
Resíduo	29	0,0962	0,0028	1,4419	0,1986	0,4828
CV (%)		27,94	38,65	32,42	47,20	36,62
Média		1,1099	0,1404	3,7033	0,9442	1,8972

** F significativo ao nível de 1%

Quadro 7 - Valores médios do conteúdos (mg/g de matéria seca) de: demetilwedelolactona na raiz (DWRa), wedelolactona nas folhas (Wfo), demetilwedelolactona nos capítulos florais (DWCap) e wedelolactona nos capítulos florais (WCap).

Acessos	Médias estimadas					
	DWRa	DWFo	Wfo	DWCap	WCap	
CEN	1,2326 A	0,1669 A	3,9367 A	1,0091 A	1,9354 B	
JAN	1,2162 A	0,1454 A	5,3510 A	1,0381 A	3,4756 A	
CV	1,2262 A	0,1217 A	4,9059 A	0,8857 A	2,1853 B	
SAC	1,1235 A	0,1432 A	4,0554 A	1,2792 A	2,5151 B	
AFR	0,8563 A	0,1554 A	0,6039 B	0,8139 A	0,3657 C	
HEN	1,0380 A	0,1801 A	5,4969 A	0,8949 A	2,1559 B	
CEM	1,0176 A	0,1218 A	0,6649 B	0,8727 A	0,2908 C	
SIL	1,3870 A	0,0938 A	4,3981 A	0,8029 A	2,1082 B	

Grupos de médias seguidas de mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott.

4.4. Acúmulo dos coumestamos por órgão

No Quadro 8, observa-se que, nas plantas do tipo B, o acúmulo de wedelolactona por órgão em ordem decrescente foi: folha (4,6906 mg/g matéria seca), capítulos florais (2,3959 mg/g de matéria seca), raiz quantidades traço, enquanto a produção de demetilwedelolactona foi: 1,2039 mg/g de matéria seca na raiz, 0,9849 mg/g de matéria seca nos capítulos florais, 0,1418 mg/g matéria seca na folha. Resultados similares foram encontrados em trabalhos conduzidos por PEREIRA *et al.*, (1998) em que a parte aérea acumulou mais wedelolactona e a raiz mais demetilwedelolactona. Órgãos de reserva de metabólitos secundários (ductos) voltados para o xilema foram observados, em cortes histológicos de folha e caule de *Eclipta alba* (L.) Hassk (PINHEIRO *et al.*, 2001).

Nas plantas do tipo A, o acúmulo de wedelolactona por ordem decrescente foi: folha (0,6519 mg/g de matéria seca), capítulos florais (0,3282 mg/g matéria seca), e na raiz detectou-se quantidades traço. A produção de demetilwedelolactona foi: raiz (0,9369 mg/g matéria seca), capítulos florais (0,8433 mg/g matéria seca), folha (0,1386 mg/g de matéria seca). OLIVEIRA (2001) observou diferenças quanto ao acúmulo de ácido clorogênico e ácido cafeico, entre os órgãos de *Bidens pilosa*, obedecendo à seguinte ordem: folha > caule > raiz.

Quadro 8 – Valores médios (mg/g de matéria seca) dos teores acumulados de demetilwedelolactona nas raízes (DWRa), demetilwedelolactona nas folhas (DWFo), wedelolactona nas folhas (WFO), demetilwedelolactona nos capítulos florais (DWCap) e wedelolactona nos capítulos florais (Wcap) nas plantas do tipo A e B de *Eclipta alba* (L.) Hassk

Tipo de planta	DWRa	DWFo	WFO	DWCap	WCap
	0,9369	0,1386	0,6519	0,8433	0,3282
B	1,2039	0,1418	4,6906	0,9849	2,3959

Também em *Datura stramonium*, o conteúdo de atropina em plantas jovens acumulou-se, diferenciadamente, entre os órgãos: caule (0,915 µg /mg), folhas médias (0,831 µg/mg), botões florais (0,299 µg/mg), folhas grandes (0,228 µg/mg), sementes (0,170 µg/mg), folhas pequenas (0,156 µg/mg), raízes (0,121 µg/mg) e pericarpo (0,001 µg/mg) (MIRALDI *et al.*, 2001).

BIONDO *et al.* (2001) avaliaram o efeito das épocas de colheita (60-90-125-185 dias após o plantio), sobre a produção dos coumestanos wedelolactona e demetilwedelolactona na raiz e parte aérea. As plantas foram obtidas assexuadamente por micropropagação “in vitro” e cultivadas dentro de casa-de-vegetação. Quanto ao teor de wedelolactona na parte aérea e raiz, não houve diferença significativa, sendo a média de 2,4 e de 0,12 mg/g de matéria seca, respectivamente. Entretanto, quanto ao conteúdo de demetilwedelolactona na parte aérea, houve diferença significativa entre as épocas de colheita, com média 3,97 mg/g matéria seca, aos 125 dias após o transplante, enquanto que na raiz não houve diferença significativa entre as épocas de colheita, sendo a média 3,52 mg/g matéria seca.

Aos 90 dias após a instalação do experimento, a produtividade de wedelolactona nas folhas, nos acessos JAN e HEN foi de 5,3510 mg/g matéria seca e 5,4969 mg/g de matéria seca, respectivamente. Assim, quando comparados com a produtividade encontrada por BIONDO *et al.* (2001), estes acessos são considerados promissores para a produção deste princípio ativo (Quadro 09).

Conforme os resultados apresentados no Quadro 09, os dados das análises isozimáticas, Capítulo 1, morfológicos e fitoquímicos, permitiram a formação dois grupos distintos, possivelmente duas variedades taxonômicas.

O conhecimento sobre a variabilidade química da planta medicinal, assim como sua correta caracterização, proporciona importante colaboração para sua efetividade tanto na medicina tradicional quanto na indústria farmacêutica.

Em *Ocimum nidicaule*, após análise morfológica (semente, cálices frutíferos e ráculos) e química (óleo essencial), foi proposta a inclusão das populações em duas variedades botânicas (FIGUEIREDO-RIBEIRO *et al.*, 1978). Essas observações foram, posteriormente, complementadas por análises isoenzimáticas (ALMEIDA e FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1986). MARTINS (1996), estudando duas populações de

Ocimum selloi (acessos A e B) com características químicas, bioquímicas e morfológicas distintas, propôs duas variedades taxonômicas.

Também TATEO *et al.* (1998), utilizando características morfológicas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, identificaram plantas com características químicas de interesse. Assim em plantas com pouca ramificação e crescimento singular, a produção foi de 58,3 a 74,2 g de esteviosídeo por quilo de matéria seca foliar.

Quadro 9 – Comparação entre os tipos (A e B) de plantas de *Eclipta alba* quanto a padrões isoenzimáticos, conteúdo de wedelolactona (mg/g de matéria seca) nas folhas (WFO) e número médio de capítulo por axila (NMCapA)

Tipos	Padrões isoenzimáticos	WFO	NMCapA	Acessos
A	III	0,6519	4,5	CEM, AFR
B	I, II, IV	4,9609	2,3	CEN, JAN, SAC, CV, HEN, SIL

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Na região urbana de Viçosa (MG), foram observadas plantas de *Eclipta alba* com características morfológicas distintas. O presente trabalho objetivou caracterizar, química e morfometricamente, oito acessos, dos quais sete são provenientes da região de Viçosa e um de Sacramento – MG.

Quanto aos caracteres morfométricos, houve formação de dois grupos, ou seja, nas plantas do tipo A (acessos CEM e AFR) detectaram-se as maiores médias e, nas plantas do tipo B (acessos CV, JAN, SIL, SAC, CEN e HEN), as menores.

Demetilwedelolactona e wedelolactona foram quantificados nos órgãos (capítulos florais, raiz e folha), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A folha jovem acumulou mais wedelolactona e a raiz mais demetilwedelolactona.

O conteúdo de wedelolactona, na folha, permitiu a formação de dois grupos coincidentes com aqueles formados pelos caracteres morfométricos e, desta forma, nas plantas tipo A, detectou-se conteúdo médio de wedelolactona na folha jovem de 0,6519 mg/g matéria seca e nas do tipo B 4,6906 mg/g matéria seca. Desta forma, as plantas tipo B são consideradas potenciais para exploração do princípio ativo wedelolactona, pelo fato de produzirem de 6 a 8 vezes mais do que as plantas tipo A.

Portanto, as características morfométricas e químicas dos dois grupos são suficientes ao estabelecimento de duas variedades taxonômicas em *Eclipta alba* (L.) Hassk. De acordo com os resultados das análises morfofitoquímicas, conclui-se que:

- a. Nas plantas de *Eclipta alba* tipo B (acessos JAN, CV, SAC, HEN, CEN e SIL), detectou-se conteúdo de wedelolactona, nas folhas, 6 a 8 vezes maior do que aquele encontrado nas plantas tipo A (acessos AFR e CEM).
- b. Nas plantas de *Eclipta alba* tipo A (acessos AFR e CEM), observaram-se os maiores valores, quanto aos caracteres morfométricos, e menores valores quanto aos princípios ativos.
- c. Foram expressivas as diferenças fitoquímicas entre os órgãos, sendo que a folha acumulou mais wedelolactona e a raiz demetilwedelolactona.
- d. As diferenças químicas, morfológicas e isoenzimáticas (Capítulo 1) são suficientes para distinção de duas variedades taxonômicas.

CAPITULO 3

INTERAÇÃO GENÓTIPO x AMBIENTE E PLASTICIDADE FENOTÍPICA DE CARACTERES MORFOMÉTRICOS E QUÍMICOS EM 3 GENÓTIPOS DE *Eclipta alba* (L.) Hassk

1. INTRODUÇÃO

Eclipta alba (L.) Hassk, planta herbácea invasora sob o ponto de vista agrônomo e medicinal sob o ponto de vista fitoterapêutico, é popularmente conhecida como erva-botão, é encontrada nos cinco continentes, amplamente dispersa em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Há séculos é utilizada pela medicina tradicional indiana e chinesa, na cura de várias doenças. Os jesuítas aprenderam, com os indígenas brasileiros, a usá-la contra males do fígado, problemas de pele e, preventivamente, nas picadas de cobra. A partir de 1980, os trabalhos científicos com *Eclipta alba* (L.) Hassk intensificaram-se, sendo que muitos de seus princípios ativos isolados confirmaram várias propriedades medicinais.

Nos últimos anos, o interesse pelas respostas do metabolismo secundário de plantas medicinais, ao ambiente, tem aumentado. A plasticidade fenotípica é fundamental, na medida em que expressa a sobrevivência e o aproveitamento vantajoso das variações ambientais. O crescimento vegetal depende de fatores ambientais, que funcionam como estimuladores de certos estádios morfofisiológicos das plantas, as quais respondem de forma adaptativa ao estímulo (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A versatilidade ambiental de *Eclipta alba* (L.) Hassk, revela-se no crescimento em ambientes desde secos até pouco drenados, arenosos a bem adubados. Portanto, é presumível que haja plasticidade fenotípica (CAPOTE *et al.*, 1986) e a qual desempenharia função relevante na estratégia de adaptação.

Na literatura, há diversos trabalhos demonstrando a existência de interação genótipo x ambiente para muitas características de caráter quantitativo. Isto significa que muitos genótipos podem produzir grande quantidade de um determinado produto, em determinada condição ambiente, mas quantidades mínimas, ou nenhuma em outras condições. Assim, o conhecimento sobre o comportamento de genótipos, numa gama de condições, é importante para que o máximo de proveito seja obtido.

Este trabalho objetivou conhecer as interações genótipo x ambiente e a plasticidade fenotípica de caracteres morfométricos e fitoquímicos em *Eclipta alba* (L.) Hassk.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metabolismo secundário

Eclipta alba (H.) Hassk é herbácea, anual, da família Asteraceae. O interesse por esta planta tem aumentado em virtude da presença de dois isoflavonóides, isto é, wedelolactona e demetilwedelolactona, os quais possuem propriedades hepatoprotetora, imunoestimulante e antiofídica e anticâncer.

SANTOS e ELISABETSKY (1999), ao selecionarem plantas medicinais com atividade antitumoral, elegeram a família Asteraceae como a mais usada. Nesta família, ocorre grande heterogeneidade de compostos químicos, o que é particularmente interessante em razão da possibilidade de detecção de novos compostos ativos. Juntamente com a família Leguminosae, a Asteraceae destaca-se por conter a maior diversidade de espécies. Conforme GOTTLIEB (1982) e DI STASI (1996), a família Asteraceae é reconhecida por sua capacidade em acumular metabólitos secundários com potencial de atividade biológica. Entre os metabólitos secundários mais comuns nesta família, destacam-se as cumarinas, os flavonóides, os poliacetilenos e sesquiterpenos (SOUZA BRITO e SOUZA BRITO, 1993; GOTTLIEB, 1982).

Produtos secundários, compostos secundários ou metabólitos secundários (especiais) são compostos orgânicos, produzidos pelas plantas, que não têm função direta no crescimento e desenvolvimento (TAIZ e ZEIGER, 1991). Têm função ecológica, isto é, no relacionamento da planta com o ambiente que a envolve (MARTINS *et al.*, 1994).

Portanto, estes metabólitos protegem contra herbívoros e ataques de fungos ou pragas, como também atraem polinizadores e são agentes de competição planta-planta (GERSHENZON, 1984).

Os metabólitos especiais ou secundários têm algumas características básicas: são a expressão da individualidade química dos indivíduos, diferindo entre espécies, qualitativa e quantitativamente, e são produzidos em pequenas quantidades (MARTINS *et al.* (1994). Estas substâncias são sintetizadas mediante estímulos específicos, por isso a regulação dos metabólitos secundários depende da base genética da planta responder a estímulos internos ou externos e dos estímulos em momento apropriado.

Os metabólitos secundários ou especiais podem ser divididos em três grupos principais, isto é, terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os compostos fenólicos são sintetizados a partir da rota do ácido chiquímico e do acetato, via ácido mevalônico, portanto, de origem mista. Os terpenóides são sintetizados a partir do acetil CoA, rota do ácido mevalônico; já os compostos nitrogenados, como os alcalóides, são sintetizados a partir de aminoácidos.

2.2 - Flavonóides e sua importância

Os flavonóides têm o esqueleto básico constituído de dois anéis conectados por uma ponte de três átomos de carbono, resultante de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico (MANN, 1987; DIXON, 1995). A primeira origina fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico, responsável pelo anel aromático B, e a ponte de três carbonos. A segunda, resulta o anel A do esqueleto básico dos flavonóides.

O esquema da biossíntese de flavonóides, em particular de demetilwedelolactona e de wedelolactona presentes em abundância em *Eclipta alba* (H.) Hassk está representado na Figura 1.

Várias funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, destacando-se: proteger os vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atrair animais com a finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; e- agentes alelopáticos e inibição de enzimas (SIMÕES *et al.*, 2000).

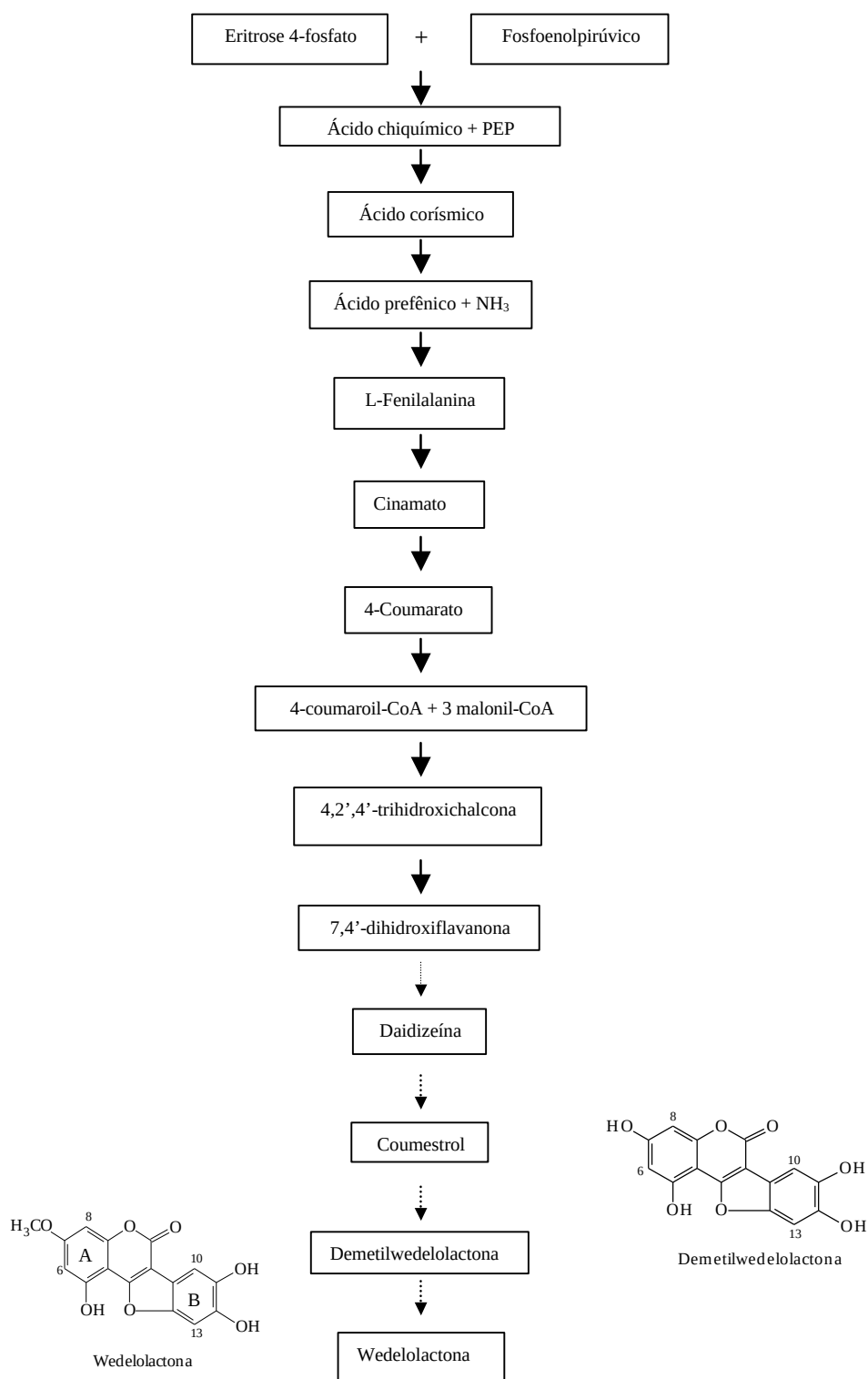


Figura 1 - Rota biosintética e estrutura dos isoflavonóides demetilwedelolactona e wedelolactona, mostrando os anéis A e B, oriundos das rotas do ácido chiquímico e do acetato respectivamente. Adaptado de DIXON e PAIVA (1995) e MANN (1987).

Os flavonóides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos pelas seguintes razões: há abundância relativa, em quase todo o reino vegetal; são específicos, em algumas espécies; há relativa facilidade de identificação; possuem a relativa estabilidade e seu acúmulo ocorre menor influência do meio ambiente. Como extensão destas aplicações, podem ser utilizados na determinação do parentesco de híbridos e como marcador químico de novos cultivares.

Conforme SIMÕES *et al.*, (2000), o interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas propriedades como, por exemplo, as cores que possuem, sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau, assim como na nutrição e sabor dos alimentos. Além disso, possuem também importância farmacológica, como anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antiviral, dentre outros.

Mais de 4.200 flavonóides são conhecidos, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou, nos últimos vinte anos.

Na Tabela 1 estão as principais classes de flavonóides e o resumo de suas propriedades biológicas mais importantes.

Tabela 1 - Classe de flavonóides e algumas características conhecidas.

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Característica
Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídeos	1660	Copigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
C-heterosídeos	303	
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes frequentemente em tecidos de madeira
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e, ou antifúngicas
Neoflavonóides	70	
Biflavonóides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	

No banco de dados da Fundação Brasileira de Plantas Medicinais, a família Asteraceae está entre as mais estudadas quanto, à atividade antitumoral, e também entre as famílias mais estudadas como tóxicas (SANTOS e ELISABETSKY, 1999).

2.3. Influência das condições edáficas sobre os princípios ativos

Em geral, em plantas portadoras de alcalóides, que foram estudadas quanto à nutrição mineral, exemplificadas pela *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Datura stramonium*, *Datura innoxia* e *Nicotiana* sp, aportes nitrogenados na forma inorgânica, ou orgânica (esterco), promoveram aumento significativo dos teores de alcalóides (DUARTE, 1984). Entretanto, em *Lobelia inflata*, o nitrogênio reduziu drasticamente o teor de alcalóides totais. DUARTE (1984), estudando a influência de dois tipos de solo, isto é, litossolo e latossolo sobre a produção de alcalóides em plantas de confrei (*Symphytum* sp.), observou variação qualitativa e quantitativa no conteúdo dos alcalóides.

UTUMI *et al.* (1999) verificaram que a deficiência de macronutrientes K, Ca e S no solo reduziu significativamente, o teor de esteviosídeo em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.

O pH do solo, na faixa de 4,2-5,6, causou diferença significativa na concentração de wedelolactona e demetilwedelolactona da parte aérea de *Eclipta alba*; desta forma, o princípio ativo diminuiu com o aumento do pH (PEREIRA, 1997). A deficiência de Ca diminuiu, drasticamente, a produção de esteviosídeo nas folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, no experimento conduzido em solução nutritiva e em casa-de-vegetação (LIMA FILHO *et al.*, 1997).

2.4. Efeito da irradiância nos caracteres vegetativos e fitoquímicos em plantas medicinais

Conforme MELGUES e SONNET (1983), os principais fatores responsáveis pela produção de matéria seca são a área foliar, a taxa fotossintética, a respiração e a radiação incidente. Desde que fatores como a água, nutrientes minerais e outros não sejam limitantes, a principal característica do meio ambiente, que influencia a produtividade é a

radiação solar. Considera-se que este fator tem grande importância, porque influencia a taxa assimilatória líquida, a área foliar e a respiração. Portanto, a intensidade de luz, a respectiva qualidade e o tempo de exposição estão, diretamente, relacionados ao desenvolvimento da planta. Há tendência geral para que o acúmulo de matéria seca, em órgãos, diminua com o aumento de sombreamento. Entretanto, as características peculiares, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das espécies, determinam as diversas respostas às condições de luminosidade (MCFARLANE, 1978).

As plantas, em geral, possuem limites de ‘tolerância’ a diversos fatores relacionados com o clima e com o solo; para algumas plantas aromáticas e medicinais, esses limites de tolerância são amplos (HERTWIG, 1986).

A influência ocorre de forma direta, ou indireta, na produção de fármacos e nos diversos fenômenos fisiológicos do vegetal. As alterações são tanto morfológicas e anatômicas quanto fisiológicas e químicas. A maior exposição de luz solar pode implicar em maior temperatura e fotossíntese, aumentando a produção de metabólitos secundários e primários, dentro dos limites de cada espécie (MARTINS *et al.*, 1994). Em *Justicia pectoralis* houve maior produção de cumarinas nas plantas expostas a 100% de radiação, comparadas às plantas submetidas a apenas 65% de radiação solar (BARROS *et al.*, 1994). No entanto, a alta umidade e a radiação excessiva reduziram o teor de alcalóides em beladona (*Atropa belladonna*). De acordo com BROWN JR (1988), em plantas submetidas à luz intensa, ocorre aumento pronunciado na produtividade de substâncias secundárias.

CASTELLANI (1997) trabalhando com *Tropaeolum majus* (L.), não detectou diferença estatística entre quatro níveis de sombreamento (0%, 30%, 50% e 70%), quanto à produção de ácido erúico; entretanto, verificou que as plantas submetidas à radiação solar do ambiente (0% de sombreamento) produziram, em média, mais ácido erúico.

Estudos de LI *et al.* (1996) confirmaram que altos níveis de radiação aumentam a produção de óleo essencial em *Thymus vulgaris*, *Anethum graveolens*, *Mentha piperita*, *Ocimum* sp. e *Matricaria recutita*.

A produção de esteviosídeo em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é bastante afetada pelo fotoperíodo. Em dias longos, comparado com dias curtos, a produção do edulcorante é dobrada em 72 g/kg de tecido foliar seco, comparado com somente 36 g/kg em dias curtos.

A proporção de esteviosídeo nos açúcares solúveis totais também aumenta significativamente de 29%, em dias curtos, para 40% em dias longos (VIANA, 1981).

CARVALHO (2001) obteve maior produção de partenolídeo em *Tanacetum parthenium*, quando crescido, em ambiente com alta irradiância.

2.5. Plasticidade fenotípica

A plasticidade fenotípica é a habilidade do genótipo em produzir fenótipos específicos, dependendo do contexto ambiental, significando que os efeitos genéticos e ambientais não são independentes, pois as respostas fenotípicas dos genótipos podem diferir segundo as variações ambientais (SCHEINER, 1993).

Dependendo do ambiente, o genótipo pode apresentar fenótipos variáveis quanto às características morfológicas ou químicas. Os efeitos ambientais podem alterar as características morfológicas (plasticidade morfológica) e a concentração dos constituintes ativos (plasticidade fisiológica) (BRADSHAW, 1965) das plantas medicinais e estas modificações podem afetar suas propriedades medicinais (KAMADA *et al.*, 1999) e colocá-las fora das especificações farmacêuticas (TRENTINI, 1997).

O estudo da interação genótipo x ambiente e da plasticidade fenotípica assumem grande importância devido à sua aplicabilidade no planejamento de estratégias, pelos melhoristas, significando aproveitar a flexibilidade dos genótipos em resposta às variáveis ambientais, objetivando melhores combinações. Apesar da escassa disponibilidade de estudo sobre a interação genótipo x ambiente e plasticidade fenotípica em plantas medicinais, estes conhecimentos são essenciais para assegurar uniformidade de produção. A importância desta característica está na garantia da matéria fresca e/ou seca destinada ao uso *in natura*, assim como matéria-prima confiável quanto aos fitofármacos destinados à indústria de medicamentos (OLIVEIRA *et al.*, 2001; KAMADA *et al.*, 1999).

A concentração das substâncias bioativas nas plantas pode ser, ou não, alterada por fatores bióticos e abióticos do meio ambiente. Os fatores bióticos são expressos pelas interações entre indivíduos, tais como a alelopatia, simbiose, parasita-hospedeiro, etc. Os fatores abióticos são expressos pelas condições climáticas (luz, temperatura, umidade, pluviosidade, altitude, latitude, longitude) e edáficas (composição, tipo e textura do solo) às

quais são submetidas, durante seu crescimento e desenvolvimento (GERSHENZON, 1984). Pelo exposto, o conhecimento da interação genótipo x ambiente e plasticidade fenotípica, em plantas medicinais, é de grande importância, pois permite determinar o meio mais adequado e estável de produção dos princípios ativos de interesse.

Dessa forma, o ambiente possui importância primordial na adoção de qualquer planta como medicinal. Muitos fatores ambientais influenciam o metabolismo e dentre eles estão as condições edáficas, cuja variação implica, principalmente, em diferenças de nutrientes disponíveis na biossíntese dos metabólitos secundários, e dessa forma pode variar o uso de acordo com procedência. Os estudos da influência das condições edáficas sobre os compostos metabolicamente ativos são muito contraditórios e incipientes.

2.5.1. Características plásticas morfológicas e químicas

O grau de plasticidade pode estar relacionado à forma de desenvolvimento dos caracteres (BRADSHAW, 1965). Os caracteres formados durante longo período de crescimento, tais como altura, número de folhas e matéria seca total estão mais sujeitos à influência ambiental e, conseqüentemente, espera-se maior variação fenotípica, ou seja, são mais plásticas, quando comparadas com os caracteres desenvolvidos rapidamente, como estruturas reprodutivas e os demais caracteres formados durante os estádios de desenvolvimento (SANTOS, 1990). Sabe-se que características evolutivas responsáveis pela perpetuação da espécie, como estruturas reprodutivas, devem ser conservadas a fim de não comprometer a sobrevivência da espécie, por isso, é de se esperar baixa plasticidade no florescimento (SCHLICHTING e LEVIN, 1984).

Vários trabalhos têm demonstrado que a biomassa da parte aérea vegetal é a mais plástica, a altura da planta é de plasticidade mediana; enquanto, largura e comprimento da folha são de baixa plasticidade (SCHLICHTING e LEVIN, 1984; GUREVITCH, 1988; KAMADA *et al.*, 1999).

OLIVEIRA (2001), trabalhando com 6 genótipos de *Bidens pilosa* crescidos em quatro altitudes e colhidos em quatro épocas concluiu que a altitude influencia os caracteres morfométricos e químicos, e que a magnitude e o padrão de plasticidade eram, específicos

em cada genótipo, podendo diferir nas épocas de colheita. Nas características morfométricas, estimou-se que cerca de 83% da variação foi devido a efeito da altitude.

2.5.2. Medidas de plasticidade

Há muitos métodos de quantificação da plasticidade. As estimativas tornam-se mais precisas quanto menor for a variação genética dentro do tratamento. Por meio de esperanças de quadrado médio, pode-se estimar a variância do tratamento, a qual, sendo significativa (teste F), indica que o caráter em questão é plástico (SCHLICHTING, 1986). Com a análise de variância conjunta, pode-se comparar a plasticidade de dois ou mais genótipos cultivados em diferentes ambientes. Dessa análise, podem-se separar três componentes principais de variação: variância atribuída ao genótipo, variância atribuída aos ambientes e variância atribuída à interação genótipo x ambiente. A variância ambiental e a interação resultam de resposta plástica. O termo de interação significativo indica que não somente há plasticidade, como também diferenças de plasticidade entre genótipos. Este termo pode ser significativo, mesmo quando o ambiente não o é (SANTOS, 1990).

A plasticidade possui dois componentes de resposta plástica, ou seja, a magnitude de resposta e o padrão de plasticidade. A resposta plástica é obtida, quando se analisam dois ou mais genótipos em mais de um ambiente. A intensidade da plasticidade observada nesses ambientes é denominada 'magnitude de resposta plástica'. Ao comparar o comportamento entre os indivíduos, obtém-se concordância ou discordância de resposta, sendo denominado 'padrão de plasticidade'. O controle das respostas é genético e é modificável pelo processo de crescimento, ou desenvolvimento, vegetal e pela seleção (BRADSHAW, 1965; SCHEINER, 1993; KAMADA *et al.*, 1999).

O índice de determinação ambiental (I_a^2) foi utilizado por KAMADA (1998) como estimador da proporção de variação total atribuída ao efeito de ambiente, sendo que seus valores podem ser positivos ou negativos. Quando positivos e altos, significa que há intensa plasticidade, quando baixos ou negativos significa que a intensidade de plasticidade é pequena ou nula, ou seja, há pouca influência do ambiente sobre a característica.

SCHLICHTING e LEVIN (1984), estudando a planta anual *Phlox*, estimaram a magnitude da plasticidade fenotípica em coeficiente de variação ambiental (CVa) e

classificaram em magnitude alta, $CVa > 20\%$, média, CVa entre 10 e 20%, e baixa, $CVa < 10\%$. KAMADA *et al.* (1999) adotaram esta classificação, ao estudar a plasticidade fenotípica de três acessos de manjerição (*Ocimum* spp.): manjerição-branco, manjerição-roxo e basilicão. Nesse trabalho, foram testadas adubações químicas e orgânicas, sendo a plasticidade estimada pelos caracteres dos óleos essenciais, ou seja, teor, composição química e concentrações do terpinoleno e eugenol. Os valores da plasticidade foram estimados pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e índice de determinação ambiental (Ia^2). O CVa foi utilizado na estimação da magnitude de plasticidade e o Ia^2 na representação da proporção de variação total atribuída ao efeito ambiental. O CVa indicou magnitude média e o Ia^2 demonstrou que o ambiente teve grande influência na variação total.

Visando conhecer os fatores ambientais e genéticos, que influenciam a produção das espécies medicinais, KAMADA (1998) estudou a plasticidade fenotípica da morfologia de três acessos de manjerição (*Ocimum* spp.), isto é, manjerição-branco, manjerição-roxo e basilicão, que foram crescidos em quatro ambientes de adubação: 1) sem adubação; 2) adubação orgânica; 3) adubação química; e 4) adubação química e orgânica. Nesse trabalho, utilizou-se como parâmetro a análise da variação morfológica frente aos níveis de adubação. Os valores de plasticidade foram estimados, por meio do coeficiente de variação ambiental (CVa) e índice de determinação ambiental (Ia^2). O CVa foi utilizado na estimação da magnitude de plasticidade e o Ia^2 na representação da proporção de variação total atribuída ao efeito ambiental. O autor concluiu que os efeitos da plasticidade foram relevantes na produção de biomassa (matéria seca). Observou que, nos acessos que floriram, isto é, manjerição-branco e basilicão, os valores de plasticidade foram semelhantes, enquanto o manjerição-roxo, que não floresceu, foi o que demonstrou maiores magnitudes de plasticidade nos caracteres, concluindo que os efeitos ambientais sobre o crescimento e desenvolvimento foram específicos em cada acesso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação dos genótipos

A interação genótipo x ambiente e plasticidade fenotípica foram estudadas em três genótipos de *Eclipta alba*, obtidos nas regiões urbana e rural de Viçosa – MG. Os três genótipos foram selecionados conforme grupos divergentes, detectados por meio da análise isoenzimática (Capítulo 1). Dados morfológicos (Capítulo 2) também colaboraram na escolha dos genótipos. Desta forma, os genótipos A e C pertencem às plantas do tipo B e A (Capítulo 2), respectivamente. O genótipo B foi identificado, após as análises isoenzimáticas, sendo que o melhor sistema, que permitiu a distinção entre os genótipos, foi a esterase. Utilizando apenas os locos Est1 e Est3 do sistema isoenzimático esterase, foi possível separar os três genótipos, conforme apresentado no Quadro 1 e Figura 1.

Quadro 1 - Caracterização dos três genótipos de *Eclipta alba*, por meio dos locos Est1 e Est3 do sistema isoenzimático esterase

GENÓTIPO	Est 1	Est 3
A	Escuro	2 bandas
B	Intermediário	3 bandas
C	Claro	2 bandas

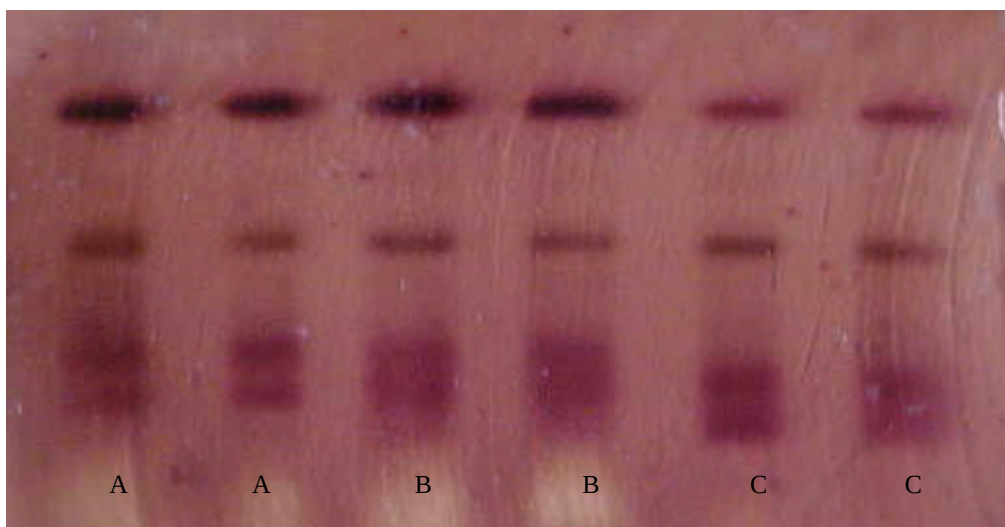


Figura 1 - Imagem do gel mostrando as diferenças entre os três genótipos de *Eclipta alba* (genótipos A, B, C) no sistema isoenzimático esterase (EST).

3.2 - Multiplicação das plantas

Os três genótipos foram multiplicados por meio de propagação vegetativa via estacas de uma única planta, objetivando à obtenção de plantas suficientes à realização do experimento. Foram originados três conjuntos de plantas geneticamente homogêneas. Estacas com duas gemas laterais foram enraizadas em substrato de areia em caixas plásticas de 15 cm de altura, irrigadas diariamente, duas vezes por dia. Após 15 dias, as estacas enraizadas foram transplantadas para vasos definitivos com 7 litros de capacidade..

3.3 - Condução do experimento

O experimento foi conduzido no período de 13 de fevereiro a 13 de abril de 2001, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - MG, localizada na Zona da Mata, em 20°45' de latitude sul e 42°51' de longitude oeste, com altitude de 651 m.

O experimento foi instalado no esquema fatorial 3x2 (3 genótipos e 2 tipos de substratos), no delineamento em blocos casualizados com 4 repetições, em duas condições,

isto é, em casa-de-vegetação e a pleno sol, sendo considerado condição ambiente. Cada parcela foi constituída por dois vasos plásticos de 7 litros de capacidade, preenchidos pelos substratos previamente analisados em termos de fertilidade. Cada vaso continha apenas uma planta e recebeu 250 mL de água natural de dois em dois dias, durante todo o experimento.

O experimento instalado em casa-de-vegetação foi mantido sob tela sombrite 30%, e aquele em condição ambiente em pleno sol. Em ambos, os vasos ficaram sobre uma mesa ripada e forrada com filme plástico. Em todo o texto o experimento instalado em casa-de-vegetação e aquele a pleno sol foram denominados em condição de: casa-de-vegetação (CV) e ambiente (AMB), respectivamente. Os substratos testados foram solo (S) coletado em Viçosa – MG e solo + humus de minhoca (H) na proporção 3:1. Assim, cada genótipo foi avaliado nas seguintes condições:

- 1- solo (S) e casa-de-vegetação com tela sombrite de 30% (CV);
- 2- solo com humus de minhoca (H) e casa-de-vegetação com tela sombrite de 30% (CV);
- 3- solo (S) e em condição ambiente, 100% de irradiância (AMB);
- 4- solo com humus de minhoca (H) e em condição ambiente, 100% de irradiância (AMB).

3.4 - Caracteres avaliados e coleta dos dados

A avaliação dos caracteres foi realizada, durante a fase de crescimento e após a coleta das plantas. A coleta ocorreu 60 dias após o transplante, quando as plantas já encontravam-se totalmente floridas. Foram avaliados os caracteres morfológicos (altura da planta, número de folhas, peso da matéria fresca total, peso da matéria seca total, peso da matéria fresca da parte aérea, peso da matéria seca da parte aérea, peso da matéria fresca da raiz e peso da matéria seca da raiz) e fitoquímicos (conteúdo de demetilwedelolactona e wedelolactona).

3.4.1. – Caracteres morfométricos

- 1- Altura (ALT)- a medida foi tomada em cm, a partir do nível do solo até o primeiro par de folhas da inflorescência mais alta.

- 2- Número de folhas (NF) - contagem de todas as folhas, inclusive as secas.
- 3- Peso da matéria fresca - as plantas foram colhidas no período da manhã e pesadas em balança semi-analítica. Os valores foram expressos em gramas. O peso da matéria fresca das partes foi obtido, após a separação das plantas em parte aérea e raízes.
- 4- Peso da matéria seca - após a obtenção da matéria fresca total, as amostras foram submetidas à secagem lenta, durante 15 dias em sala de secagem, protegida contra a incidência de luz e com baixa umidade até a obtenção de massa constante. O controle da baixa umidade foi feito por meio de desumidificadores de ar. A temperatura da sala manteve-se entre 30-50° C. As medidas dos pesos foram obtidas em balança semi-analítica e os valores foram expressos em gramas. As plantas secas foram armazenadas em saco de papel até o momento da moagem na sala de armazenamento de plantas medicinais do Grupo Entre Folhas, na Vila Gianetti em Viçosa – MG, na Universidade Federal de Viçosa.

3.4.2. Caracteres fitoquímicos

Na quantificação do conteúdo de demetilwedelolactona e wedelolactona, cada amostra foi moída, separadamente, e armazenada em potes de polietileno. A extração dos princípios ativos foi realizada no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV e Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). As injeções foram feitas no aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), no período de julho a setembro de 2001.

3.4.2.1. Metodologia de extração dos princípios ativos e sua quantificação

A metodologia de extração e quantificação dos princípios ativos baseou-se nos procedimentos propostos por PEREIRA (2000)¹.

¹PEREIRA, P.S. (2000). Ribeirão Preto. UNAERP. (Dados não publicados)

Utilizaram-se 200 mg de matéria seca e moída, que foram submetidas à extração com 5 mL de metanol, em ultrassom por 1 hora. O extrato foi filtrado e o solvente evaporado. Após evaporação do solvente, adicionaram-se 2 mL da mistura metanol/água (2:1) e 2 mL de hexano e agitou-se. A fase hexânica foi descartada e à fase hidroalcoólica foram adicionados 2 mL de hexano e agitado novamente. A fase hexânica foi desprezada.

À fase hidroalcoólica foram adicionados 1 mL de água destilada e 2 mL de acetato de etila. Agitou-se e esperou-se a formação de fases, quando, então, retirou-se a fase inferior que foi submetida à partição por duas vezes com 2 mL de acetato de etila. As fases em acetato de etila foram agrupadas e o solvente evaporado à temperatura ambiente.

Utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu (Mod. LC – 10 AD) com injetor manual (Mod. 7725i) e detector de arranjo de diodo (Mod. SPD-M10 A), operando na faixa de 200 à 400 nm. A coluna foi de fase reversa (Supelcosil LC-18, 25cm x 4,6mm, tamanho de partícula de 5 µm) A fase móvel foi MeOH:H₂O (0,5% ácido acético) e fluxo de 1 mL/min.

Na quantificação, foram feitas curvas de calibração, usando-se padrões de wedelolactona (t_R = 16,0) e demetilwedelolactona (t_R = 8,0) isolado da parte vegetativa de *Eclipta alba* e identificado por comparações com amostras (CCDC-Cromatografia em Camada Delgada Comparativa, RMN ¹H e ¹³C), usando detector fixado em 254 nm. A curva de calibração foi desenvolvida, com amostras diluídas do composto padrão de demetilwedelolactona e wedelolactona na faixa de 0,013-1,887 mg/mL.

As amostras foram analisadas em duplicatas e os resultados dos conteúdos de demetilwedelolactona e wedelolactona foram expressos em miligramas do princípio ativo, por grama de matéria seca.

3.5 - Análises estatísticas

3.5.1 – Análises de variância da interação genótipo x ambiente

Foram realizadas análises de variância individual e conjunta dos experimentos segundo os procedimentos usuais e conforme a estrutura definida no delineamento adotado, ou seja, esquema fatorial 3x2 (três genótipos e dois tipos de substrato) instalado no delineamento em blocos casualizados com quatro repetições, em dois locais.

Essas análises permitiram conhecer a significância dos efeitos principais {condição (E) (casa-de-vegetação e ambiente), genótipos (G) e tipos de substratos (S)} e os efeitos da interação {(ExG), (ExS), (GxS) e (ExGxS)}; utilizou-se o teste de Tukey e nível de significância de 5%.

3.5.2 – Análises da plasticidade fenotípica

No estudo sobre a plasticidade fenotípica, desconsiderou-se a estrutura utilizada e considerou-se cada condição ambiente proveniente da combinação de dois experimentos (dentro e fora da casa-de-vegetação) e dois substratos (solo e solo+humus) como sendo quatro tratamentos para cada genótipo separadamente. Essa manipulação foi necessária para se obter a média, o quadrado médio de ambiente e o quadrado médio de resíduo para cada um dos genótipos, isoladamente, os quais foram utilizados na determinação do coeficiente de variação ambiental (CVa) e do índice de determinação ambiental (Ia^2).

Sob estas considerações, os esquemas das análises de variância e sua respectiva E(QM) podem ser observados no Quadro 2.

Quadro 2 - Análise de variância para estudo da plasticidade fenotípica com seu respectivo E(QM)

F.V.	G.L.	Q.M.	E(QM)
Ambiente	a-1	QMA	$\sigma_r^2 + r\phi_A$
Resíduo	(a-1)r	QMR	σ_r^2
Total	ar-1		

a = número de ambientes, r = repetição

em que

σ_r^2 = componente de variância dos efeitos do ambiente entre parcelas dos experimentos; e

ϕ_A = componente quadrático associado aos efeitos do ambiente .

3.5.2.1- Estimadores da plasticidade

A plasticidade dos genótipos em relação ao ambiente foi discutida, considerando-se o coeficiente de variação ambiental (CVa) e o índice de determinação ambiental (Ia^2).

O coeficiente de variação ambiental (CVa) determina, em valores percentuais, a magnitude da resposta plástica. O estimador de CVa por genótipo é dado pela expressão, apresentada por SCHLICHTING e LEVIN (1984), como se segue

$$CVa_i = \frac{s(\bar{x})}{\bar{X}} 100 = \frac{\sqrt{QMA/b}}{\bar{X}} 100$$

em que

CVa = coeficiente de variação ambiental do genótipo i;

$s(\bar{x})$ = desvio-padrão da média dos ambientes;

$\bar{X}$ = média geral do genótipo i;

QMA = quadrado médio dos ambientes; e

b = número de repetições em cada ambiente.

Utilizou-se a classificação proposta por SCHLICHTING e LEVIN (1984), em que valores de CVa maiores que 20% é considerado alto, médio para valores entre 10 e 20% e baixo se for menor que 10%.

O índice de determinação ambiental (Ia^2) representa o efeito ambiental, em relação à proporção total da variação, cujo estimador é dado pela expressão

$$Ia^2 = \frac{QMA - QMR}{QMA}$$

em que

Ia^2 = índice de determinação ambiental;

QMA = quadrado médio do ambiente; e

QMR = quadrado médio do resíduo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise química dos substratos

O resultado da análise química dos substratos, utilizados nos experimentos, encontra-se no Quadro 3. No substrato 1 (solo), observaram-se baixos níveis dos nutrientes potássio, cálcio, magnésio, excesso de alumínio e H+Al e 4,37 dag/kg de matéria orgânica. No substrato 2 (solo+humus) foram detectados maiores teores desses nutrientes, altos níveis de H+Al; 7,73 dag/kg de matéria orgânica e 456,00 mg/dm³ de fósforo. Estas diferenças eram desejadas para detectar os efeitos do substrato sobre a produção dos princípios ativos e as características morfométricas.

Quadro 3 - Resultado das análises químicas dos substratos (1 = solo e 2 = solo+humus) utilizados nos estudos de plasticidade fenotípica nas condições de casa-de-vegetação e ambiente

Amostra	mg/dm ³			cmol _c /dm ³							(%)		dag/kg
	pH (H ₂ O)	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO
(1)	4,4	26,1	33	0,65	0,23	1,10	7,26	0,96	2,06	8,22	11,7	53,4	4,37
(2)	5,7	456,0	53	5,45	3,30	0,20	6,60	8,89	9,09	15,49	57,4	2,2	7,73

pH em água, KCl e CaCl₂ – relação 1:25.

P e K – extrator Mehlich 1.

Ca, Mg e Al – extrator: KCl – 1 mol/l.

H + Al – extrator acetato de cálcio 0,5 mol/l – pH 7,0.

SB = soma de bases trocáveis.

(t) = capacidade de troca catiônica efetiva.

(T) = capacidade de troca catiônica a pH 7,0.

V = índice de saturação de bases.

m = índice de saturação de alumínio.

MO = matéria orgânica = C. org. x 1,724 – Walkley-Back.

4.2 – Análises da interação genótipo x ambiente

4.2.1 – Efeitos principais

No Quadro 4, pode ser verificado o efeito significativo de genótipo, quanto às características: altura da planta, número de folhas por planta, peso da matéria fresca da raiz, peso da matéria seca da raiz, peso da matéria seca total e conteúdo de demetilwedelolactona e wedelolactona na parte aérea. O conteúdo de wedelolactona na raiz foi insuficiente para realização das análises estatísticas, pois, apresentou apenas quantidades-traço. No Quadro 5, nos genótipos A e B, observaram-se as maiores médias do peso de matéria seca total e demetilwedelolactona na parte aérea. No Quadro 4, observa-se que altura da planta foi a única característica para a qual não houve interação, enquanto, no Quadro 5, a maior altura foi detectada nos genótipos A e B, no substrato adicionado de humus e desenvolvido dentro da casa-de-vegetação. SAMPIETRO e SAMPIETRO (2000), avaliando genótipos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni oriundos de estacas, nos substratos vermiculita + humus de minhoca (1:1) e turfa + humus de minhoca (1:1), encontraram diferenças significativas, entre genótipos, quanto ao conteúdo de esteviosídeo.

Quadro 4 - Resumo da análise de variância conjunta para os caracteres: altura de plantas (altura), número de folhas (nº folhas), peso da matéria fresca da raiz (PMFR), peso da matéria seca da raiz (PMSR), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFA) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSA), média geral e os respectivos coeficientes de variação

FV	GL	Quadrados médios					
		Altura	Nº folhas	PMFR	PMSR	PMFA	PMSA
Bloco/exp.	6	28,8852 ^{ns}	4.783,1041 ^{**}	10,2295 ^{ns}	0,3081 ^{ns}	136,9935 ^{ns}	4,8571 [*]
Genótipos (G)	2	825,6643 ^{**}	7.313,6875 ^{**}	45,3297 [*]	2,7974 ^{**}	126,6188 ^{ns}	4,8637 ^{ns}
Solos (S)	1	7.887,3767 ^{**}	463.936,6875 ^{**}	675,3000 ^{**}	15,6066 ^{**}	65.743,0836 ^{**}	1.903,4823 ^{**}
Exp. (E)	1	4.686,6768 ^{**}	254.771,0283 ^{**}	1.088,3265 ^{**}	16,0661 ^{**}	1,4770 ^{ns}	266,6333 ^{**}
GxS	2	67,5081 ^{ns}	111,8125 ^{ns}	9,4202 ^{ns}	0,0816 ^{ns}	832,3860 ^{**}	4,4179 ^{ns}
GxE	2	88,5081 ^{ns}	1.083,7708 ^{ns}	19,7834 ^{ns}	1,3184 ^{**}	48,5850 ^{ns}	1,4806 ^{ns}
SxE	1	4,8768 ^{ns}	178.974,1875 ^{**}	242,4603 ^{**}	6,3875 ^{**}	771,3636 ^{**}	269,5638 ^{**}
GxSxE	2	26,5768 ^{ns}	1.218,0625 ^{ns}	18,6120 ^{ns}	0,7531 ^{**}	55,0961 ^{ns}	0,2403 ^{ns}
Resíduo	30	38,5335	1.030,7875	8,8179	0,1353	87,3970	1,5836
CV (%)		11,36	18,67	26,95	22,85	17,97	14,52
Média		54,63	171,93	11,01	1,61	52,01	8,66

*, ** F significativo ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

ns F não significativo.

Quadro 4 - continuação: Resumo da análise de variância conjunta para os caracteres: peso da matéria fresca total (PMFT), conteúdo de demetilwedelolactona na raiz (DW-R) mg/g de matéria seca, conteúdo de demetilwedelolactona na parte aérea (DW-A)) mg/g de matéria seca, conteúdo de wedelolactona na parte aérea (W-A) mg/g de matéria seca, média geral e os respectivos coeficientes de variação

FV	Quadrados médios					
	GL	PMFT	PMST	DW-R	DW-A	W-A
Bloco/exp.	6	174,3400 ns	7,1886 *	0,1481 ns	0,1496 ns	0,2291 ns
Genótipos (G)	2	119,5380 ns	13,8603 *	0,9594 ns	1,7362 **	28,6826 **
Solos (S)	1	79.850,5045 **	2.266,4131 **	1,9844 *	0,5551 **	8,2519 **
Exp. (E)	1	1.159,5468 **	412,8374 **	6,9838 **	3,5620 **	1,9928 **
GxS	2	1.012,4874 **	5,6815 ns	1,3028 *	0,0126 ns	0,6975 *
GxE	2	63,0788 ns	3,0892 ns	3,5094 **	0,0115 ns	0,9546 *
SxE	1	1.870,0033 **	356,2665 **	0,2633 ns	0,4582 *	0,5028 ns
GxSxE	2	112,3444 ns	1,0083 ns	2,0464 **	0,0894 ns	0,5724 ns
Resíduo	30	120,2615	2,1029	0,3267	0,0648	0,1849
CV (%)		17,39	14,09	35,55	18,56	20,89
Média		63,04	10,28	1,59	1,37	2,06

*, ** F significativo ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

ns F não significativo.

Quadro 5 – Valores médios dos efeitos principais para: altura de plantas (altura), número de folhas (nº folhas), peso (g) da matéria fresca da raiz (PMFR), peso (g) da matéria seca da raiz (PMSR), peso (g) da matéria fresca da parte aérea (PMFA) e peso (g) da matéria seca da parte aérea (PMSA), peso (g) da matéria fresca total (PMFTo), conteúdo (mg/g de ms) de demetilwedelolactona na raiz (DW-R), conteúdo (mg/g ms) de demetilwedelolactona na parte aérea (DW-A), conteúdo (mg/g ms) de wedelolactona na parte aérea (WA)

Efeitos	Tipos	Médias					
		Altura	Nº Folhas	PMFR	PMSA	PMSTo	DW-A
Condição	casa-de-vegetação	64,51 A					
	ambiente	44,75 B					
Substratos	solo	41,81 B					
	solo + humus	67,45 A					
Genótipos	A	60,56 A	170,00 AB	11,47 AB	8,70 AB	10,63 A	1,71 A
	B	56,68 A	194,00 A	12,42 A	9,19 A	10,98 A	1,33 B
	C	46,64 B	151,00 B	9,15 B	8,09 B	9,22 B	1,06 C

Médias seguidas de mesma letra na coluna e dentro de cada efeito principal não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

No Quadro 4, observa-se que, em relação aos tipos de substratos usados no experimento, houve efeito significativo em todas as características morfológicas e fitoquímicas.

Conforme BROWN (1988), os compostos fenólicos totais, nas plantas crescidas com falta de nutrientes, respondem quimicamente aumentando os princípios ativos, fato este constatado no presente experimento. Fato semelhante também ocorreu com *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Segundo MING (1998), o aumento da adubação provocou decréscimo no teor de óleo essencial, ou seja, o óleo essencial cumpre papel fundamental de defesa da planta, com maior síntese ocorrendo em ambiente menos favorável. SCHEFFER (1998) verificou aumentos na produção de massa fresca da parte aérea e no conteúdo de princípio ativo, em *Achillea millefolium* L., com aumento nos níveis de adubo orgânico.

Os trabalhos sobre os efeitos do substrato (adubação orgânica e/ou inorgânica) no acúmulo de metabólitos secundários, em plantas medicinais, são muito controversos. Por exemplo, KAWATANI *et al.* (1980), MAGALHÃES *et al.* (1994), CORRÊA JUNIOR (1998), BLANCO (1998), KAMADA (1998) e BORELLA *et al.* (1999) não encontraram diferenças significativas entre as adubações. Entretanto, DAVIES (1997), SCHEFFER (1998), LUNKES *et al.* (1999), BLANK *et al.* (2000), CHAVES *et al.* (2001) verificaram

que, com adubação, houve aumento na produção de princípios ativos. Existem, ainda, trabalhos em que a adubação orgânica e/ou inorgânica diminuiu a quantidade de princípios ativos de interesse conforme relatado por MING (1998), KAMADA (1998), CECÍLIO FILHO *et al.* (2000) e BATTISTELI (2001).

No Quadro 4, observa-se que houve efeito significativo da condição ambiente (dentro da casa-de-vegetação com sombrite ou em pleno sol) para todos os caracteres, exceto peso da matéria fresca da parte aérea. BROWN JR (1988) também relatou que, em plantas submetidas à luz intensa, a produtividade de substâncias secundárias é aumentada. No interior da casa-de-vegetação, com sombrite, detectou-se maior altura nas plantas, isto é, houve estiolamento. Em pleno sol, LI *et al.* (1996) também observaram menor altura das plantas de sálvia.

CASTELANI (1997) observou aumento no crescimento de *Tropaeolum majus* L. em pleno sol, quando comparado com aqueles desenvolvidos em três níveis de sombreamento; o acúmulo do ácido erúico, também, foi maior.

Da mesma forma, DEMEYER e DEJAEGERE (1997) observaram maior acúmulo de alcalóide em *Datura stramonium* var. *tatula* L. Torr, sob maior irradiância. A irradiância influenciou a produção de óleo essencial, em *Thymus vulgaris*, em experimentos conduzidos por LETCHAMO e GOSSELIN (1996). CLARK e MENARY (1980) observaram diferenças significativas quanto à quantidade e qualidade do óleo essencial de *Mentha piperita*, submetida a dois fotoperíodos. Também CARVALHO (2001) obteve maior produção de partenólídeo, em *Tanacetum parthenium*, crescidos, em ambientes com alta irradiância.

4.2.2 Análise das interações

4.2.2.1- Número de folhas (NF)

Constatou-se significância para os efeitos principais e interação SxE (substrato x condição do experimento), no número de folhas (Quadro 4). No genótipo B, detectou-se número de folhas, significantemente, maior do que no genótipo C (Quadro 5). No Quadro 6, observa-se que o substrato contendo húmus de minhoca proporcionou maior número de

folhas, tanto dentro quanto fora da casa-de-vegetação. Este resultado pode ser explicado pelo fato de o substrato humus fornecer condição nutricional melhor do que o solo, contribuindo com o desenvolvimento da planta.

Analizando apenas o substrato na presença de humus, o maior número de folhas foi observado em condição ambiente. Desse modo, pode-se afirmar que *Eclipta alba* é mais adaptada à condição de pleno sol, o que não ocorreu com sálvia (*Salvia officinalis*), em que LI *et al.* (1996) constataram maior número de folhas sob 45% de luminosidade.

4.2.2.2-Peso da matéria fresca da parte aérea (PMFA)

No Quadro 4, pode-se verificar que duas interações simples (SxE) e (GxS) foram significativas para a característica peso da matéria fresca da parte aérea (PMFA). Analisando a interação SxE (Quadro 7), constatou-se que o substrato contendo humus promoveu maior peso da matéria fresca da parte aérea do que no solo sem humus, em ambas as condições. Considerando apenas o substrato com humus, o peso da matéria fresca da parte aérea na condição ambiente foi superior à de casa-de-vegetação confirmando que as condições de pleno sol e humus contribuem, favoravelmente, para o desenvolvimento das plantas. Dessa forma, este resultado é mais um indicativo de que *Eclipta alba* é mais adaptada às condições de irradiância total.

Analizando a interação GxS (Quadro 8) para PMFA, constatou-se que o substrato contendo humus de minhoca também proporcionou, nos três genótipos, maiores médias do que aquelas obtidas na sua ausência. Considerando o substrato contendo apenas solo, os genótipos tiveram médias que não diferiram entre si; no entanto, quando se adicionou o humus à composição do substrato, o genótipo C foi superior ao genótipo A. Fica evidente a importância do estudo da interação genótipo x ambiente, e neste trabalho, a presença de humus contribuiu para o maior desenvolvimento da planta.

Quadro 6 – Valores médios do número de folhas por planta de *Eclipta alba* (L.) Hassk, na interação S x E

		Substrato					
		Solo			Humus		
condição	casa-de-vegetação	61,833	B	a	136,330	A	b
	ambiente	85,416	B	a	404,166	A	a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 7 – Valores médios do peso da matéria fresca da parte aérea (PMFA) – interação simples SxE

		Substrato					
		Solo			Humus		
Condição	casa-de-vegetação	18,836	B	a	84,835	A	b
	ambiente	11,169	B	a	93,204	A	a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 8- Valores médios do peso da matéria fresca da parte aérea-(PMFA) – interação simples GxS

		Substrato					
		Solo			Humus		
Genótipos	A	17,800	B	a	79,784	A	b
	B	18,216	B	a	88,276	A	ab
	C	8,991	B	a	99,000	A	a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.2.2.3 - Peso da matéria seca da parte aérea (PMSA)

Como pode ser verificado no Quadro 5, o genótipo B teve maior PMSA do que o genótipo C. Nas plantas cultivadas em substrato contendo humus, detectaram-se médias de PMSA superiores às das plantas cultivadas no substrato sem humus, tanto na condição de casa-de-vegetação quanto de ambiente. O PMSA não foi influenciado pelo local de experimento, no substrato contendo apenas solo; no entanto, no substrato contendo humus, a média foi maior para as condições ambiente do que em casa-de-vegetação (Quadro 9). Estes resultados são semelhantes aos do item 4.2.2.2, da interação SxE, considerando que esta variável é oriunda da anteriormente citada.

4.2.2.4 -Peso da matéria fresca da raiz (PMFR)

Houve efeito da interação SxE (Quadro 4). O genótipo B teve PMFR, significativamente, superior ao genótipo C (Quadro 5). O humus de minhoca proporcionou maior PMFR do que na sua ausência, em ambas as condições (casa-de-vegetação e ambiente). Plantas cultivadas em condições ambiente tiveram maior PMFR do que as cultivadas casa-de-vegetação, tanto para os substratos solo quanto solo mais humus de minhoca (Quadro 10). Estes resultados indicam, e confirmam, que a *Eclipta alba* é uma planta mais adaptada em pleno sol, onde o humus contribui significativamente para seu bom desenvolvimento, em virtude da melhoria nos níveis nutricionais do meio.

4.2.2.5-Peso da matéria seca da raiz (PMSR)

Interação (GxSxE) foi detectada em PMSR (Quadro 4). Analisando o PMSR, em casa-de-vegetação, constatou-se diferença significativa, apenas, no genótipo C, em que a presença de humus promoveu maiores valores (Quadro 11). Em condição de ambiente, o PMSR foi superior no substrato com humus, para todos os genótipos, tendo o genótipo C PMSR menor que o genótipo A. Resultado interessante, deve-se à confirmação do efeito positivo do humus no desenvolvimento do sistema radicular de *Eclipta alba*.

Quadro 9– Valores médios do peso da matéria seca da parte aérea (PMSA) – interação simples S x E

		Substrato					
		Solo			Humus		
Condição	casa-de-vegetação	2,3792	B	a	10,2342	A	b
	ambiente	2,3533	B	a	19,6875	A	a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 10 - Valores médios do peso da matéria fresca da raiz (PMFR) na interação (SxE)

		Substrato					
		Solo			Humus		
Condição	casa-de-vegetação	4,7500	B	b	7,757	A	b
	ambiente	9,7783	B	a	21,775	A	a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 11- Valores médios estimados do peso da matéria seca da raiz (PMSR) - interação tripla (GxSxE)

		Condição											
		casa-de-vegetação					ambiente						
		Solo		Humus			Solo		Humus				
Genótipos	A	0,9750	A	a	1,1800	A	a	1,8225	B	a	3,3150	A	a
	B	1,1700	A	a	1,1425	A	a	1,3050	B	ab	3,4675	A	a
	C	0,3325	B	a	1,3875	A	a	0,6325	B	b	2,1875	A	b

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

É de conhecimento geral que o desenvolvimento vegetativo da parte aérea está, intimamente, relacionado ao sistema radicular. Portanto, como o substrato humus proporcionou maior número de folhas e peso de matéria (fresca e seca) da parte aérea, o maior peso de matéria (fresca e seca) da raiz ocorreu no substrato com humus.

4.2.2.6 - Peso da matéria fresca total (PMFTo)

Foram detectadas as interações simples (SxE) e (GxS) no PMFTo (Quadro 4). Na interação SxE, o humus adicionado ao substrato promoveu maior PMFTo (Quadro 12) tanto na condição de casa-de-vegetação como de ambiente. Não houve diferença entre as condições (casa-de-vegetação e ambiente) para o substrato contendo apenas solo; no entanto, no substrato enriquecido com humus, o maior PMFTo foi obtido nas condições de ambiente. As mesmas considerações cabem aqui.

Na interação GxS constatou-se superioridade do substrato enriquecido com humus, em relação ao outro substrato, em todos os genótipos (Quadro 13). O genótipo B foi, significativamente, superior ao genótipo C quanto ao substrato solo. Resultado praticamente inverso foi obtido no substrato solo mais humus em que o genótipo C foi superior ao A, caracterizando interação do tipo complexa. A interação do tipo complexa é uma barreira, quando se pretende indicar genótipos para ampla condição ambiente; no entanto, torna-se desejável na indicação de genótipos para condições específicas, o que possibilita a maximização de resultados.

4.2.2.7-Peso da matéria seca total (PMSTo)

Os genótipos A e B foram superiores aos genótipos C em PMSTo (Quadro 5). No Quadro 14, o humus de minhoca promoveu maior peso da matéria seca total, nas duas condições do experimento (casa-de-vegetação e ambiente). O efeito de humus foi maior em condição ambiente do que em casa-de-vegetação.

Quadro 12 – Valores médios do peso da matéria fresca totall (PMFTo) – interação SxE

		Substrato			
		Solo		Humus	
Condição	casa-de-vegetação	23,587	B a	92,677	A b
	ambiente	20,933	B a	114,990	A a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 13- Valores médios do peso da matéria fresca total (PMFTo) – interação GxS

		Substrato			
		Solo		Humus	
Genótipos	A	25,994	B ab	94,554	A b
	B	27,301	B a	104,165	A ab
	C	13,485	B b	112,791	A a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 14 Valores médios do peso da matéria seca total - interação (SxE)

		Substrato			
		Solo		Humus	
Condição	casa-de-vegetação	3,2050	B a	11,4992	A b
	ambiente	3,6217	B a	22,8133	A a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Sob ponto de vista do produtor de plantas medicinais, há grande interesse na máxima produção de matéria seca que, indiretamente, reflete-se em maior renda. Desse modo, pode-se afirmar que o humus promove aumento significativo na produção de matéria seca em *Eclipta alba*. A maior produção de matéria seca propiciada pelo humus está relacionada à melhoria da condição ambiente, dada pelo fornecimento de nutrientes. É de conhecimento geral que o humus também promove a melhoria das propriedades físicas do solo.

4.2.2.8 – Conteúdo de demetilwedelolactona na raiz (DWR)

O conteúdo de demetilwedelolactona na raiz (Quadro 4) foi, significativamente, influenciado pelo genótipo, composição do substrato e condição do experimento. Analisando os resultados apresentados no Quadro 15, nenhuma diferença significativa foi constatada entre os genótipos e entre os substratos dentro da casa-de-vegetação; no entanto, sob condição ambiente, constatou-se, no genótipo C, maior média de demetilwedelolactona no substrato solo.

Observou-se resultado interessante, pois, no substrato sem de humus, sempre ocorreram os menores valores nos caracteres morfométricos discutidos anteriormente e, no entanto, ele promoveu maiores médias do conteúdo de demetilwedelolactona na raiz. Segundo MING (1998), o aumento da adubação provocou decréscimo no teor de óleo essencial em *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., ou seja, o óleo essencial cumpre papel fundamental de defesa da planta com maior síntese quando em ambiente menos favorável, sendo que, no presente trabalho, na ausência de humus, o solo estimulou mais o genótipo C, ou seja, este substrato atuou como ambiente estressante.

Quadro 15 - Valores médios do conteúdo de demetilwedelolactona na raiz (DWR) - interação (GxSxE)

		Condição							
		casa-de-vegetação				ambiente			
		Solo		Humus		Solo		Humus	
Genótipos	A	1,8105	A a	1,4156	A a	1,7213	A b	1,9337	A a
	B	1,3370	A a	1,0492	A a	1,3422	A b	1,5037	A a
	C	0,8674	A a	0,7748	A a	3,6846	A a	1,6463	B a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.2.2.9 – Conteúdo de demetilwedelolactona na parte aérea (DWA)

Houve interação significativa SxE (Quadro 4). No Quadro 5, observa-se que o genótipo A teve média do conteúdo de demetilwedelolactona na parte aérea maior do que o genótipo C. No Quadro 16, verifica-se que, no substrato enriquecido com humus, houve produção superior àquele sem humus, no experimento realizado em condição ambiente (em pleno sol), indicando que não se pode generalizar que as condições adversas necessariamente induzem à maior produção de metabólitos secundários. Evidenciou-se, desse modo, a possibilidade de produção de princípios ativos de interesse medicinal aliada à boa produtividade de matéria seca da parte aérea, maximizando sua exploração. No Quadro 16, observa-se que o conteúdo de demetilwedelolactona foi superior no experimento conduzido em condição ambiente, nos dois tipos de substratos (Quadro 16).

Quadro 16 – Valores médios do conteúdo de demetilwedelolactona na parte aérea (DWA) - interação (SxE)

		Substrato			
		Solo		Humus	
Condição	casa-de-vegetação	1,0895	A b	1,1093	A b
	ambiente	1,4389	B a	1,8494	A a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.2.2.10 – Conteúdo de wedelolactona na parte aérea (WA)

Duas interações simples foram detectadas (GxS) e (GxE) (Quadro 5). Observou-se, no Quadro 17, que o substrato solo proporcionou maior produção de wedelolactona na parte aérea, tal como obtido no conteúdo de demetilwedelolactona na raiz, sustentando as discussões feitas anteriormente. Os genótipos A e B foram superiores ao C, em ambos os substratos; assim, confirmou-se a necessidade de se conhecer as interações genótipo x ambiente conforme o princípio ativo que se interessa explorar em *Eclipta alba*.

Como descrito anteriormente, em condição de pleno sol, o genótipo C teve maior média de demetilwedelolactona no substrato solo; no entanto, ele teve média de wedelolactona inferior aos genótipos A e B, nas duas condições (casa-de-vegetação, ambiente, substrato solo, substrato solo + humus). Este resultado indica que, se o interesse é demetilwedelolactona, o melhor genótipo é o C cultivado em pleno sol, utilizando apenas solo. Se o objetivo é obter wedelolactona, os genótipos A e B são os mais indicados, sendo que o genótipo A produzirá mais em condições ambiente e no solo sem humus. O genótipo B produzirá bem, tanto em condições ambientes quanto em casa-de-vegetação, porém, utilizando apenas solo, o resultado será melhor.

Na interação GxE o conteúdo de wedelolactona na parte aérea (Quadro 18) observou-se que o genótipo A teve média superior em condição ambiente. No genótipo C, detectou-se conteúdo de wedelolactona, na parte aérea, inferior àquele dos genótipos A e B, tanto sob condição de casa-de-vegetação quanto de ambiente. Assim, evidenciou-se que *Eclipta alba* tem melhor desempenho em condições de pleno sol e possui resposta significativa quanto ao tipo de substrato e que, em geral, as condições mais estressantes (adversas) promoveram maior produção de wedelolactona na parte aérea. Este fato concorda com BROWN JR (1988), ou seja, compostos fenólicos são estimulados sob luz intensa e solos mais pobres.

Quadro 17 – Valores médios para o conteúdo de wedelolactona na parte aérea (WA) - interação (GxS)

		Substrato					
		Solo			Humus		
Genótipos	A	3,5204	A	a	2,5058	B	a
	B	3,1958	A	a	2,0738	B	a
	C	0,7037	A	b	0,3526	B	b

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 18 – Valores médios para o conteúdo de wedelolactona na parte aérea (WA)- interação (GxE)

		Condição					
		casa-de-vegetação			ambiente		
Genótipos	A	2.5447	B	a	3,4840	A	a
	B	2,4789	A	a	2,7907	A	b
	C	0,5412	A	b	0,5150	A	c

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Devido aos efeitos das interações, pode-se afirmar com certa segurança que a exploração de *Eclipta alba* para fins de produção de wedelolactona ou demetilwedelolactona deve ser realizada com cautela, pois, de acordo com os resultados obtidos, a condição ambiente que promove maior produção de matéria seca, nem sempre proporcionarão maior produção do princípio ativo de interesse; embora produzindo maior matéria seca por área, indiretamente ter-se-á maior quantidade de princípio ativo. O melhor é utilizar condições que estimulem, ao máximo possível, a produção de princípio ativo e biomassa.

Neste trabalho, o maior conteúdo de wedelolactona na parte aérea foi obtido em condições de pleno sol e apenas solo como substrato. No entanto, como o humus promoveu produção de matéria seca em torno de cinco vezes mais que solo (Quadro 9), pode-se afirmar que o cultivo de *Eclipta alba* a pleno sol, adubada com humus, seria a melhor indicação na exploração como planta medicinal. Logicamente, cabem aqui considerações sobre o custo e a viabilidade econômica deste sistema, bem como a indústria farmacêutica tem interesse em gastar mesmos solventes na extração do princípio ativo. Portanto, a planta cultivada a pleno sol e no solo sem humus seria interessante economicamente porque o que interessa é o conteúdo de princípio ativo, por grama de matéria seca, isto é, planta com maior teor do princípio ativo por grama de matéria seca (concentração em menor volume).

4.3. Plasticidade Fenotípica

Os Quadros 19, 20 e 21, apresentam a análise de variância dos genótipos A, B e C, separadamente. Detectou-se diferença significativa em todas as variáveis, exceto no conteúdo de demetilwedelolactona na raiz dos genótipos A e B (Quadros 19 e 20).

Adotando a classificação das magnitudes de plasticidade, definidas por SCLHLICHLING e LEVIN (1984), em que Cva maior que 20% indica alta plasticidade, Cva entre 10 a 20%, plasticidade média e Cva menor que 10%, baixa plasticidade, conclui-se que, em média, em doze características morfofitoquímicas houve altas magnitudes de plasticidade. O Cva é menor no conteúdo de demetilwedelolactona, na parte aérea (27,40%), e maior no peso de matéria seca da parte aérea (95,61%) (Quadro 22). Na folha, as diferenças morfológicas foram bastante pronunciadas, ou seja, no interior da casa-de-vegetação com sombrite, as folhas eram maiores e detectou-se média de 99,08, por planta, enquanto, em ambiente ensolarado, detectou 244,79 folhas, por planta, mas de menor dimensão (diminuiu a área). Segundo CUTTER (1986), a folha é o órgão que melhor reflete o ambiente. Assim, no Quadro 22, observa-se que os caracteres relacionados à folha tiveram mais altos CVas, isto é, 95,61% e 92,50% no peso da matéria seca da parte aérea e número de folhas, respectivamente. Os maiores valores de Cva também foram observados por OLIVEIRA (2001), em características relacionadas à folha, isto é, número de folhas e área foliar.

Quadro 19: Análise de variância do genótipo A nos quatro ambientes (2 tipos de substratos e 2 locais) para altura de plantas (cm) (altura), número de folhas (nº folhas), peso (g) da matéria fresca da raiz (PMFR), peso (g) da matéria seca da raiz (PMSR), peso (g) da matéria fresca da parte aérea (PMFA) e peso (g) da matéria seca da parte aérea (PMSA), média geral e respectivos coeficiente de variação

FV	GL	Quadrados médios					
		Altura	Nº Folhas	PMFR	PMSR	PMFA	PMSA
Ambiente	3	1.314,8542 **	106.267,5000 **	251,4000 **	6,2295 **	5.323,6950 **	247,9135 **
Resíduo	12	54,2396	2.969,4583	8,8602	0,2504	38,2887	1,9106
CV (%)		12,16	31,96	25,94	26,02	12,68	15,88
Média		60,56	170,50	11,47	1,92	48,79	8,70

** = F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Continuação: Análise de variância do genótipo A nos quatro ambientes (2 tipos de substratos e 2 locais) para peso (g) da matéria fresca total (PMFT), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na raiz (DW-R), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na parte aérea (DW-A), conteúdo (mg/g matéria seca) de wedelolactona na parte aérea (W-A), média geral e respectivos coeficiente de variação

FV	GL	Quadrados médios				
		PMFT	PMST	DW-R	DW-A	W-A
Ambiente	3	6.916,0798 **	320,4895 **	0,1954 ns	0,5628 *	3,0903 **
Resíduo	12	59,1509	2,7249	0,2528	0,1228	0,4142
CV (%)		12,76	15,5189	29,22	20,39	21,36
Média		60,27	10,64	1,72	1,72	3,01

*, ** = F significativo aos níveis de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

ns = F não significativo.

Quadro 20: Análise de variância do genótipo B nos quatro ambientes (2 tipos de substratos e 2 locais) para altura (cm) de plantas (altura), número de folhas (nº folhas), peso (g) da matéria fresca da raiz (PMFR), peso (g) da matéria seca da raiz (PMSR), peso (g) da matéria fresca da parte aérea (PMFA) e peso (g) da matéria seca da parte aérea (PMSA), média geral e respectivos coeficiente de variação

FV	GL	Quadrados médios					
		Altura	Nº Folhas	PMFR	PMSR	PMFA	PMSA
Ambiente	3	1.499,7708 **	108.009,8333 **	263,7316 **	5,1353 **	6.642,8206 **	258,2100 *
Resíduo	12	10,5104	1.442,8750	11,7543	0,1102	198,6019	3,6112
CV (%)		5,72	19,58	27,60	18,74	26,47	20,67
Média		56,69	194,00	12,42	1,77	53,25	9,19

*, ** = F significativo aos níveis de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente

Continuação: Análise de variância do genótipo B nos quatro ambientes (2 tipos de substratos e 2 locais) para peso (g) da matéria fresca total (PMFT), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na raiz (DW-R), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na parte aérea (DW-A), conteúdo (mg/g matéria seca) de wedelolactona na parte aérea (W-A), média geral e respectivos coeficiente de variação

FV	GL	Quadrados médios				
		PMFT	PMST	DW-R	DW-A	W-A
Ambiente	3	8.209,0848 **	325,8348 *	0,1430 ns	0,5820 **	1,8099 **
Resíduo	12	253,2232	4,6506	0,1424	0,0512	0,1565
CV (%)		24,21	19,63	28,84	16,98	15,02
Média		65,73	10,99	1,30	1,33	2,63

*, ** = F significativo aos níveis de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

ns = F não significativo.

Quadro 21: Análise de variância do genótipo C nos quatro ambientes (2 tipos de substratos e 2 locais) para altura (cm) de plantas (altura), número de folhas (nº folhas), peso (g) da matéria fresca da raiz (PMFR), peso (g) da matéria seca da raiz (PMSR), peso (g) da matéria fresca da parte aérea (PMFA) e peso (g) da matéria seca da parte aérea (PMSA), média geral e respectivos coeficiente de variação

FV	GL	Quadrados médios					
		Altura	Nº Folhas	PMFR	PMSR	PMFA	PMSA
Ambiente	3	1.500,0806 **	86.559,0625 **	185,4410 **	2,7573 **	10.829,5030 **	311,1954 **
Resíduo	12	46,0264	556,1875	6,5449	0,1317	50,0987	0,8656
CV (%)		14,54	15,59	27,96	31,98	13,11	11,50
Média		46,64	151,31	9,15	1,14	54,00	8,09

** = F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Continuação: Análise de variância do genótipo C nos quatro ambientes (2 tipos de substratos e 2 locais) para peso (g) da matéria fresca total (PMFT), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na raiz (DW-R), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na parte aérea (DW-A), conteúdo (mg/g matéria seca) de wedelolactona na parte aérea (W-A), média geral e respectivos coeficiente de variação

FV	GL	Quadrados médios				
		PMFT	PMST	DW-R	DW-A	W-A
Ambiente	3	13.293,4606 **	372,0339 **	7,3110 **	0,4559 **	0,1652 **
Resíduo	12	75,4496	1,4759	0,4957	0,0628	0,0060
CV (%)		13,76	13,16	40,39	23,57	14,73
Média		63,14	9,23	1,74	1,06	0,53

*, ** = F significativo aos níveis de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Quadro 22: Estimativas dos coeficientes de variação (CVa_i) e índice de determinação ambiental (Ia^2) para os caracteres morfométricos e fitoquímicos: altura (cm) de plantas (altura), número de folhas (nº folhas), peso (g) da matéria fresca da raiz (PMFR), peso (g) da matéria seca da raiz (PMSR), peso (g) da matéria fresca da parte aérea (PMFA) e peso (g) da matéria seca da parte aérea (PMSA), peso (g) da matéria fresca total (PMFT), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na raiz (DW-R), conteúdo (mg/g matéria seca) de demetilwedelolactona na parte aérea (DW-A), conteúdo (mg/g matéria seca) de wedelolactona na parte aérea (W-A)

Genótipos	Estimativas	Caracteres Morfométricos e Fitoquímicos										
		Altura	nº folhas	PMFR	PMSR	PMFA	PMSA	PMFT	PMST	DW-R	DW-A	W-A
A	CVa_i	29,9367	95,5970	69,0950	64,8390	74,7700	90,4640	68,9930	84,1500	12,8485	21,8220	29,1723
	Ia^2	0,9587	0,9720	0,9647	0,9596	0,9928	0,9923	0,9914	0,9914	-0,2937	0,7818	0,8659
B	CVa_i	34,1582	84,7032	65,3713	63,9713	76,5345	87,3851	68,9180	82,1383	14,4543	28,6369	25,5299
	Ia^2	0,9929	0,9864	0,9554	0,9785	0,9701	0,9860	0,9691	0,9857	0,0041	0,9120	0,9135
C	CVa_i	41,5177	97,2190	74,4135	73,1503	96,3642	108,9781	91,3056	104,4942	77,5554	31,7444	38,4800
	Ia^2	0,9693	0,9935	0,9647	0,9522	0,9953	0,9972	0,9943	0,9960	0,9221	0,8622	96,36
média CVa_i		35,2042	92,5064	69,6266	67,3202	82,5562	95,6090	76,4055	90,2608	34,9531	27,40	31,0607
média Ia^2		0,9736	0,9839	0,9616	0,9634	0,9860	0,9918	0,9849	0,9910	0,2108	0,8520	0,9143

O índice de determinação ambiental (Ia^2) mostrou que grande parte da variação total foi devida aos efeitos ambientais (tipos de substrato e intensidade luminosa), obtendo-se valores de 0,9918 no peso da matéria seca da parte aérea (Quadro 22), ou seja, 99,18% da variação foi devida a ambientes e apenas 0,82% devido a outros fatores. O menor valor de Ia^2 foi obtido na a variável conteúdo de demetilwedelolactona na raiz ($Ia^2 = 0,2108$) (Quadro 22).

No Quadro 22, observa-se que os maiores valores de Cva e Ia^2 foram detectados nos caracteres morfométricos, com média de 71,646 e 0,8706, respectivamente, enquanto os menores ocorreram nos caracteres fitoquímicos, com média de 31,79 e 0,6590, respectivamente. Segundo SCHLICHTING e LEVIN (1984), as estruturas reprodutivas devem ser preservadas a fim de garantir a sobrevivência da espécie e, por isso é de se esperar plasticidade baixa. Uma vez que metabólitos secundários têm função ecológica, protegendo contra ataques de fungos ou pragas e herbívoros, devem também ser preservados para garantir a manutenção da espécie. Essa menor plasticidade dos caracteres fitoquímicos, talvez, explique os resultados controversos de experimentos com plantas medicinais versus fatores ambientais, os quais devem ser bem conduzidos. SCHLICHTING e LEVIN (1984), investigando se a variação no nível de plasticidade está relacionada à evolução de plantas em espécies silvestre e domesticada de *Flox*, verificaram que os caracteres mais relacionados com valor adaptativo sofreram menor mudança.

KAMADA (1999) e OLIVEIRA (2001), trabalhando com plantas medicinais, observaram o CVas e o Ia^2 altos, indicando plasticidade em *Ocimum basilicum* L.e *Bidens pilosa*. Da mesma forma, neste estudo, nos caracteres morfométricos detectou-se maior plasticidade, comparativamente aos caracteres fitoquímicos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho, estudou-se a interação genótipo-ambiente e a plasticidade fenotípica de três genótipos de *Eclipta alba* (L.) Hassk, em quatro ambientes. Os ambientes foram constituídos pela combinação de dois tratamentos de adubação (solo e solo + humus de minhoca) e duas condições, isto é, em casa-de-vegetação com 30% de sombreamento e em pleno sol, 100% de irradiância. Os genótipos foram multiplicados, a partir de uma única planta matriz, para avaliação dos caracteres morfométricos e químicos. Os caracteres morfométricos avaliados foram: altura da planta na época da colheita, número de folhas por planta, peso da matéria fresca da raiz, peso da matéria seca da raiz, peso da matéria fresca da parte aérea, peso da matéria seca da raiz, peso da matéria fresca total e peso da matéria seca total. Quimicamente, foram quantificados os isoflavonóides demetilwedelolactona e wedelolactona, na raiz e parte aérea, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições e duas plantas por parcela, e foram feitas análises de variância individual e conjunta dos experimentos na avaliação da interação genótipo x ambiente. No estudo sobre a plasticidade fenotípica, desconsiderou-se a estrutura do delineamento com o objetivo de obter a média, o quadrado médio de ambiente e o quadrado médio de resíduo, para cada genótipo separadamente. A plasticidade foi estudada quanto a magnitude, utilizando-se o coeficiente de variação ambiental (CVa) e o índice de determinação ambiental (Ia^2). O CVa

estimou a magnitude da plasticidade e adotou que as características apresentando valores de CVa menores que 10 são de baixa magnitude, as de valores entre 10 e 20 são de média magnitude e as de valores acima de 20 são de alta magnitude. Os valores de Ia^2 serviram à representação da quantidade de variação total atribuída ao efeito ambiental.

Nas condições em que o experimento foi conduzido e de acordo com os resultados, conclui-se que:

- *Eclipta alba* (L.) Hassk possui plasticidade fenotípica passível de se detectar, morfoquimicamente.
- Os caracteres morfométricos são mais plásticos do que os químicos.
- Os efeitos da plasticidade são relevantes quanto aos caracteres relacionados à folha.
- O genótipo A é mais produtivo, quanto aos princípios ativos avaliados na parte aérea, e o genótipo C quanto à demetilwedelolactona na raiz, sendo que ambos devem ser cultivados a pleno sol, preferencialmente sem húmus de minhoca.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas regiões urbana e rural de Viçosa (MG), foram observadas plantas de *Eclipta alba* com características morfológicas distintas. O presente trabalho objetivou caracterizar química, isoenzimática e morfometricamente oito acessos, sendo sete provenientes da região de Viçosa (MG) e um de Sacramento (MG), bem como analisar interação genótipo x ambiente e a plasticidade fenotípica de caracteres morfofitoquímicos de três genótipos de *Eclipta alba*, em quatro ambientes.

Instalou-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado (Capítulos 1 e 2), sendo oito acessos e cinco repetições, com uma planta por parcela. Na caracterização isoenzimática, utilizou-se os sistemas PGM, SKDH, PGI, MDH e EST, sendo que os três últimos revelaram polimorfismo suficiente, permitindo a análise de agrupamento e a formação de quatro grupos:

grupo I – com duas plantas do acesso CEN;

grupo II – com duas plantas do acesso CEN;

grupo III – acessos CEM e AFR; e

grupo IV – acessos CEN, SAC, CV, JAN, HEN e SIL.

Houve variação tanto entre quanto dentro dos acessos.

Nas plantas do tipo A ocorreram maiores médias dos caracteres morfométricos e menores médias dos caracteres fitoquímicos, ao contrário das plantas tipo B. Os dados de análises isoenzimáticas (Capítulo 1) e morfitoquímicos (Capítulo 2) complementam-se, sendo suficientes ao estabelecimento de duas variedades taxonômicas de *Eclipta alba*.

No estudo sobre a interação genótipo x ambiente e a plasticidade fenotípica dos três genótipos (A, B, C) de *Eclipta alba*, utilizou-se a combinação de dois níveis de substrato (solo e solo + humus) e duas condições ambientais (casa-de-vegetação e a pleno sol). Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e duas plantas por parcela, totalizando 96 plantas. No estudo sobre a interação genótipo x ambiente houve significância dos efeitos principais, em todas as características. A interação SxE foram significativas quanto ao maior número de características. As interações GxS e GxE foram significativas na maioria dos caracteres fitoquímicos. Ocorreu interação tripla (GxSxE) em peso da matéria seca da raiz (PMSRa) e conteúdo de demetilwedelolactona na raiz (DWR).

Estudou-se a plasticidade pelo componente magnitude de resposta, utilizando o coeficiente de variação ambiental (Cva) e o índice de determinação ambiental (Ia^2).

No Cva, estabeleceu-se que valores menores do que 10 são de baixa magnitude, os valores entre 10 – 20 são de média magnitude e aqueles acima de 20, de alta magnitude. Os valores de Ia^2 serviram à representação da quantidade de variação total atribuída ao efeito ambiental. Nas condições em que o experimento foi conduzido e de acordo com os resultados, conclui-se que:

- *Eclipta alba* (L.) Hassk possui plasticidade fenotípica passível de se detectar, morfofitoquimicamente.
- Os caracteres morfométricos mostraram-se mais plásticos do que os químicos.

- Os efeitos da plasticidade foram relevantes quanto aos caracteres relacionados à folha, em que o Cva foi 95,61% e 92,50% no peso da matéria seca da parte aérea e no número de folhas, respectivamente.
- No estudo sobre a interação genótipo x ambiente, o genótipo A foi considerado como sendo o maior produtor de wedelolactona, na parte aérea, e o genótipo C como maior produtor de demetilwedelolactona na raiz, ambos no ambiente ensolarado e sem húmus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W., PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isozimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242p.
- ALLARD, R.W., BRADSHAW, A.D. Implications of genotype-environment interactions in applied plant breeding. **Crop Science**, v.4, p.503-508, 1964.
- ALMEIDA, V.P., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Análise enzimática e quimiotaxonomia de duas variedades de *Ocimum nudicale* Benth. (Labiatae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.75-80, 1986.
- AMARAL, C.L., OLIVEIRA, J.E.Z. de, CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: melhoramento genético**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 139p.
- AMARAL, C.L.F., CASALI, V.W.D. Identificação e caracterização de populações de alfavaca (*Ocimum selloi* Benth.) por meio de marcadores isozimáticos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.2, n.2, p.9-15, 2000.

- ARRUDA, E.S. de **Levantamento bibliográfico de plantas medicinais usadas contra “picada de cobras”** - Monografia (Curso de Animais Peçonhentos e venenosos) Cuiabá, MT: UFMT, 1992. p.
- ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.A.; BERES, W.; HANCHE, P.E. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in peach. **Journal Heredity**, v.77, p.49-51, 1986.
- ASSIS, M. C. de **Aspectos taxonômicos, anatômicos e econômicos da “ipeca” *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (RUBIACEAE)**. São Paulo, SP: 1992. 132p. Tese (Mestrado em Botânica) - Universidade de São Paulo, 1992.
- ATAL, C. K., KAPUR, B. M. **Cultivation and utilization of aromatic plants**. Jammu_Tawi, Índia: Regional Research Lab.,1982. v. 1.
- BALLVÉ, R.M.L. **Marcadores isoenzimáticos e biologia da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. Campinas, SP: UNICAMP, 1992. 106 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, 1992.
- BARROS, R.M.F., ANDRADE, L.H.C., SILVA, N. H. **Efeito da radiação sobre o crescimento e a produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* VAR. *stenophylla* Leonard**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, 1994. Fortaleza. **Resumos...**Fortaleza: 1994. p.33.
- BATTISTELLI, J.Z.;CONTE, C.O.; LAURA, V.A.; FAVERO, S. -2001 – **Crescimento, produção de biomassa e óleo essencial de *Ocimum basilicum*, em função do tipo de adubação**. JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5, 2001, Botucatu. **Resumos...**Botucatu, UNESP, 2001. p.59
- BIONDO, R., PEREIRA, A.M.S., BERTONI, B.W., PEREIRA, P.S., FRANÇA, S.C. **Avaliação do teor de cumestanos em plantas de *Eclipta alba* em diferentes fases fenológicas**. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5, 2001, Botucatu. **Resumos...**Botucatu: UNESP, 2001. p.36.

- BIZÃO, N., CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Ipeca** (*Cephaelis ipecacuanha*)- Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2000. 115p.
- BLANCO, M.C.S.G. Biomassa e mucilagem da tanchagem (*Plantago major* L.) em função das adubações orgânica, mineral e mista e da supressão das inflorescências. In **Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares – Avanços na Pesquisas Agronômica**. Ming, L.C. (COORD.), SCHEFFER, M.C., CORREA JUNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A., Botucatu, UNESP, 1998. Vol. II, p. 139-154.
- BLANK, A.F, SILVA, P. de A., BARRETO, P.A., BLANK, M.F.A., OLIVEIRA, R.L.B., 2000. **Adubação química e orgânica em capim-santo** (*Cymbopogon citratus*) – In SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000. Recife. **Resumos** ...Recife: 2000. p.77.
- BORELLA, J.C., FONTOURA, A., GOMIERO, F.A., MENEZES JR, A., FRANÇA, S.C., 1999. **Ensaio de adubação com monitorização química em elementos masculinos de *Baccharis trimera* Less – Carqueja** . In.: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 4, Ribeirão Preto. **Resumos**...Ribeirão Preto, UNAERP, 1999. p.61.
- BORTHAKUR, M., DUTTA, K., NATH, S.C., SINGH, R.S. Micropropagation of *Eclipta alba* and *Eupatorium adenophorum* using a single-step nodal cutting technique – **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 239-242, 2000.
- BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances Genetics**, v.13, p.115-155, 1965.
- BRANDLE, J.E. e ROSA, N. Heritability for yield, leaf:stem and stevioside content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana* **Canadian Journal of Plant Science**. v.72, p. 1263-1266, 1992
- BRANDLE, J.E., STARRATT, A.N., GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v.78, p.527-536, 1998.

- BREWER, G.L., SING, C.F. **An introduction to isozyme techniques**. New York: Academic Press, 1970, 186p.
- BROWN JR, K.S. Engenharia Ecológica: Novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Suplemento da Acta Amazônica**, v. 18, n.1-2, p.291-303, 1988.
- BROWN, A.H.D., ALLARD, R.W. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. **Genetics**, v.66, p.133-145, 1970.
- BRUNE, W., ALFENAS, A.C., JUNGHANS, T.G. Identificações específicas de enzimas em géis. In.: ALFENAS, A.C. (Eds.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, 1998. 574p.
- CAPOTE, S., ORTA, R., PÉREZ, E., Estrategia de reproducción de una mala hierba: *Bidens pilosa* L. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 7, n.1, p.73-79, 1986..
- CARVALHO, L.M. de **Disponibilidade de água, irradiância e homeopatia no crescimento e teor de partenólídeo em Artemísia**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 139p. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- CASTELANI, D.C. **Crescimento, anatomia e produção de ácido erúico em *Tropaeolum majus* L.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 108p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- CASTRO, D. M. de **Caracterização isozimática, da anatomia foliar, do óleo essencial e germinação de *Leonurus sibiricus* L.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 96p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CASTRO, H. G. de **Caracterização isozimática, crescimento e rendimento de tanino em seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D. C.).** Viçosa, MG: UFV, 1998. 113p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CECÍLIO FILHO, A.B., SOUZA, R.J., BRAZ, L.T., TAVARES, M., 2000. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros potenciais. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p. 171-175.

- CHAVES, F.C.M.; MING, L.C.; FERNANDES, D.M.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A., 2001. **Produção de alfavaca-cravo em função da adubação orgânica e estações climáticas.** In. JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5, 2001. Botucatu. **Resumos...** Botucatu: 2001. p.77.
- CHEN, F.T., ZHANG, G.H. Studies on several physiological factors in artemisinin synthesis in *Artemisia annua*. **Plant Physiology Communications**, v.5, p.26-30, 1987.
- CLARK. R.J.; MENARY, R.C., 1980. Environmental effects on peppermint (*Mentha piperita* L.). I. Effect of daylength, photon flux density, night temperature and day temperature on the yield and composition of peppermint oil . **Australian Journal Plant Physiology**, v. 7, p.685-692.
- CONKLE, M.T., HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. *et al.* **Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual.** Berkeley: USDA, Forest Service, 1982. 18p.
- CORRÊA JUNIOR, C. “Mandirituba”: nova cultivar brasileira de camomila. **Horticultura Brasileira**, v.13, n.1, p.61, 1995.
- CORRÊA JUNIOR, C. Influência das adubações orgânica e química na produção de camomila *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert e do seu óleo essencial. In: **Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agrônômica.** MING, L.C.(COORD.), SCHEFFER, M.C., CORRÊA JUNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A., Botucatu, Universidade do Estado de São Paulo, 1998. v.I p.129-164.
- CRUZ, C.D. Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Piracicaba: ESALQ, USP, 1990. 1888P. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1990.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES; aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 442p.
- CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal** – Parte II – Órgãos – experimentos e interpretação. São Paulo: Roca. 1986. 336 p.

- DAVIES, P. Experiencias de cultivo de *Achyrocline flaccida* Weinm. y *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. en Uruguay. In: **WOCMAP**, 2, 1997, Mendoza. **Resumos...** Mendoza, 1997. L.7.
- DEGANI, C., GAZIT, S. Selfed and crossed proportions of avocado progenies produced by caged pairs of complementary cultivars. **HortScience**, v.19, n.2, p.258-260, 1984.
- DEMEYER, K.;DEJAEGERE, R. The influence of the $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ balance and light energy on alkaloid content and partitioning in *Datura stramonium*. **Australian Journal Botany**,v.45, p.81-101, 1997.
- DHAWAN, O. P., LAVANIA, U. C., Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. **Euphytica**, v.87, p.81-89, 1996.
- DI STASI, L. C. **Química de produtos naturais: principais constituintes ativos**. In: - Plantas medicinais: arte e ciência; um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: SP: EDUNESP,1996. p. 109-27.
- DIXON, R.A., PAIVA, N.L. Stress induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, p.1085-1097, 1995.
- DUARTE, F.R. **Influência de dois tipos de solos sobre o teor total de alcalóides do confrei** (*Symphytum* sp.). Piracicaba, SP: 1984. 84p. Tese (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1984.
- ECHEVERRY, S.H., MUÑOZ, 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 Agronômica**, v.40, n.1-2, p.51-63, 1990
- FARNSWORTH, N.R., AKERELLE, O., BINGEL, A.S., SOEJARTO, D.S., GUO, Z. **Medicinal plants in therapy**. Bulletin of the World Health Organization v.63, n.6, p.965-981, 1985.

- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
- FIGUEIREDO, R.C.L. Sobre a anatomia dos órgãos vegetativos de *Ocimum nudicaule* Benth. (Labiatae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.44, n.3-4, p.549-570, 1972.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., GIULIETTI, A.M., BARRADAS, M. *et al.* Morphology and essential oil in the taxonomy of *Ocimum nudicaule* Benth. (Labiatae). **Anais da Academia da Brasileira de Ciências**, v.32, p.65-71, 1978.
- FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.– 2ª Edição revisada. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC, 2000. p.101-122.
- FRANZ, C. Genetics. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman Group, 1993. p.63-69.
- FUENTES-GRANADOS, R.G, WIDRLECHENER, M.P., WILSON, L.A., Allozyme inheritance in Anise hyssop (*Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (Lamiaceae). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.123, n.5, p.868-874, 1998.
- GARCIA, E.S., SILVA, A.C.P., GILBERT, B. *et al.* Fitoterápicos. In: Workshop. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. Campinas, SP: Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello”, 1996. 17p.
- GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Recent Advances in Phytochemistry**, v.18, p. 273-321, 1984
- GOLDRING, A., GAZIT, S., DEGANI, C. Isozymes analysis of mature ovocato embryos to determine outcrossing rate in a “Hass” plot. **Journal American Society for Horticultural Science**, v.112, p.389-392, 1987.

- GOMES, J.M. **SAEG**. Viçosa:CPD/UFV, 1992. 100p.
- GOODMAN, M.M., STUBER, C.W. Maize. In: TANKSLEY, S.D. e ORTON, T.J., eds. **Isozymes in plant genetics and breeding**, Part B. amsterdam, Elsevier, 1983. p. 1-33.
- GORMAN, M. B., Kiang, Y.T. Models for the inheritance of several variant soybean electrophoretic zymograms. **Journal of Heredity**, v.69, p.255-258, 1978.
- GOTTLIEB, L.D., Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, v.21, n.18, p.939-944, 1971.
- GOTTLIEB, L.D. Conservation and duplication of isozyme in plants. **Science**, v. 216, p. 373-379, 1982.
- GOTTLIEB, O.R. Ethnopharmacology versus chemosystematics in the search for biologically active principles in plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.6, p. 227-38, 1982.
- GOTTLIEB, O.R., KAPLAN, M.A.C., BORIN, M.R.M.B. **Biodiversidade; um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996. 268p.
- GRAVES, A.H. Breve resumo histórico do uso das plantas medicinais. *Revista da flora Medicinal*, v.19, p.43-66, 1945.
- GUPTA, M. P., CEDEÑO, J. E., SOTO, A.A., CORREA, D. Seasonal variation in the alkaloidal content of *Panamanianum ipecac*. **Fitoterapia**, v.57, n.3, p.147-151, 1986.
- GUREVITCH, J. Variation in leaf dissection and leaf energy budgets among populations of *Achillea* from an altitudinal gradient. **American Journal Botany**, v.75, n.9, p.1298-1306, 1988.
- HARRY, D.E., Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isozymes in incense cedar (*Calocedrus decurrens*) and its implications for population studies. **Biochemical Genetics**, v.21, p.417-434, 1983.

- HARRY, D.E., Inheritance and linkage of isozyme variants in incense cedar. **Journal of Heredity**, v.77, p.261-266, 1986.
- HATFIELD, G. M. *et al.* An investigation of panamanian ipecac: botanical source and alkaloid analysis. **Journal of Natural Products**, v. 44, n.4, p. 452-456, 1981.
- HAY, R.K.M, SVOVODA, K.P. Botany. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. Essex: Longman group, 1993. p.5-19.
- HEGNAUER, R. Chemotaxonomy. In: ATAL, C.K., KAPUR, B.M. **Cultivation and utilization of aromatic plants**. Jammu-Tawi, Índia: Council of Scientific & Industrial Research, 1982. v.3, p.1-23.
- HERTWIG, I.F. von, 1986. **Plantas aromáticas e medicinais – plantio, colheita, secagem e comercialização** – São Paulo: Ícone 441p.
- INGROUILLE, M. **Diversity and evolution of land plants**. London: Chapman & Hall, 1992. 340p.
- JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhenta do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira** - São Paulo: Lor Cury, n.2, p.66-77, 1990.
- KAHLER, A.L. Inheritance and linkage of acid phosphatase locus Acp4 in maize. **Journal of Heredity**, v.74, p.239-246, 1983.
- KAMADA, T. **Plasticidade fenotípica da morfologia e do óleo essencial em acessos de manjerição (*Ocimum spp.*)**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 58p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- KAMADA, T., CASALI, V.W.D., BARBOSA, L.C.A. FORTES, I.C.P., FINGER, F.L., Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjerição (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.1, n.2, p.13-22, 1999.

- KAWATANI, T. *et al.* On the cultivation of kaa-he-e (*Stevia rebaudiana*). VI. Response of kaa-he-e to potassium fertilization rates and to three major elements of fertilizer. **Nettai Nogyo**. v. 4, n.3, p.105-112, 1980.
- KAY, M.A., **Healing with plants in the American and Mexican West**. The University of Arizona Press, Tucson, 1996. 315p.
- KISMANN, K.G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo. BASF., 1995. v.3. 683p.
- LANS, C., HARPER, T., GEORGES, K., BRIDGEWATER, E. Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p.201-220, 2000.
- LEAL, L.K.A.M., FERREIRA, A.A.G., BEZERRA, G.A., MATOS, F.J.A., VIANA, G.S.B., Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.151-159, 2000.
- LETCHAMO, W.; GOSSELIN, A. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply, **Journal of Horticultural Science**, v.71, n.1, p. 123-134, 1996.
- LI, Y.; CRAKER, L.E.; POTTER, T., 1996. Effect of light on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*) – **Acta Horticulturae**, v.426, p. 419-426.
- LIMA FILHO, O.F., MALAVOLTA, E. YABICO, H.Y., 1996. Influência de estresses nutricionais no teor e produção de esteviosídeo durante o desenvolvimento da estévia. – **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n.5, p.489-494.
- LOPES, R. **Polimorfismo, sistema de acasalamento, polinizações, repetibilidade de características do fruto e avaliação de genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.)**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 146p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

- LOPES, R.C., **Caracterização isozimática, diversidade genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 88p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- LORENZI, H. **Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas.** 2^a ed., Nova Odessa, SP: 1986. 220p.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.** 3^a Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.
- LUCKNER, M. **Secondary metabolism in plants and animals.** New York: Academic Press, 1972. 404p.
- LUNKES, J.A., OLIVEIRA, J.A., ARGENTA, J.A., OLIVEIRA, V.A., 1999. **Efeitos da adubação mineral e orgânica sobre a produção de biomassa e óleo essencial de *Cymbopogon citratus*** – In.: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 4, 1999. **Resumos...** Ribeirão Preto, 1999. p. 63.
- MAGALHÃES, P.M. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical.** Campinas, SP: UNICAMP, 1996. 117p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de Campinas, 1996.
- MAGALHÃES, P.M., ARCHANGELO, JR, LUCIO, E.M.R.A, BOSSHARD, R., SHARAPIN, N., 1994. **Influência da adubação N-P-K nos rendimentos de biomassa e de glicosídeos cardiotônicos em *Digitalis lanata* L. e *Digitalis purpurea* L.** In.: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, 1994, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: 1994. p.43.
- MANN, J., **Secondary Metabolism.** Claredon Press – Oxford – 2^a Edição, 1987. p. 374
- MARKET, C.L., MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic and species especific patterns. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 45, p. 753-762, 1959.

- MARTINS-CORDER, M.P., MORI, E.S., CARVALHO, M.T.V., DERBYSHIRE, E. Genetic diversity of three size classes of seeds of *Eucalyptus globulus* spp. *Globulus. Siva Genética*, v.47, p.6-14, 1998.
- MARTINS, E. R., **Conservação da poaia (*Psychotria ipecacuanha*): coleta, ecogeografia, variabilidade genética e caracterização reprodutiva**. Campos de Goytacazes, RJ: UENF, 2000. 109p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2000.
- MARTINS, E.R. **Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** Viçosa, MG: UFV, 1996. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M. de, CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E., **Plantas Medicinais**. Viçosa, MG: UFV, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 220p.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas: Sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 2. Ed. rev. e atual. Fortaleza, CE: EUFC, 1994. 179p.
- MCFARLANE, J.C., Light In: LANGHANS, R.W. **A growth chamber manual**. London: Cornell University Press, 1978. p.17-44.
- MEHRA, P.N., GILL, B.S., MEHRA, J.K., SIDHU, S.S. Cytological investigations on the Indian Compositae I. North India Taxa. *Caryologia*, v.18, p.35-68, 1965.
- MELGUES, G.P., SONNET, P.E. Isolation of erucic acid from rapessed oil by lipase catalysed hydrolysis. *Jaocs*, v.72, p.213-217, 1983.
- MELLO, L.R.S. **Determinação do modo de reprodução de *Melinis minutiflora* Beauv. por padrões isozimáticos**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 91p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.

- MELO, P.A., do NASCIMENTO, M.C., MORS, W.B., SUAREZ-KURTZ, G., Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v.32, p.595-603, 1994.
- MILACH, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A., GIÚDICE, M.P., SAKIYAMA, N.S., SEDIYAMA, T., MOREIRA, M.A., PORTUGAL, R.S. – Eds. **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa, MG: UFV. 1998. p. 43-58.
- MING, L.C. Adubação orgânica no cultivo de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br – Verbenaceae. In.: **Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agronômica** MING, L.C.(COORD.), SCHEFFER, M.C., CORRÊA JUNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A., Botucatu – Unesp, 1998. v. I, p.165-191.
- MIRALDI, E., MASTI, A., FERRI, S., COMPARINI, I.B. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. **Fitoterapia**, v.72, p.644-648, 2001.
- MORAIS, O.P. **Análise multivariada da divergência genética dos progenitores, índices de seleção combinada numa população de arroz oriunda de intercrossamentos, usando macho-esterilidade**. Viçosa, MG: UFV, 1992. 251p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- MORS, W.B., do NASCIMENTO, MC., PARENTE, J.P., da SILVA, M.H., MELO, P.A., SUAREZ-KURTZ, G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of south american rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**, v.27, n.9, p.1003-1009, 1994.
- NEWTON, K.J. Genetics of mitochondrial isozymes. In: TANKSLEY, S.D. e ORTON, T.J., Eds. **Isozymes in plants genetics and breeding**. Amsterdam, Elsevier.,1983. v.1, p.157-174.
- OLIVEIRA, A.C.B. **Isozimas na identificação de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa, MG: UFV, 1992. 87p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.

- OLIVEIRA, J.E.Z. de **Plasticidade fenotípica da morfologia, de marcadores químicos e da anatomia de acessos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes**. Viçosa, MG: UFV, 2001.239p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- OLIVEIRA, J.E.Z. de, AMARAL, C.L.F., CASALI, V.W.D. **Plantas Medicinais e aromáticas: avanços no melhoramento genético**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 2001. 155p.
- OLIVEIRA, J.E.Z. de, CASALI, V.W.D. Caracterização isozimática de acessos de *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.2, n.1, p.19-26, 1999.
- OLIVEIRA, L.O. de e MARTINS, E.R. **O desafio das plantas medicinais brasileiras – I – o caso da poaia (*Cephaelis ipecacuanha*)**. Campos dos Goytacazes, RJ: Universidade Estadual do Norte fluminense, 1998. 73 p.
- OLIVER-BEVER, B.E.P **Medicinal Plants in Tropical West Africa**. Cambridge University Press, Cambridge, 1986, 375 p.
- PALEVITCH, D. Agronomy applied to medicinal plant conservation. In: AKERELE, O., HEYWOOD, V., SYNGE, H. **Conservation of medicinal plants**. New York: Cambridge University Press, 1991. p.167-178.
- PARKER, P.G., SNOW, A.A., SCHUG, M.D., BOOTON, G.C., FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations. Choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOME, F. *et al.* **Practical isozyme genetics**. New York: Halsted Press, 1988. 255p.
- PATERNIANI, E. Evolução dos sistemas reprodutivos nos vegetais. **Ciência e Cultura**, v.26, n.5, p.476-481, 1974.

- PATERNIANI, E. Diversidade genética em plantas cultivadas. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1, 1988, Jaboticabal. **Resumos...** Jaboticabal: FCAV, 1988, p.75-77.
- PATNAIK, N. **The Garden Life – An Introduction to the Healing Plants of India –** Daryagany, New Delhi, 1993. 194p.
- PEIRCE, L.C., BREWBAKER, L.C., Applications of isozymes analysis in horticultural science. **HortScience**, v.8, p.361-382, 1973.
- PERECIN, M.B., KAGEYAMA, P.Y. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de espinheira-santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex reiss e suas implicações para o manejo da conservação. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, vol.4, n.2, p.80-90, 2002.
- PEREIRA, A.M. Biotecnologia de plantas medicinais. **Horticultura Brasileira**, v. 18, supl. 2000.
- PEREIRA, A.M.S., BERTONI, B.W., JR., A.M., PEREIRA, P.S., FRANÇA, S.C. Soil pH and production of biomass and wedelolactona in field grown *Eclipta alba*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, vol.6, v.1, p.43-49, 1997.
- PEREIRA, A.V. **Utilização da análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca** (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba, SP: ESALQ, 1989. 180p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1989.
- PERRUCCI, S., MACCHIONI, G., CIONI, P.L., FLAMINI, G., MORELLI, I., Structure/activity relationship of some natural monoterpenes as acaricides against *Psoroptes cuniculi*. **J. Natl. Prod.**, v.58, p.1261-1264, 1995.

- PINHEIRO, S.S.C., DIAS, M.R.N., ALMASSY JR, A.A., SILVA, E.A.M., MEIRA, R.M.A.; VALE, F.H.A. **Caracterização Anatômica de folha e caule de *Eclipta alba* (Asteraceae).** In: ENCONTRO DE BOTÂNICOS, 23, 2001, Viçosa. **Resumos...**Viçosa:UFV, 2001. p.151.
- PIO CORREIA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro:IBDF, 1969. v.4, p.33-34.
- PIRES, M.J.P. Aspectos históricos dos recursos genéticos de plantas medicinais. **Rodriguésia**, v. 36, n.59, p. 61-66. 1984.
- PRAMANIK, S., RAYCHAUDHURI, S.S., DNA content, chromosome composition, and isozyme patterns in *Plantago* L.. **The Botanical Review**, v.63, n.2, p.124-139, 1997.
- PRASAD, S., The influence of fertiliziers on the growth and alkaloidal content of *Hyoscyannus niger* Lin. **Journal of the American Pharmacy Association**, v. 35:121-127, 1946.
- RANGEL, F.A., SILVA, M.A.M., MATOS, J.A., VIANA, G.S.B., Atividade analgésica do extrato hidroalcoólico de *Eclipta alba* (L.) Hassk. In. ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EXPERIMENTAL BIOLOGICAL SOCIETY.1993 Caxambu. **Resumos ...** Caxambu: (FESBE), 1993. p.....
- RICK, C.M., FOBES, J.F., Peroxidase complex with concomitant anodal and cathodal variation in red-fruited tamato species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.73, p.900-904, 1976.
- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In.: ALFENAS, A.C. (Eds.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa, MG: UFV, 1998. p.329-380.
- SAGAR, B.P., ZAFAR, R. Hepatoprotective and cardiac inhibitory of ethanolic extracts from plant leaves and leaf callus of *Eclipta alba*. *Pharmaceutical Biology*, v.38, n.5, p.357-361, 2000.

- SALINAS, J., BENITO, C. Esterase isozymes in rye: characterization, genetic control and chromosomal location. **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, n.1, p.136-140, 1985.
- SAMPIETRO, D. A.; SAMPIETRO, A. R.. Vegetative propagation assays of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – 2^a IUPAC – **International Conference on Biodiversity** – Belo Horizonte – MG, 1999.
- SANTOS, M.A., ELISABETSKY, E.,. Etnofarmacologia com ferramenta na seleção de espécies de Plantas Medicinais para triagem de atividade anti-tumoral. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 2, n.1, p.7-17, 1999.
- SANTOS, P.C. **Plasticidade fenotípica em três ecótipos de capim-gordura** (*Melinis minutiflora* Beauv.). Viçosa, MG: UFV, 1990. 97p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- SARGENT, J.R., GEORGE, S.G. **Method in zone electrophoresis**. 3.ed. Poole, BDH Chemicals, 1975. 219p.
- SAXENA, A.K., SINGH, B., ARNAND, K.K., Hepatoprotective effects of *Eclipta alba* on subcellular levels in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 40, p.155-161, 1993.
- SCANDALIOS, J.G., Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. **Biochemical Genetics**, v.3, p. 37-39, 1969.
- SCANDALIOS, J.G., Genes, isozymes, and evolution. In: MARKET, C.L. **Isozymes: genetic and evolution**. New York: Academic Press, 1975. v.4, p.1-7.
- SCHEFFER, M.C. Estudo de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR. **Informa**, v.10, p.29-31, 1991.

- SCHEFFER, M.C. Influência da adubação orgânica sobre a biomassa, o rendimento e a composição do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. – mil-folhas. In.: **Plantas Medicinais, aromáticas e condimentares – Avanços na pesquisa agronômica**. MING, L.C.(Coord.), SCHEFFER, M.C., CORRÊA JUNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A., Botucatu – Unesp, 1998. v.I, p.1-22.
- SCHEINER, S.M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p.35-68, 1993.
- SCHLICHTING, C.D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review Ecology and Systematics**, v.17, p.667, 1986.
- SCHLICHTING, C.D., LEVIN, D.A. Phenotypic plasticity of annual *Phlox*: tests if some hypotheses. **American Journal Botany**, v.71, p.252-260, 1984.
- SCHUELTER, A.R., **Análise isozimática, dialélica e diversidade genética da pimenta silvestre (*Capsicum flexuosum* Sendt.)**. Viçosa, MG: UFV, 1996. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SCHUMACHER, H.M. Biotechnology in the production and conservation of medicinal plant. In: AKERELE, O., HEYWOOD, V., SYNGE, H. **Conservation of medicinal plants**. New York: Cambridge University Press, 1991. p.179-198.
- SEVESTRE-RIGOUZZO, M., NEF-CAMPA, C., GHESQUIÈRE, A., CHRESTIN, H. Genetic diversity and alkaloid production in *Catharanthus roseus*, *C. trichophyllus* and their hybrids. **Euphytica**, v.66, p. 151-159, 1993.
- SHANNON, L.M. Plant isoenzymes. **Annals Revist Plant Physiology**, v.19, p.187-210, 1968.
- SHAW, C.R. Electrophoretic variations in enzymes. **Science**, v. 149, p. 936-943, 1965.
- SHAW, C.R., PRASSAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochem. Genetic**. v. 4, p. 297-320. 1970.

- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento** 2ª edição – Porto Alegre –Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000. 821p.
- SMITH, R.L. The use isoenzyme “fingerprints” to identify *Digitaria* varieties. **Soil Crop Science** Florida, v.32, p.6-9, 1972.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the proteins of normal human adults. **Biochemistry Journal**, v.6, p.629-641, 1995.
- SOLTIS, D.E., HAUFLER, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v.73, n.1, p.9-27, 1983
- SOUZA BRITO, A. R. M., SOUZA BRITO, A A. Forty years the Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p.53-67, 1993.
- SOUZA, J.C. **Variabilidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) –Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- SOUZA, J.C., **Diversidade genética entre acessos de acerola (*Malpighia* sp.) com base em dados isozimáticos e agronômicos**. Viçosa, MG: UFV,1996. 67p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- STAUB, J.E, KUPPER, R.S., SCHUMAN, D, WEHNER, T.C., MAY, B. Electrophoretic variation and enzyme storage stability in cucumber. **Journal of the American Society for the Horticultural Science**, New York, v.110, n.3, p.426-431, 1985.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City, California: The Benjamin cummings, 1991. 559 p.
- TATEO, F., MARIOTTI, M., BONONI, M., LUBIAN, E., MARTELLO, S., CORNARA, L. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. **Italian Journal Food of Science**, v.10, n.3, 1998.

- TORGGLER, M. G. F. **Isoenzimas – Variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética (Série monografias). 1995. 186p.
- TREASE, G.E., EVANS, W.C, **Pharmacognosy**, London: Bailière Tindal, 1989. 450 p.
- TRENTINI, A.M.M. **Registro, controle de qualidade e comércio de fitoterápicos**. In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 3, Ouro Preto, 1997. **Resumos...** Ouro Preto: UFOP, 1997. p.23-25.
- TRIVEDI, R.N., RAJESH, K. Cytomorphological Studies in Natural Populations of *Eclipta alba* (L) Hassk. **Cytologia**, v.49, p.731-738, 1984.
- UTUMI, M.M., MONNERAT, P.H., PEREIRA, P.R.G., FONTES, P.C.R. e GODINHO, V.P.C. Deficiência de macronutrientes em estêvia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.6, p.1039-1043, 1999.
- VALOIS, A. C. C. **Conservação “in situ” e “ex situ” de germoplasma vegetal**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1996, Campinas. **Resumos...**Campinas, 1996. p. 5-6.
- VALOIS, A.C.C, SALOMÃO, A.N., ALLEM, A.C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1996. 62 p.
- VEIT, M., CZYGAN, F.-C., GEIGER, H., MARKHAM, K.R. Evidence for the existence of two discrete chemotypes of *Equisetum arvense* Planta Médica, n.55, p.214, 1989.
- VIANA, A.M., 1981. **Análise de crescimento e do teor de esteviosídeo em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni em fotoperíodos de 16 e 8 horas**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, 1, 1981, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL, 1981.
- WAGNER, H. Search for plant-derived natural products with immunostimulatory activity (recent advances). **Pure Appl. Chem.**, v.62, p.1217-1222, 1993.

- WALLAART, T. E., PRAS, N., BEEKMAN, A.C., QUAX, W. J. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. **Planta Medica**, v.66, p.57-62, 2000.
- WEEDEN, N.F., GOTTLIEB, L.D., Distinguishing allozymes and isozymes of phosphoglucose isomerases by electrophoretic comparisons of pollen and somatic tissues. **Biochemical Genetics**, v.17, p.287-296, 1979.
- WEEDEN, N.F., ROBINSON, R.W. Allozyme segregation ratios in the interspecific cross *Cucurbita maxima* X *Cucurbita ecuadorensis* suggest that hybrid breakdown is not caused by minor alteration in chromosome structure. **Genetics**, v. 114, p. 593-609, 1986.
- WELSH, J. R. **Fundamentals of plant genetics and breeding**. New York: John Wiley and Sons, 1981. 290p.
- WENDEL, J. F., WEEDEN, N. F., Visualization and interpretation of plant isozymes. In. SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. (eds.). **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p.5-45.
- SAGAR, B.P., ZAFER, R. Hepatoprotective and cardiac inhibitory activities of ethanolic extracts from plant leaves and leaf callus of *Eclipta alba*. *Pharmaceutical Biology*, v.38, n.5, p.357-361, 2000.
- ZHANG, M., CHEN, Y., Chemical constituents of *Eclipta alba* (L.) Hassk. **China J. Chinese Materia Medica**, v.21, p.480-481, 1993.

APÊNDICE

Quadro 1 – Composição da solução extratora para extração de enzimas de *Eclipta alba*

Fosfato de sódio bibásico (0,034 M)	0,60 g
Sacarose (0,2 M)	7,00 g
PVP-40 (10 %)	10,00 g
DTT (3 mM)	50,00 mg
L-Ácido ascórbico (5,7 mM)	100,00 mg
DIECA (5,8 mM)	100,00 mg
Bissulfito de sódio (2,6 mM)	50,00 mg
Borato de se sódio (2,5 mM)	50,00 mg
2-Mercaptoetanol (0,2%)	0,20 mL
Polietilenoglicol-6.000 (1%)	1,00 g
Água deionizada (ou destilada) q.s.p.)	100,00 mL

Fonte: ALFENAS *et al.* (1991), modificado.

Quadro 2 - Protocolo para detecção da atividade da enzima Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT – EC 2.6.1.1)

Ácido L-aspártico	100,00 mg
Ácido -cetoglutarico	100,00 mg
Tris-HCl (0,1 M), pH 8,0 (q.s.p.)	
Ajustar o pH para 8,0 adicionando NaOH (1,0 M) e em seguida adicionar:	
Pyridoxal-5'-fosfato	2,50 mg
“Fast Blue BB Salt”	50,00 mg

Fonte: SOLTIS *et al.* (1983), modificado

Incubar no escuro à temperatura de 37 C até o aparecimento das banda

Quadro 3 – Protocolo para a detecção da atividade da enzima Esterase (EST-ES 3.1.1.1)

-naftil acetato	20,00 mg
-naf acetato	20,00 mg
Ambos dissolvidos individualmente em:	
Acetona	1,00 mL
Tampão fosfato 1,0 M, pH 6,0	5,00 mL
Água destilada	45,00 mL
“Fast Blue RR Salt”	50,00 mL

Fonte: SOLTIS *et al.* (1983), modificado.

Incubar no escuro à temperatura de 37 C até o aparecimento das bandas

Quadro 4 - Protocolo para detecção da atividade da enzima Malato Desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37)

NAD ⁺	100,00 mg
MTT	15,00 mg
PMS	1,00 mg
Na-L-malato (0,1 M), pH 7,0	5,00 mL
NaCl (0,1 M)	2,50 mL
Tampão tris-HCl (0,5), pH 7,1	7,5 mL
Água destilada	35,00 mL

SHAW e PRASAD (1970) modificado.

Incubar no escuro à temperatura de 37 C até o aparecimento das bandas.

Quando 5 – Protocolo para a detecção da atividade da enzima Isocitrato desidrogenase (IDH – 1.1.1.42)

DL-Ácido isocítrico, Na ₃	200,00 mg
NADP ⁺ , Na ₂	2,00 mL (20,00 mg)
MTT ou NTB	2,00 mL (20,00 mg)
PMS	2,00 mL (20,00 mg)
MgCl ₂ (1,00%)	2,00 mL (20,00 mg)
Tris-HCl (0,1 M), pH 8,0 (q.s.p.)	100,00 mL

SHAW e PRASAD (1970), modificado.

Incubar no escuro à temperatura de 37 C até o aparecimento das bandas.

Quadro 6 – Protocolo para detecção da atividade da enzima Fosfoglucomutase (PGM – 5.4.2.2)

Tris-HCl (0,1M), pH 8,5	50,00 mL
MgCl ₂	100,00 mg
EDTA	50,00 mg
-D-Glucose-1-Fosfato	250,00 mg
Glucose-6-Fosfato Desidrogenase	40 unidades
NADP ⁺	10,00 MG
NTB	10,00 mg
PMS	1,00 mg

Fonte: SOLTIS *et al.* (1983), modificado.

Incubar no refrigerador a 4 C até o aparecimento das bandas.

Quadro 7 – Protocolo para a detecção da atividade da enzima Fosfoglucoase Isomerase (PGI – 5.3.1.9)

Tris-HCl (0,1 M), pH 8,0	10,00 mL
H ₂ O	90,00 mL
MgCl ₂ (10M)	1,00 mg
Frutose-6-Fosfato	30,00 mg
Glucose-6-Fosfato Desidrogenase	40 unidades
NADP	10,00 mg
MTT	20,00 mg
PMS	2,00 mg

SOLTIS *et al.* (1983), modificado.

Incubar no refrigerador a 4 C até o aparecimento das bandas.

Quadro 8 - Protocolo para a detecção da atividade da enzima Peroxidase (POD- 1.11.1.7)

3-amino-9-etil-carbazole dissolvidos em:	50,00 ml
Dimetilformamida (DMF)	2,50 mL
Tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0	95,00 mL
CaCl ₂ 0,1 M	2,00 mL
H ₂ O ₂ em 3%	2,00 mL

SOLTIS *et al.* (1983), modificado.

Incubar no refrigerador a 4 C, até o aparecimento de bandas.

Quadro 9 - Protocolo para a detecção da atividade da enzima Leucina Aminopeptidase (LAP- EC 3.4.11.1.)

“Fast Black K salt”	75,00 mg
Água destilada	40,00 mL
Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,00	10,00 mL
L-Leucina-b-naftilamida	0,75 mL

SOLTIS *et al.* (1983).

Incube o gel no escuro a 30 C, até o aparecimento das banda. Descarte a solução e fixe o gel em solução aquosa de glicerol a 10%.

Quadro 10 – Protocolo para a detecção da atividade da enzima Fosfatase Ácida (ACP-EC 3.1.3.2.)

-naftil fosfato ácido de sódio	80,00 mg
“Fast garnet GCB salt”	100,00 mg
MgCl ₂ (1,0 M) – 0,5 ml	10,00 mg
Tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0	100 mL

SOLTIS *et al.* (1983)

Incube o gel a 30-37 C, até as bandas aparecerem. Melhor fazer a avaliação no dia seguinte.

Descarte a solução e fixe o gel em glicerol a 10%.

Quadro 11 - Protocolo para a detecção da enzima Glutamato desidrogenase (GDH-EC 1.4.1.3)

NAD ⁺	20,00 mg
MTT	10,00 mg
PMS	2,00 mg
Tampão tris HCl 1,0 M, pH 8,0	10,00 mL
Ácido L-glutâmico 1,0 M, pH 8,0	20,00 mL
Água destilada	70,00 mL

SOLTIS *et al.* (1983), modificado.

Incube o gel no escuro a 30-37 C, até as bandas aparecerem (30 minutos a 2 horas). Descarte a solução e fixe o gel em solução aquosa de glicerol a 10 %.

Quadro 12 – Protocolo para a detecção da enzima Álcool desidrogenase (ADH – EC 1.1.1.1)

Etanol (95 % v/v)	20 mL
NAD ⁺	20,00 mL
MTT	10,00 mg
PMS	2,00 mg
Tris-HCl (0,2 M, pH 8,0) (q.s.p.)	100,00 ml

ALFENAS (1991)

Incube o gel no escuro a 30-70 C, durante 15 a 60 minutos. Descarte a solução e fixe o gel em solução aquosa de glicerol a 10 %.

Quadro 13 – Protocolo para a detecção da enzima Chiquimato desidrogenase (SKDH – EC1.1.1.25)

Ácido chiquímico	100,00 mg
NADP ⁺ , Na ₂	2,00 mL (20,00 mg)
MTT ou NBT	2,00 mL (20,00 mg)
PMS	2,00 mL) (2,00 mg)
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 (q.s.p.)	100,00 mL

Quadro 14 – Resumo da análise de regressão linear para altura da planta, no intervalo de 14-51 dias após o transplante (coletas semanais), para cada acessos

Fonte Variação	Acessos							
	CEN		JAN		CV		SAC	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Regressão simples	1	17.769,482554**	1	13.432,384957**	1	13.642,697711**	1	7.732,145790**
Resíduo regressão	28	41,285136	28	47,795775	28	37,581034	22	45,582388
Falta ajuste	4	77,096028 ^{NS}	4	55,770427 ^{NS}	4	28,867239 ^{NS}	4	34,015636 ^{NS}
Resíduo puro	24	35,316667	24	46,466667	27	39,033333	18	48,152778

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade; NS F não significativo

Continuação

Fonte Variação	Acessos							
	AFR		HEN		CEM		SIL	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Regressão simples	1	20.933,522448**	1	9.238,873628**	1	10.758,234787**	1	13.687,896496**
Resíduo regressão	28	38,980151	22	37,679987	22	71,049934	28	55,342982
Falta ajuste	4	45,361055 ^{NS}	4	18,73992632 ^{NS}	4	53,274636 ^{NS}	4	40,600876 ^{NS}
Resíduo puro	24	37,916667	24	41,888889	27	75,000000	18	57,800000

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade; NS F não significativo