

DANIEL MELO DE CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO ISOZIMÁTICA, DA ANATOMIA FOLIAR,
DO ÓLEO ESSENCIAL E GERMINAÇÃO
DE *Leonurus sibiricus* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitotecnia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
1998

DANIEL MELO DE CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO ISOZIMÁTICA, DA ANATOMIA FOLIAR,
DO ÓLEO ESSENCIAL E GERMINAÇÃO
DE *Leonurus sibiricus* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitotecnia, para Obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 25 de julho de 1997.

Prof. Luiz Cláudio de A. Barbosa
(Conselheiro)

Prof. Eldo Antonio Monteiro da Silva

Prof. Tocio Sedyama

Prof^a Denise Cunha F. S. Dias

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Orientador)

*Ao Criador Supremo.
À Criação.*

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao professor Vicente Wagner Dias Casali, pela amizade, pelo respeito e pela orientação em todos os momentos.

Aos professores Eldo Antonio Monteiro da Silva, Eveline Mantovani Alvarenga e Luís Cláudio de Almeida Barbosa, pela amizade e pelo aconselhamento.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pelo aconselhamento estatístico.

Ao professor Kiyoshi Matsuoka, pelo auxílio na microscopia eletrônica.

Ao professor Newton Moreno Sanches, pelo auxílio nas fotos escaneadas.

Ao chefe da Horta Velha, Feliciano Agripino de Miranda, e à sua equipe, pela manutenção das plantas no campo.

Ao técnico de laboratório Francisco Ribeiro, pelo auxílio nas análises isozimáticas.

Aos amigos Adilson, Almir, Fernando, Jeferson, Malu e Vanderlúcia, pelo companheirismo e pela assistência nas extrações e análises do óleo essencial.

Às amigas Alba, Deusângela, Rosane e Zilda, pelo apoio e auxílio nas análises anatômicas.

À minha família, pelo apoio, pelo estímulo e pela compreensão.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DANIEL MELO DE CASTRO, filho de Lázaro Gomes de Castro e de Lucíula Melo de Castro, nasceu em 5 de fevereiro de 1966, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo.

No período de janeiro de 1988 a fevereiro de 1989, trabalhou como auxiliar técnico de nível médio, na Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em Campinas, São Paulo.

Em maio de 1989, foi membro-fundador do Grupo Entre-Folhas - Plantas Mediciniais, em Viçosa, Minas Gerais.

É co-autor do livro “Plantas Mediciniais”, lançado pela Editora Universitária, da Universidade Federal de Viçosa, em dezembro de 1994.

Em fevereiro de 1995, graduou-se Engenheiro-Agrônomo, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia na mesma Universidade.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	3
CARACTERIZAÇÃO DE DOIS FENÓTIPOS DE <i>Leonurus sibiricus</i> L. QUANTO A PADRÕES ISOZIMÁTICOS E ANATOMIA FOLIAR	3
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. <i>Leonurus sibiricus</i> L.	5
2.2. Isozimas e eletroforese	6
2.3. Anatomia foliar	7
2.3.1. Epiderme e tricomas	7
2.3.2. Mesofilo	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11

	Página
3.1. Análises isozimáticas	11
3.1.1. Obtenção das plantas	11
3.1.2. Coleta e preparação das amostras	12
3.1.3. Preparação dos géis e eletroforese	13
3.1.4. Coloração, fixação e secagem dos géis	14
3.2. Anatomia foliar	15
3.2.1. Coleta das amostras	15
3.2.2. Microscopia de luz	15
3.2.2.1. Preparação dos blocos	15
3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura	16
3.2.4. Diafanização	17
3.2.4.1. Determinação da frequência de tricomas	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Análises isozimáticas	19
4.2. Anatomia foliar	21
4.2.1. Estrutura da lâmina foliar	21
4.2.2. Análise da epiderme - vista paradérmica	26
5. CONCLUSÕES	36
CAPÍTULO 2	37
ANÁLISE DO RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE DOIS FENÓTIPOS DE <i>Leonurus sibiricus</i> L.	37
1. INTRODUÇÃO	37
2. REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1. Óleos essenciais	39
2.2. Grupos de compostos constituintes dos óleos essenciais	40
2.3. Importância dos óleos essenciais	43
2.4. Extração de óleos essenciais	45
2.5. Análise qualitativa dos óleos essenciais	45

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Produção das plantas para as extrações	47
3.2. Coleta e preparo das amostras	49
3.3. Extração do óleo essencial	50
3.4. Análise do rendimento	50
3.5. Análises qualitativas	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Rendimento do óleo essencial	54
4.2. Análise qualitativa	57
5. CONCLUSÕES	67
CAPÍTULO 3	68
EFEITO DE LUZ, TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MACAÉ (<i>Leonurus sibiricus</i> L.)	
1. INTRODUÇÃO	68
2. REVISÃO DE LITERATURA	69
2.1. Germinação	69
2.1.1. Efeito da temperatura	69
2.2. Dormência	70
2.2.1. Efeito da luz	71
2.2.2. Armazenamento	72
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Obtenção das sementes	74
3.2. Realização dos testes	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5. CONCLUSÕES	85
2. RESUMO E CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

EXTRATO

CASTRO, Daniel Melo de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 1998. **Caracterização isozimática, da anatomia foliar, do óleo essencial e germinação de *Leonurus sibiricus* L.** Professor Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Professores Conselheiros: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Eveline Mantovani Alvarenga.

Visando caracterizar dois fenótipos de *Leonurus sibiricus* L. (flores brancas e flores roxas), provenientes do campus da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, foram estudados os padrões isozimáticos, a anatomia da epiderme e do mesofilo foliares, a produção de óleo essencial e a germinação das sementes. As plantas dos fenótipos estudados apresentaram polimorfismo para o sistema isozimático peroxidase. O estudo da epiderme foliar revelou haver diferenças na frequência de tricomas glandulares e não-glandulares entre os dois fenótipos. Foram verificadas diferenças quanto à porcentagem total e à velocidade de germinação, que foram superiores para as sementes do fenótipo roxo. As sementes dos dois fenótipos apresentaram dormência primária, caracterizada pela exigência de sementes recém-colhidas por luz e temperatura, alternada de 20-30°C, para germinarem. Não foram observadas diferenças qualitativas ou quantitativas entre o óleo essencial extraído dos dois fenótipos, havendo, porém, distinção no rendimento de óleo essencial de acordo com a

época de coleta e o órgão da planta utilizado, notando-se que em plena floração o conteúdo de óleo essencial presente nas folhas e inflorescências aumenta e o dos caules diminui, quando comparado com o início da floração. De modo geral, as folhas+inflorescências produzem mais óleo essencial que os caules. O óleo essencial mostrou ser quimicamente composto de uma mistura complexa de sesqui e diterpenos, de acordo com os tempos de retenção e as massas moleculares dos compostos analisados.

ABSTRACT

CASTRO, Daniel Melo de, M.S. Federal University of Viçosa, February 1998.
Isozymatic characterization, leaf anatomy, essential oil and seed germination of *Leonurus sibiricus* L. Adviser: Vicente Wagner Dias Casali.
Committee Members: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Eveline Mantovani Alvarenga.

In order to characterize two phenotypes of *Leonurus sibiricus* L. (white and purple flowers) from Federal University of Viçosa *campus*, in Viçosa, MG, it was studied isozymatic patterns, anatomy of epidermis and leaf mesophyl, essential oil production and seed germination. The phenotype of the studied plants showed polymorphism for isozymatic system peroxidase. Leaf epidermis observations showed differences in glandular and non-glandular trichome frequency between white and purple phenotypes. It was observed difference related to total percentage and seed germination velocity, that were higher for purple phenotype than for white one. Seeds from the two phenotypes showed primary dormancy, characterized for the necessity of fresh harvested seeds for light and alternate temperature of 20-30°C to promote germination. It was not observed qualitative or quantitative differences of the extracted oil from each phenotype, observing therefore, differences between the production of the essential oil according to harvest period and the plant organ used. At full

flowering, essential oil content in the leaves and inflorescences increase, and that of stems decrease when compared at flowering initiation. Generally observing, leaves+inflorescences yielded more oil than stems. Oil composition is chemically made of a complex mixture of sesqui and diterpenes, according to retention time and molecular mass of analyzed components.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas pelo ser humano para aliviar e curar seus males é feita, provavelmente, desde a pré-história (ATAL e KAPUR, 1982). Os mais antigos povos da história deixaram registrado o uso de plantas como medicamentos em hieróglifos escritos em tábuas de cerâmica e papiros, como os egípcios (BISSET et al., 1994).

Estima-se que existam cerca de 200.000 espécies de vegetais no Brasil, das quais pelo menos metade possuiria alguma propriedade medicinal. No entanto, talvez menos de 1% dessas plantas com potencial medicinal, ou seja, menos de 1.000, recebeu estudos adequados (MARTINS et al., 1994).

Diante da tradição milenar de uso, o que comprova a eficiência do método, e da quantidade de espécies que podem constituir valiosos recursos no combate e, principalmente, na prevenção das doenças que afligem a espécie humana, torna-se cada vez mais urgente o estudo sistemático das plantas medicinais. Isto porque no futuro, talvez mais próximo do que se imagina, a utilização das plantas e dos preparados à base destas pode ser a solução para graves problemas que hoje acometem o sistema de saúde pública em todo o mundo, como a iatrogênese e a resistência adquirida pelos patógenos aos princípios ativos sintéticos concentrados.

A espécie *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae), conhecida vulgarmente no Brasil como macaé, mané-magro, rubim, erva-das-lavadeiras, erva-macaé e outros nomes, de acordo com a região, é amplamente utilizada pela população, especialmente no meio rural, na forma de infuso da parte aérea para aliviar problemas digestivos e intestinais e de xaropes das inflorescências para combater tosses persistentes, dentre outras formas (MARTINS et al., 1994). OGA et al. (1986) comprovaram o efeito neuro-depressor do extrato mole obtido da parte aérea da planta sobre o sistema nervoso central de ratos.

O presente trabalho visou obter mais informações sobre *L. sibiricus* e também caracterizar dois fenótipos (um de flores brancas e o outro de flores arroxeadas) encontrados no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, em relação à sua germinação, ao conteúdo e à composição de óleo essencial e dos caracteres anatômicos e isozimáticos.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS FENÓTIPOS DE *Leonurus sibiricus* L. QUANTO A PADRÕES ISOZIMÁTICOS E ANATOMIA FOLIAR

1. INTRODUÇÃO

A investigação das espécies vegetais tidas como medicinais e, ou, aromáticas tem se mostrado crescente nos últimos anos, em virtude da maior preocupação com os aspectos relacionados à qualidade de vida e saúde.

A espécie *Leonurus sibiricus* L., conhecida como macaé, possui ampla utilização na medicina popular, com resultados comprovados pelo seu uso secular e, mais recentemente, pela medicina oficial (OGA et al., 1986; NAGASAWA et al., 1990), mas, apesar disso, as informações disponíveis sobre a planta são escassas.

Observou-se no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, a existência de dois fenótipos da espécie numa mesma população, que diferem na cor das flores, um apresentando flores roxas, de disseminação abundante, e o outro flores brancas, de ocorrência bastante restrita.

Realizou-se este trabalho com o intuito de obter maiores informações sobre a espécie *Leonurus sibiricus* L. e identificar possíveis diferenças entre os

dois fenótipos, de ordem genética, pela utilização de técnicas isozimáticas, e anatômica, pela análise da anatomia foliar, especialmente da epiderme.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Leonurus sibiricus* L.

É uma espécie pertencente à subclasse Dicotyledoneae, família botânica Lamiaceae, que inclui muitos gêneros que possuem espécies aromáticas e medicinais, como o gênero *Mentha*, que compreende as espécies conhecidas popularmente como hortelãs, muito utilizadas na medicina popular e oficial e na indústria, ou o gênero *Ocimum* com as alfavacas e manjericões, de utilização medicinal e culinária (HAY e SVOBODA, 1993; MARTINS et al., 1994).

O gênero *Leonurus* possui algumas espécies que contêm substâncias com atividade medicinal (fármacos). Entre elas, podem-se citar *L. cardiaca* (SCHAUENBERG e PARIS, 1977; TSCHESCHE et al., 1980; MALAKOV et al., 1985) e *L. heterophyllus* (HON et al., 1991, 1993), que são pouco comuns no Brasil (MOREIRA FILHO, 1956).

A espécie *L. sibiricus* é uma planta de porte herbáceo, crescimento ereto, caule quadrangular levemente pubescente, folhas completas, opostas cruzadas, apresentando heterofilia, com os bordos do limbo variando de palmatilobados, nas folhas basais, palmatipartidos, nas folhas mais próximas ao ápice dos ramos, a lanceoladas quando presentes nas inflorescências. As inflorescências são indefinidas, terminais, compostas, do tipo espiga de glomérulos, com flores

sésseis, hermafroditas, pentâmeras e com quatro estames (oligostêmones), que podem ser arroxeadas ou brancas. Os frutos são secos, deiscentes, do tipo cápsula, produzindo sementes angulares, de aproximadamente 1 mm de comprimento (MOREIRA FILHO, 1956).

As principais classes de compostos químicos já descritos para a espécie são os alcalóides (SUGIURA et al., 1969; LUO, 1985) e os isoprenóides, especialmente os diterpenos (SAVONA et al., 1982).

2.2. Isozimas e eletroforese

O termo isozima refere-se a formas moleculares diferentes da mesma enzima de um determinado organismo e que têm afinidade pelos mesmos substratos, de acordo com MARKERT e MOLLER (1959). Têm uma grande importância como fonte de marcadores genéticos, pelo fato de permitirem a caracterização da variabilidade num nível próximo ao do DNA, pois são produtos diretos da atuação gênica, respondendo pouco à influência do meio celular em que estão (ALFENAS et al., 1991).

O controle das isozimas em nível genético é realizado por um ou vários genes, situados no mesmo locus ou em locus diferentes (SCANDALIOS, 1969).

As variações existentes entre padrões isozimáticos de uma mesma população são normalmente atribuídas à segregação genética e denominada polimorfismo (ALFENAS et al., 1991).

A utilização de padrões isozimáticos tem sido ferramenta importante para a caracterização e, ou, identificação da variabilidade genética de diferentes organismos, conforme trabalhos realizados por AMARAL JÚNIOR (1994), em acessos de *Cucurbita maxima* Duchesne; MARTINS (1996), em acessos de *Ocimum selloi* Benth.; e LOPES (1997), na caracterização de acessos de *Polygonum punctatum* Ell.

A eletroforese pode ser definida como a difusão forçada de moléculas através de um campo elétrico (PIERCE e BREWBAKER, 1973). O princípio de utilização desta técnica para separação das isozimas baseia-se no efeito de

peneiramento molecular, dependente da massa das moléculas e da estrutura terciária das proteínas, como também baseia-se nas diferenças de cargas eletrostáticas que podem variar num mesmo pH, de acordo com o número relativo de aminoácidos com cargas positivas e negativas (ALFENAS et al., 1991). Uma vez separadas, as isozimas contidas no meio-suporte de gel de amido são reveladas com reações de coloração específicas para cada sistema isozimático, obtendo-se o zimograma (PIERCE e BREWBAKER, 1973; ALFENAS et al., 1991).

As informações obtidas pela utilização dos sistemas isozimáticos como marcadores genéticos têm sido úteis na criação de métodos mais eficientes em programas de melhoramento e na orientação do manejo e conservação de recursos genéticos (PIERCE e BREWBAKER, 1973).

2.3. Anatomia foliar

2.3.1. Epiderme e tricomas

A epiderme é a camada ou as camadas de células mais externas de todas as partes da planta, durante todo o crescimento primário (CUTTER, 1986). Os tricomas são apêndices epidérmicos com função geralmente ecológica, isto é, de adaptação da planta ao meio, como defesa contra herbívoros e patógenos (LEVIN, 1973; WERKER e FAHN, 1981), atração de insetos úteis, como os polinizadores, e repulsão dos nocivos (GOODWIN e MERCER, 1972) e redução da perda de água pela transpiração e temperatura foliar, aumentando a reflexão da luz pela superfície das folhas (WERKER e FAHN, 1981).

Os tricomas podem ser glandulares, possuindo células especializadas para a produção e secreção de substâncias químicas, e não-glandulares, os pêlos tectores (METCALFE e CHALK, 1950; LEVIN, 1973; CUTTER, 1986; ASCENSÃO et al., 1995). Os tricomas glandulares (ou glândulas) são apêndices epidérmicos que normalmente ocorrem na parte aérea das plantas, nos diversos órgãos reprodutivos e vegetativos, produzindo, em muitas espécies, substâncias

lipofílicas (FAHN, 1988; HAY e SVOBODA, 1993).

Os óleos essenciais, a principal classe de princípios ativos presente nas espécies da família Lamiaceae e que lhes confere grande importância econômica, são normalmente produzidos em tricomas glandulares (HAY e SVOBODA, 1993; ASCENSÃO et al., 1995). Em *Pogostemon cablin* (patchouli), o acúmulo dos óleos essenciais ocorre ao mesmo tempo em tricomas glandulares externos e glândulas internas, devendo-se ressaltar que estas ocorrem inclusive nas raízes (UPHOF, 1962; HENDERSON et al., 1970). O número de glândulas internas em *P. cablin* foi três vezes maior que o de tricomas glandulares externos, e a concentração de sesquiterpenóides no óleo essencial presente nestas glândulas foi aproximadamente três vezes menor que nos tricomas (HENDERSON et al., 1970).

Segundo FAHN (1988), os tricomas glandulares são as estruturas secretoras mais recentes, sob o ponto de vista evolutivo. GOODWIN e MERCER (1972) relataram que a imensa diversidade biossintética presente nas plantas, em relação aos óleos essenciais, talvez seja um excelente exemplo da evolução em progresso.

Outras classes de compostos podem ser produzidas pelos tricomas glandulares, como os flavonóides e quinonas, que, a exemplo dos óleos essenciais, são produtos do metabolismo secundário (LÜTGE e SCHNEPF, 1976). WIDÉN e BRITTON (1969) descreveram glândulas internas que se desenvolvem nos espaços intercelulares (idioblastos) de rizomas de *Dryopteris dilatata*, planta que ocorre no leste dos Estados Unidos, e que produzem compostos derivados de floroglucinol.

Na família botânica das Lamiaceae, ocorrem diversos tipos de tricomas glandulares e não-glandulares (METCALFE e CHALK, 1950), devendo-se ressaltar que entre os glandulares observa-se a predominância de dois deles: os peltados, que são compostos de uma célula basal, uma curta haste celular (pedúnculo) e um ápice formado por várias células secretoras arranjadas numa única camada, e os tricomas capitados, que possuem uma célula basal, uma haste

celular geralmente mais alongada, composta de uma ou mais células, e um ápice constituído por uma, duas ou quatro células secretoras (FAHN, 1988; ASCENSÃO et al., 1995). A presença de tricomas glandulares e pêlos em ambas as faces das folhas de *Leonurus sibiricus* L. foi relatada por MOREIRA FILHO (1956).

Os tricomas peltados e capitados, em *Leonotis leonurus*, são originados de uma única célula protodérmica, maior que as circundantes, na qual ocorrem divisões periclinais no início e anticlinais na fase final do processo (ASCENSÃO et al., 1995). Em *Salvia officinalis*, CROTEAU et al. (1981) relataram a formação de novos tricomas glandulares até o início da expansão das folhas, que coincide com o final da fase meristemática.

Os tricomas glandulares são estruturas estreitamente ligadas às células do mesofilo, ricas em amido, e a existência de muitas mitocôndrias nas células secretoras indica que a formação dos óleos essenciais é um processo que requer muita energia. A presença de corpúsculos osmiofílicos no citoplasma é uma evidência de que é nesse compartimento celular que ocorre a síntese desses óleos. As organelas presentes nas glândulas são normalmente as mesmas encontradas nas células vizinhas, mas uma vez iniciada a produção de óleo essencial, parece haver um aumento do aparelho de Golgi e do retículo endoplasmático, e os vacúolos ficam mais osmiofílicos (BOSABALIDIS e TSEKOS, 1982; HAY e SVOBODA, 1993). WERKER e FAHN (1981) constataram que praticamente todas as organelas citoplasmáticas das células secretoras estão envolvidas na produção das substâncias excretadas.

Nos tricomas peltados o acúmulo de óleo essencial é feito entre a parede externa e a cutícula da célula secretora, enquanto nos capitados ocorre no lúmen da célula e, ou, em pequena cavidade entre a cutícula e a parede celular (Werker et al., citado por MARTINS, 1996). Em *Leonurus cardiaca* foram encontrados tricomas capitados formados por duas, três, quatro e até mais de quatro células apicais (ABU-ASAB e CANTINO, 1987). Em relação à composição do óleo essencial presente no interior de tipos de glândulas diferentes, VENKATACHALAM et al. (1984) observaram que não houve variação entre a

composição do óleo essencial extraído de glândulas sésseis com oito células no ápice e a do óleo extraído de glândulas com apenas uma célula apical.

A densidade glandular pode ser utilizada como informação auxiliar na distinção entre plantas da mesma espécie, mas com características genéticas variáveis, como quimiótipos e variedades genéticas (TURNER et al., 1980; MARTINS, 1996). CROTEAU et al. (1981), ao estudarem *Salvia officinallis*, encontraram uma alta correlação entre a densidade glandular, a acumulação de óleo essencial e o seu teor de cânfora.

Para determinação da densidade (ou da frequência) glandular, é necessário que se utilize a técnica da diafanização, na qual se realiza a clarificação dos segmentos foliares, visando eliminar as substâncias que dificultam a visualização da superfície foliar ao microscópio (O'BRIEN e McCULLY, 1981). Por causa da grande variação no número de tricomas por unidade de área, de acordo com o órgão da planta e a posição deste (DUDAI et al., 1988; HAY e SVOBODA, 1993) e ainda com o seu estágio de desenvolvimento (COLSON et al., 1993), deve-se padronizar o local de retirada das amostras, visando a contagem de estruturas.

2.3.2. Mesofilo

Segundo MOREIRA FILHO (1956), a espécie *Leonurus sibiricus* possui folha dorsiventral, com parênquima paliçádico abaixo da epiderme adaxial, formado por uma camada de células alongadas no sentido radial, ocupando metade do mesofilo, e a outra metade ocupada pelo parênquima lacunoso, acima da epiderme abaxial, com três a quatro camadas de células, de formatos e tamanhos variados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises isozimáticas

3.1.1. Obtenção das plantas

As sementes de plantas dos dois fenótipos (flores brancas e roxas) foram semeadas em copos plásticos descartáveis de 300 mL, contendo substrato composto de solo, esterco bovino fermentado e areia, na proporção de 3:2:2, que foram mantidos sob telado de sombrite 50% e polietileno transparente. Utilizaram-se 15 recipientes para cada fenótipo.

Foram feitos ajustes das metodologias normalmente empregadas para selecionar os sistemas de melhor resolução das bandas, bem como as melhores combinações de pH das soluções-tampão dos géis e dos eletrodos.

Os sistemas isozimáticos testados foram: peroxidase (PO), xiquimato desidrogenase (SKDH), glutamato desidrogenase (GDH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), isocitrato desidrogenase (IDH) e leucina aminopeptidase (LAP).

Os testes foram feitos antes e depois do florescimento, sendo iniciados quando as plantas atingiram 50 dias de idade.

3.1.2. Coleta e preparação das amostras

Utilizaram-se, separadamente, folhas jovens, coletadas na porção apical dos ramos, e raízes jovens, obtidas nas extremidades do órgão. As coletas, realizadas com o auxílio de uma tesoura, foram feitas por volta de 8 horas. O material coletado foi, em seguida, transferido para almofariz de porcelana previamente resfriado, adicionando-se cinco gotas de solução-tampão extratora e aproximadamente 20 mg de PVPP (polivinil polipirrolidona), utilizado para aumentar a estabilidade das enzimas e remover compostos fenólicos (ALFENAS et al., 1991) e macerado, utilizando-se clava de porcelana. O extrato obtido foi filtrado em lenço de papel e absorvido em retângulos de papel cromatográfico Whatman 3M, medindo 10 x 5 mm, constituindo cada retângulo de papel numa amostra. Utilizou-se aproximadamente 0,4 g de tecido vegetal para preparação de cada amostra.

A composição da solução-tampão extratora, de acordo com ALFENAS et al. (1991), foi:

- fosfato de sódio bibásico (0,034 M)	0,60 g
- sacarose (0,2 M)	7,00 g
- PVP-40 (polivinil pirrolidona) (2,56%)	2,56 g
- DTT (ditiotretitol) (3mM)	0,05 g
- L-ácido ascórbico (5,7 mM)	0,10 g
- DIECA (ácido dietilditiocarbâmico) (5,8 mM)	0,10 g
- bissulfito de sódio (2,6 mM)	0,05 g
- borato de sódio (Borax) (2,5 mM)	0,05 g
- 2-mercaptoetanol (0,2 %)	0,20 mL
- polietilenoglicol-6000 (1%)	1,00 g
- água deionizada ou destilada (q.s.p.)	100,00 mL

3.1.3. Preparação dos géis e eletroforese

Utilizaram-se géis de amido a 12 %, que foram preparados com 42 g de amido hidrolisado Sigma, em 350 mL de solução-tampão tris-ácido cítrico. Inicialmente, fez-se uma suspensão, adicionando-se 42 g de amido a 80 mL da solução-tampão do gel em frasco kitazato de 1.000 mL. Os 270 mL restantes da solução-tampão foram submetidos a fogo brando, até a fervura. Esta solução fervente foi vertida sobre a suspensão de amido, sob agitação, e submetida à cocção em fogo brando, agitando-se sempre, até a formação de um gel transparente. Utilizaram-se também géis de amido de milho (“maisena”), que foram preparados de modo semelhante, apresentando diferença apenas no tempo de cocção. A preparação dos géis foi feita sempre à tarde, visando obter um resfriamento lento, que ocorria à noite, o que permitiu a obtenção de géis uniformes.

Após a cocção, o kitazato que continha o amido geleificado foi submetido a vácuo brando, para evitar a formação de bolhas de ar que pudessem formar espaços vazios no gel. Em seguida, o conteúdo do frasco foi vertido cautelosamente em fôrma de acrílico e coberto com placa de vidro previamente aquecida a 40°C, para evitar excesso de evaporação e uniformizar a superfície, permanecendo em repouso durante toda a noite, à temperatura ambiente.

No início da manhã seguinte, os géis foram resfriados em geladeira a aproximadamente 4°C, por cerca de 1 hora, e depois cortados transversalmente, 4 cm acima de uma das extremidades, originando duas porções de tamanhos distintos. Afastou-se a porção menor, para colocação (aplicação) das amostras ao longo da face cortada da porção maior do gel, em posições equidistantes, totalizando dez amostras em cada gel. Para permitir a visualização da frente de migração durante a corrida eletroforética, aplicou-se uma tira de papel embebido em azul-de-bromofenol em cada extremidade do gel.

As soluções-tampão utilizadas na preparação do gel e dos eletrodos são descritas por SHAW e PRASAD (1970) e SOLTIS et al. (1983).

Após a aplicação das amostras, juntaram-se as partes do gel e colocaram-se panos tipo “perfex”, dobrados uma vez, dentro das cubas dos eletrodos contendo 100 mL do tampão apropriado e o gel, estabelecendo uma ponte entre estes, iniciando-se a corrida eletroforética em seguida. Nos primeiros 30 minutos realizou-se uma “pré-corrída”, com voltagem de 150 V, visando a liberação das enzimas para o gel. Após esse tempo, a fonte fornecedora de corrente elétrica foi desligada e as amostras de papel retiradas, com o auxílio de uma pinça cirúrgica, juntando-se logo após as partes do gel. Religou-se a fonte elétrica, ajustada em 250 V para o sistema PO e em 300 V para os demais, esperando-se que a frente de migração atingisse 8 cm acima da origem, quando se encerrou a corrida. A eletroforese foi conduzida em refrigerador vertical com porta de vidro, a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

3.1.4. Coloração, fixação e secagem dos géis

Após a corrida, o gel foi cortado horizontalmente, em fatias de 2 mm de espessura, utilizando-se réguas de vidro e um fio de náilon nº 20. Descartaram-se a primeira e a última fatias, por não apresentarem boa resolução das bandas após a coloração, acondicionando-se as demais em recipiente refratário tipo “pyrex”, imergindo-as em solução apropriada para revelação das bandas (SHAW e PRASAD, 1970; SOLTIS et al., 1983).

Na revelação do sistema peroxidase, o gel imerso na solução corante foi incubado a 4°C, e para revelação dos demais, a 37°C, em ausência de luz. O tempo de revelação dos géis foi o suficiente para o aparecimento nítido das bandas. Após a revelação, o corante foi descartado, os géis lavados em água corrente comum e fixados em solução de glicerina a 10%, por cerca de 12 horas à temperatura aproximada de 8°C, em refrigerador (SOLTIS et al., 1983).

A secagem dos géis foi feita mediante o uso do “Método do Bastidor”, descrito por ALFENAS et al. (1991).

Os géis foram examinados e interpretados em diafanoscópio. Os sistemas que apresentaram boa resolução foram selecionados e mediram-se as distâncias

percorridas pelas bandas e o tamanho destas com uma régua graduada em milímetros, transferindo-se esses valores para um papel milimetrado. Calcularam-se, em seguida, os valores do fator de retenção (Rf) para as bandas observadas. Efetuou-se o cálculo de Rf, dividindo-se a distância total da corrida, indicada pelo azul-de-bromofenol, pela distância percorrida pelas bandas.

3.2. Anatomia foliar

3.2.1. Coleta das amostras

Dentre as plantas que foram cultivadas para realização das extrações de óleo essencial (Capítulo 2), escolheram-se três de cada fenótipo, em pleno florescimento, para preparação do material que seria utilizado para as análises anatômicas.

Em testes preliminares, verificou-se que as estruturas anatômicas da epiderme de caules e folhas são praticamente as mesmas e optou-se por realizar as observações em folhas, que foram ainda classificadas em não-completamente expandidas, chamadas de “novas”, retiradas do 10^o nó a partir do ápice do ramo, e completamente expandidas, chamadas de “maduras”, retiradas do 17^o nó.

3.2.2. Microscopia de luz

3.2.2.1. Preparação dos blocos

Seccionaram-se as folhas na parte mediana, retirando-se retângulos de aproximadamente 4 mm de comprimento por 1 mm de largura, ao lado da nervura principal, no sentido longitudinal.

O material foi fixado em solução aquosa de glutaraldeído 2%, por 2 horas, sendo, em seguida, pós-fixado com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, por 1 hora. Logo após, lavou-se o material com a solução-tampão e realizou-se a desidratação com série alcoólica

crescente (álcoois 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% e etanol puro), por 10 minutos cada; soluções etanol + oxipropileno nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3 v/v, por 10 minutos cada; e oxipropileno puro por duas vezes, 10 minutos cada (BOZZOLA e RUSSEL, 1992).

A inclusão do material foi feita em historesina “Embed-812” (acetato de uranila), preparada conforme as recomendações do fabricante. Antes, porém, os segmentos de folha foram tratados com misturas que continham oxipropileno + solução de infiltração (mistura de 5 mL de acetato de uranila + 8 mL de anidrido dodecenil succínico e 8 mL de acetato de uranila + 7 mL de anidrido metil nádico), nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3 v/v, por 10 minutos cada. Utilizou-se em seguida a solução de infiltração pura, por 20 minutos. Ao colocar o material na historesina (solução de infiltração + endurecedor), utilizou-se vácuo brando por 20 minutos, visando aumentar a penetração da mistura. Logo após, o material foi emblocado em moldes plásticos apropriados, que foram colocados em estufa a 50°C, por dois dias, para polimerização da mistura. Nos blocos obtidos fizeram-se cortes transversais semifinos (2 a 8 µm de espessura), utilizando-se ultramicrotomo rotatório Sorval com navalha de vidro. Os cortes foram colocados sobre as lâminas de vidro, corados com azul-de-toluidina 0,01% (BOZZOLA e RUSSEL, 1992), e as lâminas permanentes montadas com o meio de inclusão rápida “Entellan”.

As observações e fotomicrografias foram realizadas em fotomicroscópio Carl Zeiss Jena DOCUVAL.

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura

As folhas, nas mesmas condições descritas para a microscopia de luz, foram cortadas em segmentos de aproximadamente 0,5 cm de lado. A fixação e a pós-fixação também seguiram os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Após a lavagem em solução-tampão e desidratação do material em série alcoólica progressiva, substituiu-se o etanol por CO₂ líquido em equipamento BALZERS, modelo CPD 020, utilizado para obter ponto crítico de secagem. Após ligeiro aquecimento, o CO₂ passou para a fase gasosa, deixando os segmentos de folha no seu ponto crítico.

Em seguida, os cortes foram aderidos a blocos especiais, para microscopia eletrônica de varredura (“stubs”), com a utilização de fita adesiva de dupla face e pasta de carbono aplicada aos bordos dos cortes, visando aumentar sua condutividade. O material assim preparado foi recoberto com uma camada de ouro metálico de aproximadamente 10 nm de espessura, utilizando-se o processo de pulverização catódica, realizado em equipamento BALZERS de congelamento a seco, modelo FDU 010, acoplado ao conjunto de pulverização catódica modelo SCA 010.

Foram feitas observações e fotomicrografias das faces abaxial e adaxial das folhas novas e maduras dos dois fenótipos, utilizando-se microscópio eletrônico de varredura JEOL T200.

3.2.4. Diafanização

Dentre as plantas de *L. sibiricus* cultivadas, escolheram-se três de cada fenótipo que fossem homogêneas e representativas da população. Coletaram-se folhas situadas no 10^o nó (folhas jovens), que foram seccionadas na região mediana, retirando-se segmentos de 0,5 x 1,0 cm ao lado da nervura central. Estes segmentos foram diafanizados, permitindo que se realizasse a contagem de tricomas glandulares e não-glandulares.

A diafanização foi realizada de acordo com os seguintes procedimentos, adaptados de Azevedo, citado por MARTINS (1996):

- fixação dos segmentos de folha em F.A.A. 50% (formalina, ácido acético e etanol 50% na proporção de 1:1:9 v/v), por 20 dias;
- hidratação com etanol 30% e água logo após, por 10 minutos cada;
- solução de NaOH 10% por 2 horas;

- lavagem em água destilada por três vezes, 5 minutos cada;
- solução de hipoclorito de sódio 20%, por 2 horas;
- lavagem em água destilada;
- desidratação com etanol 30 e 50%, por 10 minutos cada;
- coloração com safranina (JOHANSEN, 1940), por 2 horas;
- desidratação com etanol 70, 80, 90 e 100%, por 10 minutos cada;
- coloração com azul-de-anilina, por 12 minutos;
- etanol:xilol nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3, respectivamente, por 10 minutos cada;
- xilol, 10 minutos; e
- montagem das lâminas permanentes em bálsamo-do-canadá.

3.2.4.1. Determinação da frequência de tricomas

O material diafanizado foi observado em microscópio Carl-Zeiss Jena DOCUVAL, escolhendo-se, aleatoriamente, dez campos de observação com mesma área ($0,1271 \text{ mm}^2$) da face abaxial de cada material, nos quais se realizou a contagem do número de tricomas glandulares e não-glandulares (pêlos tectores) presentes. Posteriormente, calculou-se o número de tricomas por mm^2 (frequência), que foram submetidos à análise de variância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises isozimáticas

O sistema peroxidase foi o único dentre os testados que apresentou polimorfismo, devendo-se ressaltar que se obteve melhor resolução ao utilizar os tampões descritos por SHAW e PRASAD (1970). Foram obtidos os melhores resultados quando se utilizaram raízes jovens na preparação das amostras.

Na Figura 1, estão ilustradas as bandas características dos dois fenótipos para o sistema peroxidase. Houve a formação de apenas uma banda catódica com $R_f=0,1$ para os dois fenótipos. Houve diferenças na espessura da banda e intensidade de cor, formando-se dois padrões isozimáticos. O fenótipo de flores roxas apresentou maior espessura e coloração ligeiramente mais intensa da banda.

Para esse tipo de comportamento, PEREIRA (1986) sugere que possa estar havendo uma fixação casual de alelos, pois *Leonurus sibiricus* não é uma planta que tenha passado por seleção artificial, a exemplo de *Mellinis minutiflora*, planta com a qual trabalhou.

A intensidade e o tamanho das bandas podem ser indícios do grau de atividade das enzimas. SIEGEL e GALSTON (1967) e NAGLE e HAARD (1975) sugerem que as peroxidases têm relação com a oxidação do ácido indol-3-

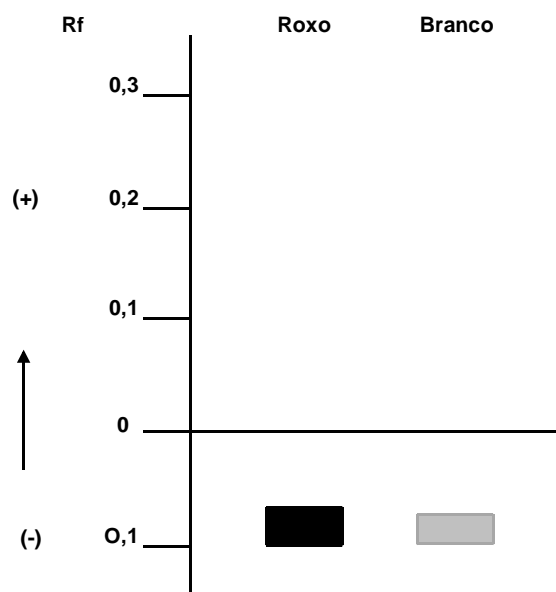


Figura 1 - Representação esquemática dos fenótipos isozimáticos de peroxidase (PO), obtidos nas análises eletroforéticas de raízes jovens de plantas dos fenótipos de flores roxas e brancas de *Leonurus sibiricus* L.

il-acético (AIA), o nanismo, o fenômeno da abscisão e o mecanismo de resistência às doenças, estando, portanto, bastante ligadas às respostas das plantas em condições estressantes. O fato de o fenótipo de flores roxas ter apresentado maior atividade de uma enzima de resposta ao estresse pode estar indicando que seja mais hábil em se adaptar às condições do meio do que o fenótipo de flores brancas. A maior disseminação do fenótipo roxo na natureza, em detrimento do branco, conforme observado na região de Viçosa e citado por LORENZI (1991), para outras regiões, pode ser considerado um indicativo de maior adaptabilidade daquele.

Na Figura 2 está representado o padrão isozimático dos dois fenótipos, obtido da eletroforese de amostras de folhas jovens, no sistema isocitrato desidrogenase. Apesar de não ter apresentado polimorfismo, este sistema teve boa resolução, podendo ser utilizado para comparações futuras. Os valores de Rf foram: banda 1 (a de menor mobilidade) Rf = 0,61; banda 2 Rf=0,66; e banda 3 Rf = 0,71.

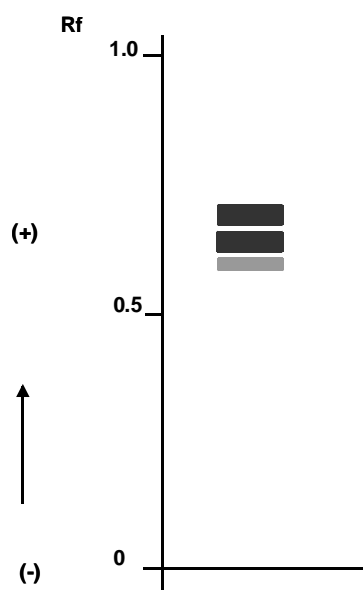


Figura 2 - Representação esquemática do fenótipo isozimático de isocitrato desidrogenase (IDH), obtido nas análises eletroforéticas de folhas jovens de plantas dos fenótipos de flores roxas e brancas de *Leonurus sibiricus* L.

4.2. Anatomia foliar

4.2.1. Estrutura da lâmina foliar

Nas características e na distribuição das estruturas internas da folha, não foi observada diferença entre os dois fenótipos e tampouco entre os dois estádios de desenvolvimento analisados.

Observa-se, na Figura 3, uma fotomicrografia de corte transversal semifino da folha de *L. sibiricus*. A epiderme é unisseriada nas duas faces, formada por células achatadas, recoberta por fina cutícula na superfície externa, sendo na superior o tamanho dessas células maior e a cutícula mais espessa. A folha é dorsiventral, diferente de *L. cardiaca*, que a possui isobilateral (ABU-ASAB e CANTINO, 1987). O mesofilo é formado por uma camada de células alongadas no sentido perpendicular à epiderme, o parênquima paliçádico, localizado na face adaxial, e por três a quatro estratos de células de formato

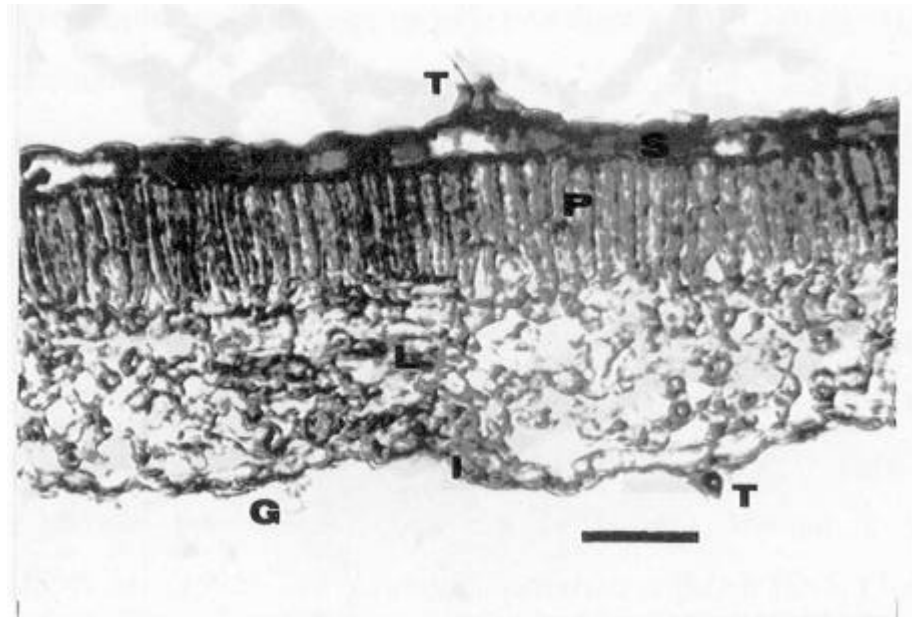


Figura 3 - Fotomicrografia de corte transversal semifino de folha de *Leonurus sibiricus* L. T - pêlo tector, G - tricoma glandular, S - epiderme superior, I - epiderme inferior, P - parênquima paliçádico e L - parênquima lacunoso. Barra = 50 μ m.

variável, localizados logo abaixo do parênquima paliçádico, o parênquima lacunoso, o que concorda com as observações realizadas por MOREIRA FILHO (1956), ao analisar a mesma espécie.

Observaram-se estômatos apenas na superfície abaxial (folha hipoestomática), situados num nível levemente acima da epiderme, como se observa na Figura 4, onde também se nota a câmara subestomática. Características estomáticas semelhantes foram observadas por ABU-ASAB e CANTINO (1987), em *L. cardiaca*.

Estão presentes tricomas glandulares peltados e capitados e tricomas não-glandulares (pêlos tectores) nas duas faces das folhas, percebendo-se maior quantidade dos dois tipos na face abaxial. Os pêlos encontrados são unisseriados, uni ou bicelulares e ornamentados. Na Figura 5, observa-se um pêlo tector unisseriado bicelular. Em *L. cardiaca* foram encontrados pêlos de duas e três células (ABU-ASAB e CANTINO, 1987), e em *Leonotis leonurus* ASCENSÃO

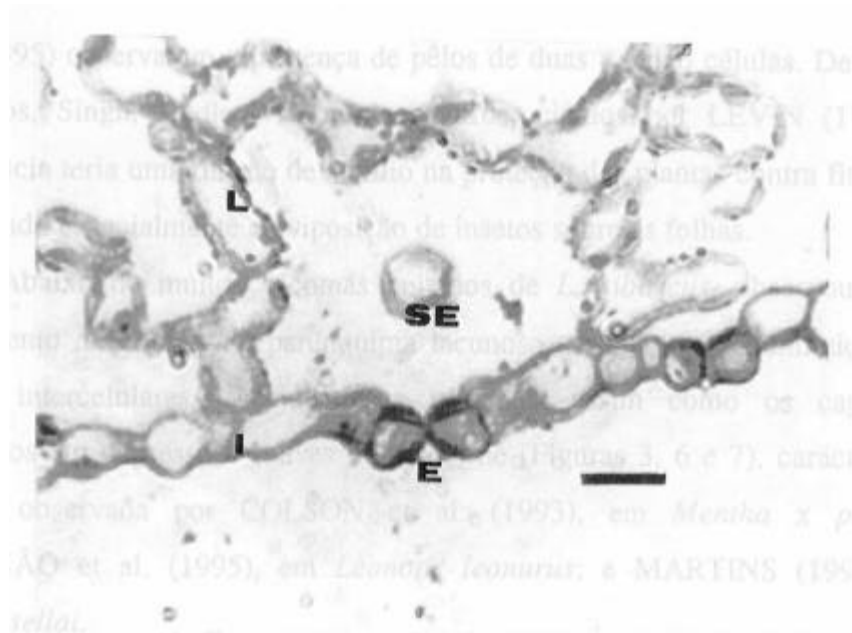


Figura 4 - Fotomicrografia de corte transversal semifino de folha de *Leonurus sibiricus* L. I - epiderme inferior, L - parênquima lacunoso, E - estômato e SE - câmara subestomática. Barra = 10 μ m.

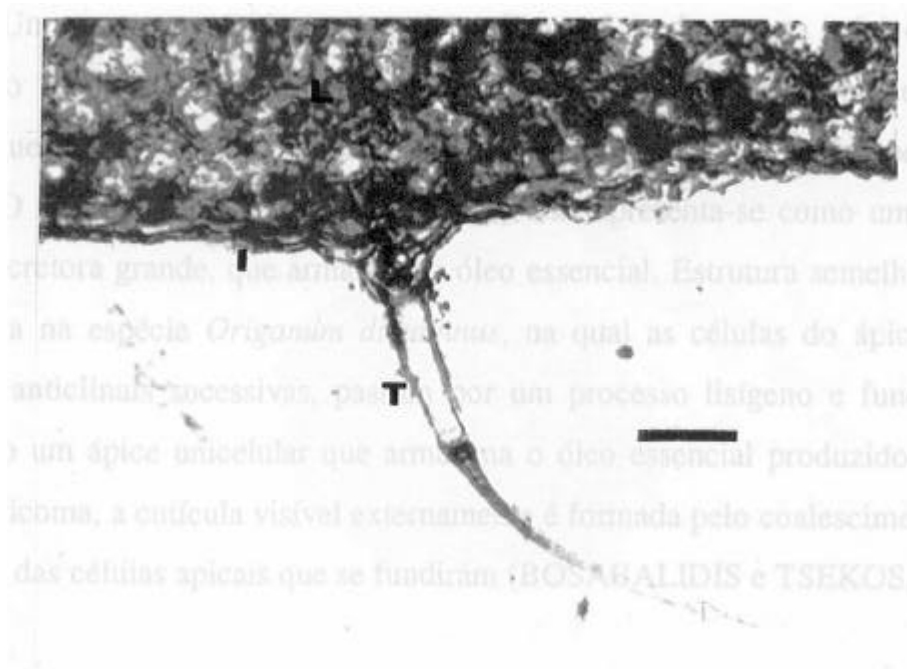


Figura 5 - Fotomicrografia de corte transversal semifino de folha de *Leonurus sibiricus* L. T - pêlo tector, I - epiderme inferior e L - parênquima lacunoso. Barra = 30 μ m.

et al. (1995) observaram a presença de pêlos de duas a cinco células. De acordo com Poos, Singh, Hedley, Bernard e outros, citados por LEVIN (1973), a pubescência teria uma função de auxílio na proteção das plantas contra fitófagos, dificultando especialmente a oviposição de insetos sobre as folhas.

Abaixo de muitos tricomas peltados de *L. sibiricus*, observou-se um adensamento de células no parênquima lacunoso, resultado da diminuição dos espaços intercelulares, estando estes tricomas, assim como os capitados, localizados em depressões suaves da epiderme (Figuras 3, 6 e 7), característica também observada por COLSON et al. (1993), em *Mentha x piperita*; ASCENSÃO et al. (1995), em *Leonotis leonurus*; e MARTINS (1996), em *Ocimum selloi*.

Na Figura 7, pode-se observar um tricoma peltado em detalhe, notando-se o grande volume de seu ápice, em que se acumula o óleo essencial, formando um corpo osmiofílico. O pedúnculo do tricoma é bastante curto, o que concorda com a descrição feita por FAHN (1988), para tricomas deste tipo presentes em outras espécies vegetais.

Um tricoma capitado é mostrado na Figura 8, onde se nota o ápice menor que o do tricoma peltado e pode-se observar a separação existente entre as células que formam o ápice, o que não se consegue perceber no tricoma peltado.

O tricoma peltado em *Leonurus sibiricus* apresenta-se como uma única célula secretora grande, que armazena o óleo essencial. Estrutura semelhante foi observada na espécie *Origanum dictamnus*, na qual as células do ápice, após divisões anticlinais sucessivas, passam por um processo lisígeno e fundem-se, formando um ápice unicelular que armazena o óleo essencial produzido. Nesse tipo de tricoma, a cutícula visível externamente é formada pelo coalescimento das cutículas das células apicais que se fundiram (BOSABALIDIS e TSEKOS, 1982).

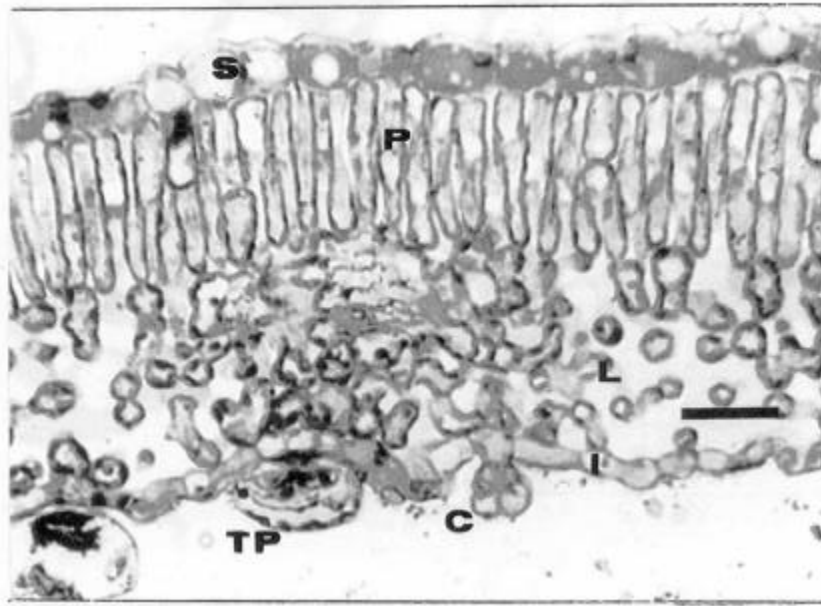


Figura 6 - Fotomicrografia de corte transversal semifino de folha de *Leonurus sibiricus* L. S - epiderme superior, I - epiderme inferior, P - parênquima paliçádico, L - parênquima lacunoso, TP - tricoma peltado e C - tricoma capitado. Barra = 30 μ m.

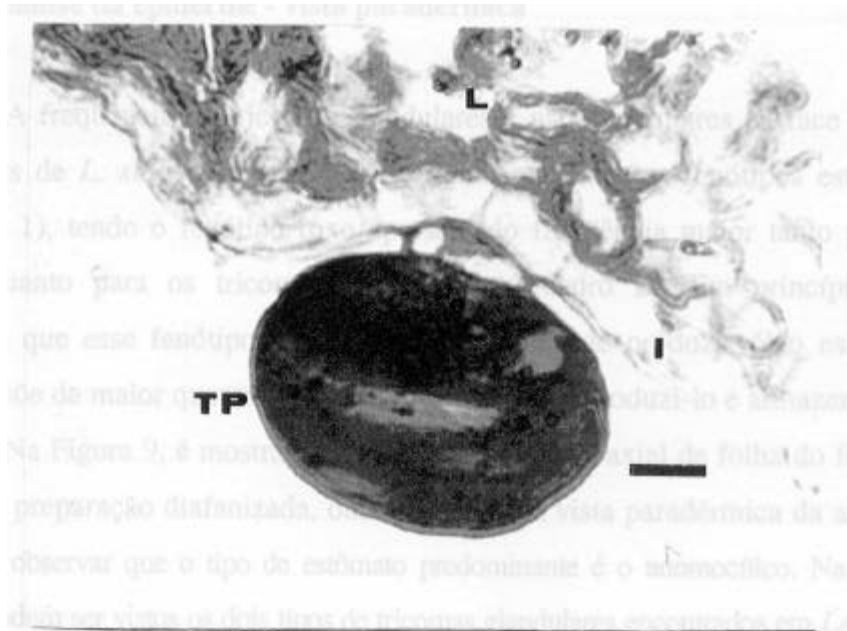


Figura 7 - Fotomicrografia de corte transversal semifino de folha de *Leonurus sibiricus* L. I - epiderme inferior, L - parênquima lacunoso e TP - tricoma peltado. Barra = 10 μ m.

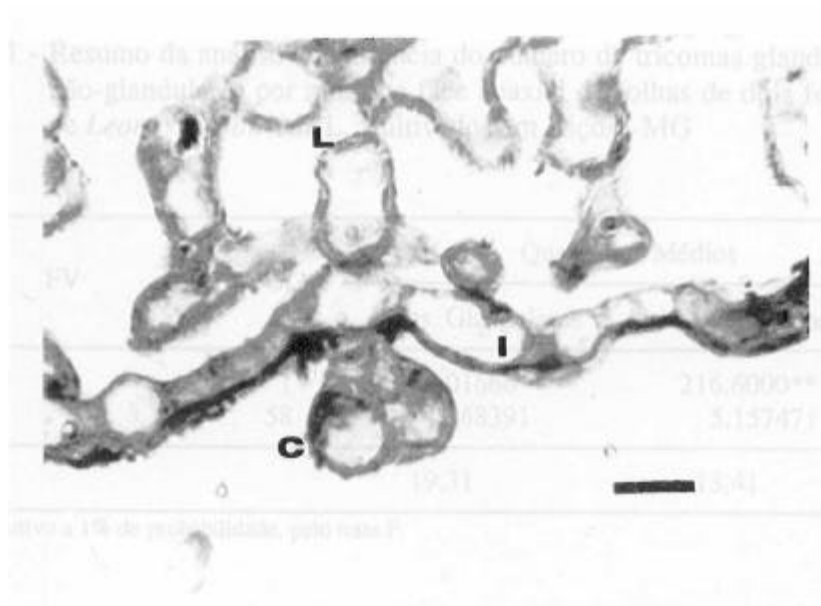


Figura 8 - Fotomicrografia de corte transversal semifino de folha de *Leonurus sibiricus* L. I - epiderme inferior, L - parênquima lacunoso e C - tricoma capitado. Barra = 10 μ m.

4.2.2. Análise da epiderme - vista paradérmica

A frequência de tricomas glandulares e não-glandulares da face abaxial de folhas de *L. sibiricus* varia significativamente entre os fenótipos estudados (Quadro 1), tendo o fenótipo roxo apresentado frequência maior tanto para os pêlos quanto para os tricomas glandulares (Quadro 2). Em princípio, isto significa que esse fenótipo teria maior capacidade de produzir óleo essencial, pois dispõe de maior quantidade de estruturas aptas a produzi-lo e armazená-lo.

Na Figura 9, é mostrado um detalhe da face abaxial de folha do fenótipo roxo em preparação diafanizada, onde se tem uma vista paradérmica da amostra. Pode-se observar que o tipo de estômato predominante é o anomocítico. Na mesma figura, podem ser vistos os dois tipos de tricomas glandulares encontrados em *Leonurus sibiricus*, devendo-se ressaltar que o peltado ainda está em fase de formação, podendo-se distinguir sete a oito células no ápice do tricoma, formadas no sentido radial. ABU-ASAB e CANTINO (1987) observaram características semelhantes em *L. cardiaca*.

Quadro 1 - Resumo da análise de variância do número de tricomas glandulares e não-glandulares por mm², na face abaxial de folhas de dois fenótipos de *Leonurus sibiricus* L., cultivados em Viçosa-MG

FV	GL	Quadrados Médios	
		Trics. Glandulares	Trics. Não-Glandulares
Fenótipo	1	58,01666**	216,6000**
Resíduo	58	1,568391	5,157471
CV (%)		19,31	13,41

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

Quadro 2 - Valores médios da frequência de tricomas glandulares e não-glandulares na face abaxial de folhas de dois fenótipos de *Leonurus sibiricus* L.

Fenótipos	Trics. Glandulares	Trics. Não-Glandulares
Flores roxas	59 a	149 a
Flores brancas	44 b	119 b

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

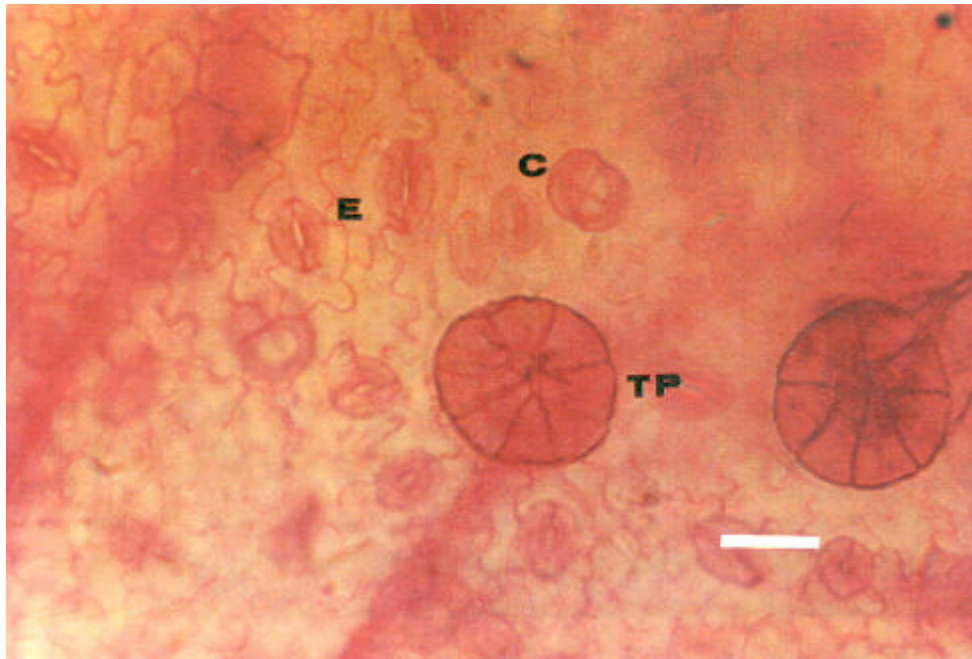


Figura 9 - Fotomicrografia de epiderme da face abaxial de folha diafanizada do fenótipo de flores roxas de *Leonurus sibiricus* L. TP - tricoma peltado, C - tricoma capitado e E - estômatos anomocíticos. Barra = 30 μ m.

Nas observações realizadas em microscópio eletrônico de varredura (Figuras de 10 a 19), pôde-se notar que existe uma superioridade do fenótipo roxo com relação à frequência de tricomas, considerando que as amostras foram coletadas e observadas em regiões padronizadas das folhas.

Nessas mesmas observações, não foram verificadas diferenças entre os dois fenótipos em relação ao tipo de estrutura presente na superfície foliar, havendo, porém, variação entre o tipo de estrutura predominante, considerando-se a face abaxial ou adaxial.

De modo geral, pôde-se observar que os tricomas glandulares capitados e peltados estão presentes tanto na superfície abaxial quanto na adaxial, mas que a ocorrência dos tricomas peltados é mais comum na face abaxial. Na face adaxial, encontram-se os tricomas capitados em maior número. Grande quantidade de tricomas glandulares rompidos foi observada (Figura 10), notando-se que os tricomas peltados foram os mais susceptíveis a esse tipo de dano.



Figura 10 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície abaxial de folha do fenótipo roxo de *Leonurus sibiricus* L. TP - tricoma peltado, C - tricoma capitado e T - pêlo tector; E - estômato. Barra = 50 μ m.

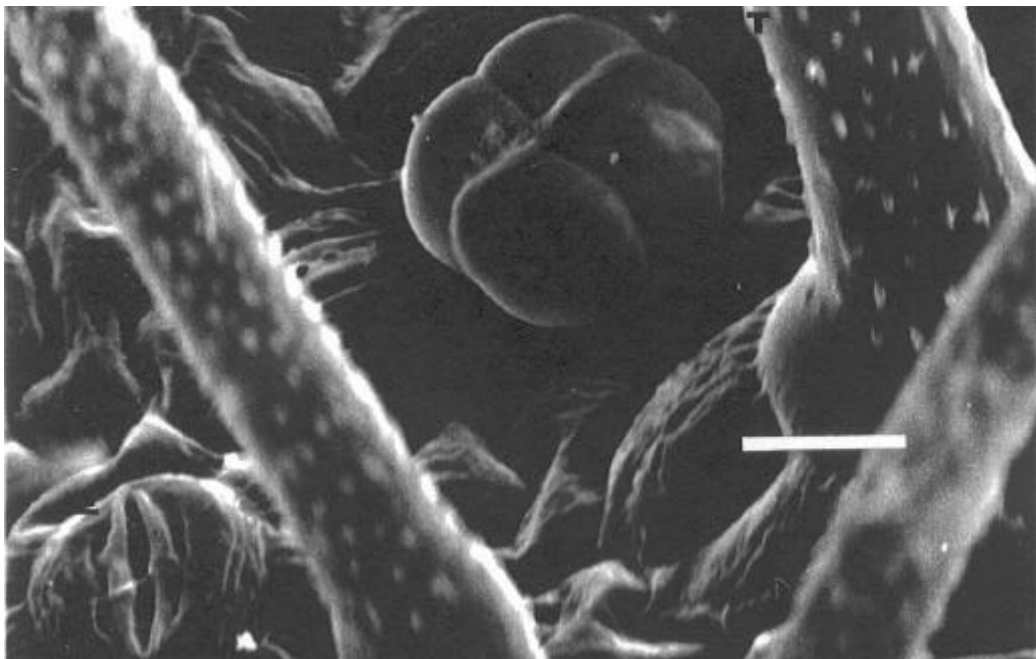


Figura 11 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície abaxial de folha do fenótipo roxo de *Leonurus sibiricus* L. C - tricoma capitado, T - pêlo tector, E - estômato e O - ornamentações. Barra = 10 μ m.

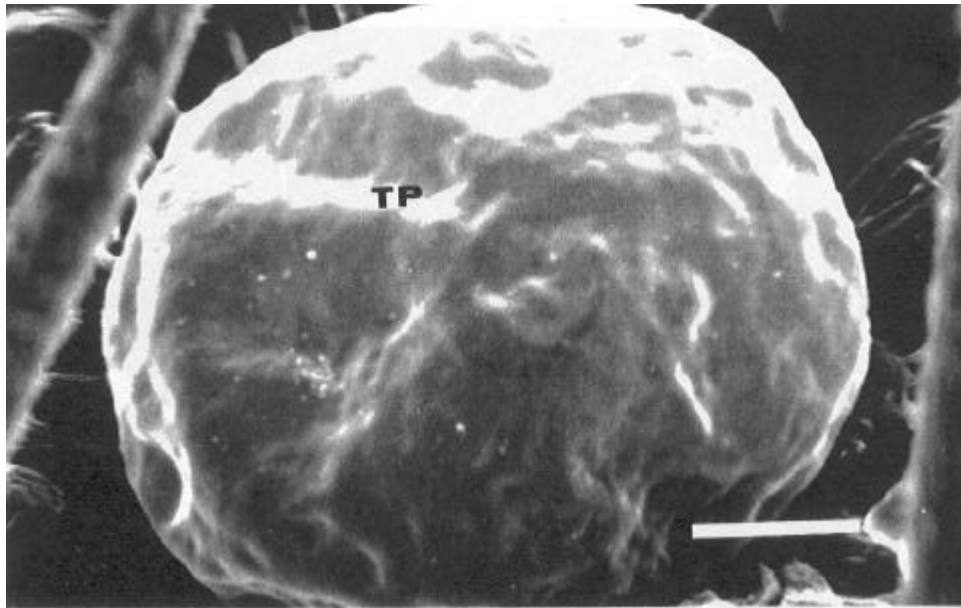


Figura 12 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície abaxial de folha do fenótipo roxo de *Leonurus sibiricus* L. TP - tricoma peltado. Barra = 10 μ m.



Figura 13 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície interna da corola de flor do fenótipo branco de *Leonurus sibiricus* L. T - pêlo tector. Barra = 140 μ m.

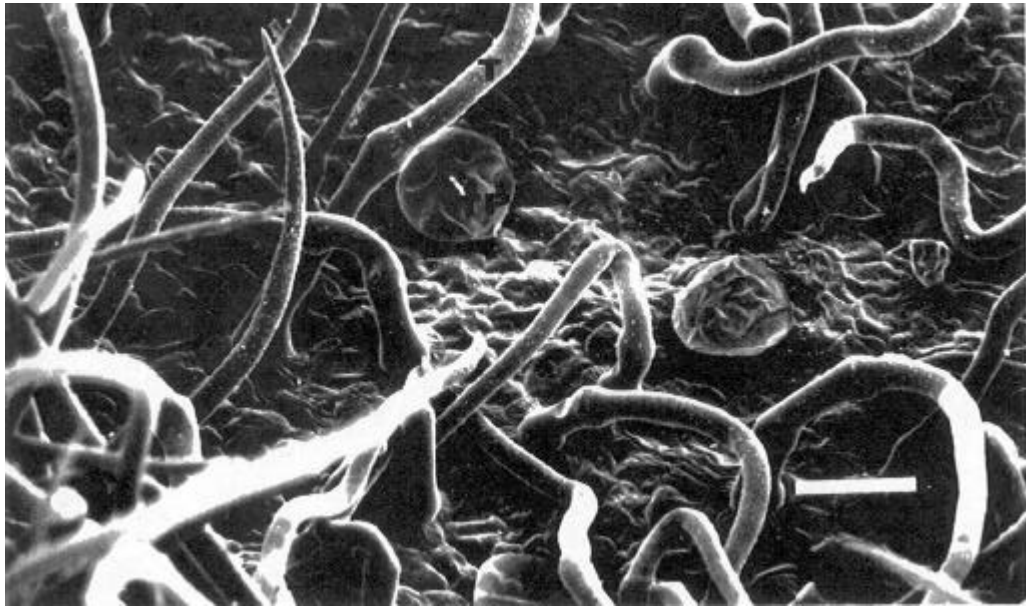


Figura 14 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície interna da corola de flor do fenótipo roxo de *Leonurus sibiricus* L. T - pêlo tector e TP - tricoma peltado. Barra = 100 μ m.

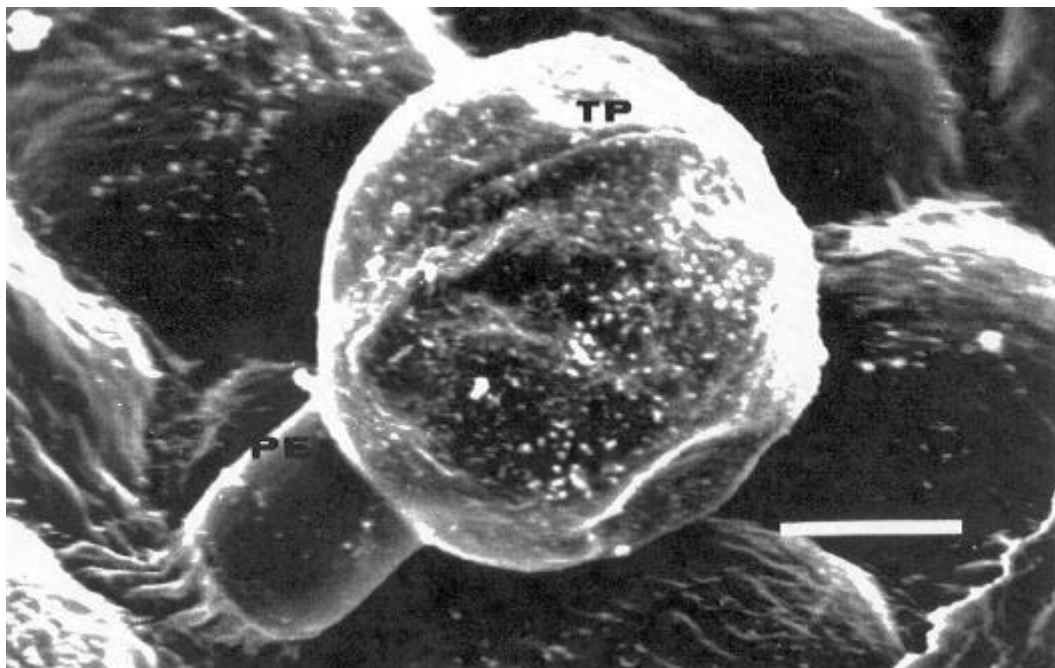


Figura 15 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície externa da corola de flor do fenótipo roxo de *Leonurus sibiricus* L. TP - tricoma peltado e PE - pedúnculo. Barra = 10 μ m.



Figura 16 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície abaxial de folha do fenótipo roxo de *Leonurus sibiricus* L. Barra = 100 μ m.

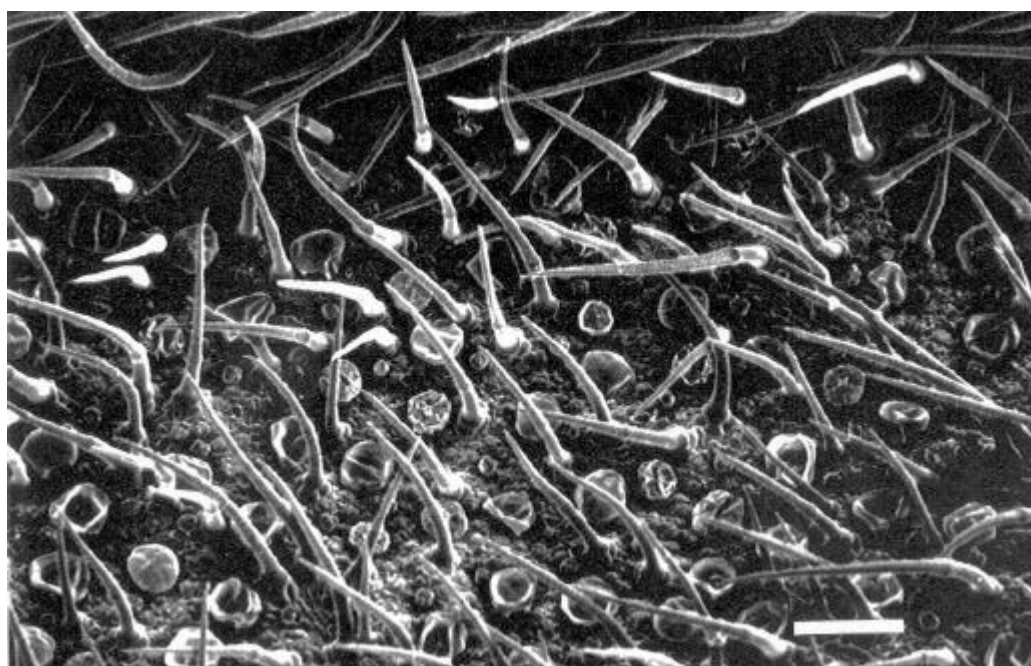


Figura 17 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície abaxial de folha do fenótipo branco de *Leonurus sibiricus* L. Barra = 100 μ m.

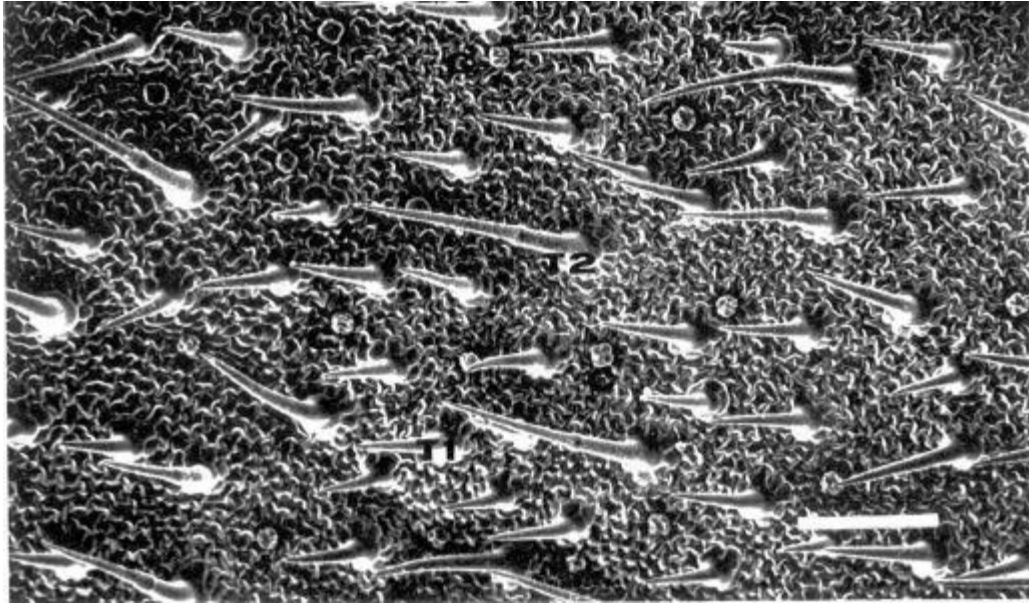


Figura 18 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície adaxial de folha do fenótipo roxo de *Leonurus sibiricus* L. C - tricoma capitado, T1 - pêlo tector unicelular e T2 - pêlo tector bicelular. Barra = 100 μ m.

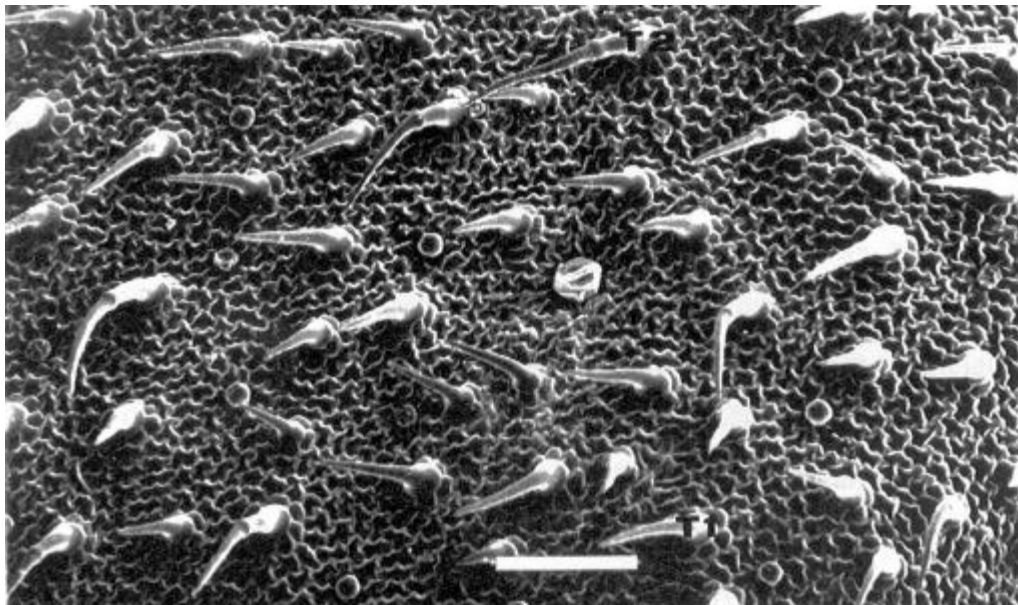


Figura 19 - Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície adaxial de folha do fenótipo branco de *Leonurus sibiricus* L. C - tricoma capitado, T1 - pêlo tector unicelular e T2 - pêlo tector bicelular. Barra = 100 μ m.

A redução da umidade relativa em níveis muito baixos, ao se realizar o ponto crítico de secagem, durante a preparação dos cortes para observação ao microscópio eletrônico de varredura, ou até mesmo durante a fixação do material, pode ter ocasionado o rompimento das glândulas peltadas de *Leonurus sibiricus*. VENKATACHALAM et al. (1984), ao trabalharem com *Salvia officinalis*, verificaram o mesmo fato.

Segundo ASCENSÃO et al. (1995), em *Leonotis leonurus* os dois tipos de tricomas glandulares, capitados e peltados, têm diferentes processos de secreção de seus conteúdos, devendo-se ressaltar que os peltados estão adaptados para se romperem mais facilmente sob a atuação de fatores externos, como altas temperaturas, baixa umidade relativa e ações por parte de animais, liberando o óleo essencial para o meio. O mecanismo de liberação do conteúdo dos tricomas peltados de *L. sibiricus* e de *Salvia officinalis* indica ser semelhante ao de *Leonotis leonurus*, como ocorre em plantas dos gêneros *Thymus* e *Origanum*, conforme verificado por Bruno e Modenesi, Werker e outros, respectivamente, citados por ASCENSÃO et al. (1995), o que demonstra ser esse sistema de liberação de óleo essencial relativamente comum em gêneros da família botânica Lamiaceae.

A maior sensibilidade dos tricomas peltados às temperaturas mais altas e à baixa umidade poderia explicar a localização preferencial destas estruturas na face abaxial das folhas, pois estariam mais protegidas da luz solar direta e dos ventos. Conforme sugerido por VENKATACHALAM et al. (1984), a fragilidade da cutícula que recobre as glândulas peltadas se deve, provavelmente, ao grande aumento de volume do seu ápice, ocasionado pelo acúmulo de óleo essencial. Na Figura 12, observa-se um tricoma glandular peltado em detalhe, percebendo-se a cutícula que o recobre, sob a qual fica armazenado o óleo essencial.

Os pêlos tectores observados são unisseriados, uni ou bicelulares, possuindo ornamentações na sua superfície (Figuras 10 e 11). A distribuição desses pêlos mostrou-se variável de acordo com as partes da planta analisadas. Na superfície abaxial das folhas, predominam os pêlos bicelulares, de

comprimento superior aos unicelulares, com estes últimos ocorrendo em maior número na face adaxial.

Dentro da corola das flores, observou-se uma grande quantidade de pêlos de comprimento elevado, não sendo possível verificar corretamente, nas imagens obtidas, o número de células que os formam (Figuras 13 e 14).

Os tricomas podem auxiliar no balanço hídrico das plantas (LEVIN, 1973), e uma das formas de tal fato se realizar seria pela retenção de umidade na camada limítrofe, impedindo a ação direta do vento nessa região próxima à epiderme (TAIZ e ZEIGER, 1991). A presença de pêlos de maior comprimento na face abaxial das folhas serviria como uma barreira à perda excessiva de água pela retenção do vapor d'água produzido pela evapotranspiração, por mais tempo, já que é nessa face que estão localizados os estômatos.

Na face adaxial estão localizadas as células do parênquima paliçádico, que contêm grande quantidade de cloroplastos e que, portanto, são responsáveis pela absorção de grande porcentagem da luz necessária para a fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 1991). Para o funcionamento normal desse processo, é necessário que grande quantidade de luz chegue até essas células, que seria parcialmente impedida de passar se houvesse a barreira constituída por pêlos de tamanho maior.

A função dos pêlos longos dentro das flores seria a de, provavelmente, impedir a destruição prematura de estruturas responsáveis pela atração de insetos polinizadores (Figura 14), ao contrário da face externa, em que foram verificadas a presença de tricomas glandulares peltados e a completa ausência de pêlos tectores (Figura 15), configuração que pode ter a função de atrair a atenção desses insetos a distâncias maiores, pela liberação no meio de substâncias atrativas presentes nos óleos essenciais.

A diferença de frequência de tricomas existente entre os dois fenótipos pode ser visualizada nas Figuras de 16 a 19, que mostram regiões equivalentes da face abaxial e adaxial, da folha de cada fenótipo. Pode-se perceber pela comparação das imagens que o fenótipo roxo possui maior número de pêlos e de tricomas glandulares, tanto na face abaxial, onde a diferença é mais visível,

quanto na face adaxial. Isso, de certa forma, fornece uma confirmação dos dados obtidos na determinação da frequência de tricomas na face abaxial, realizada anteriormente.

5. CONCLUSÕES

Verificou-se a existência de padrões isozimáticos distintos entre os dois fenótipos para o sistema peroxidase.

Não se observaram diferenças anatômicas do mesofilo foliar dos dois fenótipos.

Observou-se que as folhas do fenótipo de flores roxas de *Leonurus sibiricus* L. apresentaram maior frequência de tricomas glandulares e não-glandulares na face abaxial, em relação às do fenótipo de flores brancas.

Verificou-se que na face abaxial das folhas de *Leonurus sibiricus* L. predominam os tricomas glandulares do tipo peltado e os tricomas não-glandulares unisseriados bicelulares, enquanto na face adaxial predominam os tricomas glandulares capitados e os tricomas não-glandulares unisseriados unicelulares, não havendo diferenças entre os dois fenótipos analisados.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DO RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE DOIS FENÓTIPOS DE *Leonurus sibiricus* L.

1. INTRODUÇÃO

A importância dos óleos essenciais na sociedade moderna é um fato indiscutível, em razão da sua ampla utilização em diversas indústrias, como a farmacêutica, cosmética e alimentícia. Na medicina popular, a preparação de diversas espécies de plantas aromáticas, na forma de infusões, procura extrair e utilizar os benefícios dessa classe de princípios ativos.

O fato de os óleos essenciais serem produto do funcionamento do metabolismo secundário das plantas pode implicar grandes variações em termos de quantidade e composição, de acordo com fatores como: parte da planta, horário e época de colheita, ataque de patógenos e, ou, pragas, regime hídrico, dentre outros. De acordo com Tétényi, citado por BROWN JR. (1988), aos poucos está se reconhecendo que a variação qualitativa e quantitativa dos metabólitos secundários pode ocorrer ao longo de diferentes eixos temporais e espaciais, tanto genéticos, quanto ecológicos e fisiológicos.

Dentre os dois fenótipos de *L. sibiricus* já citados anteriormente, observou-se que, além da cor das flores, o fenótipo de flores roxas apresentava um aroma ligeiramente mais forte que o de flores brancas, o que poderia ser uma indicação de que haveria diferenças químicas entre os óleos essenciais dos dois fenótipos (MARTINS et al., 1994).

Realizou-se este trabalho com o objetivo de caracterizar os dois fenótipos de *L. sibiricus* quanto ao rendimento e à composição do óleo essencial extraído de caules e de folhas +inflorescências, coletados no início e em plena floração.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Óleos essenciais

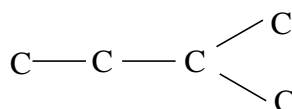
Os óleos essenciais constituem uma grande categoria de princípios ativos produzidos por vegetais, caracterizados por serem separáveis por arraste com vapor de água e produzidos em estruturas anatômicas e celulares definidas, como cavidades e canais esquizógenos e lisígenos e pêlos glandulares (GOTTLIEB e SALATINO, 1987). Outra característica dos óleos essenciais citada pelos autores seria a de conferir aroma aos organismos que os produzem, embora ressaltando que esta é uma característica de muitos outros produtos vegetais. Eles são definidos por WATERMAN (1993) como misturas complexas, contendo muitas vezes mais de 100 compostos.

Os óleos essenciais mais utilizados são quimicamente constituídos por terpenos ou terpenóides e fenilpropenos ou fenilpropenóides (WATERMAN, 1993). O emprego dos termos terpenos e terpenóides, assim como fenilpropenos e fenilpropenóides, tem sido utilizado indistintamente por diferentes autores, normalmente terpenos e fenilpropenos, referindo-se a hidrocarbonetos e terpenóides e fenilpropenóides, a compostos semelhantes com funções oxigenadas (MARTINS, 1996), sem, no entanto, haver um consenso sobre o assunto. No presente trabalho, foram utilizados os termos

originalmente propostos por cada autor citado.

2.2. Grupos de compostos constituintes dos óleos essenciais

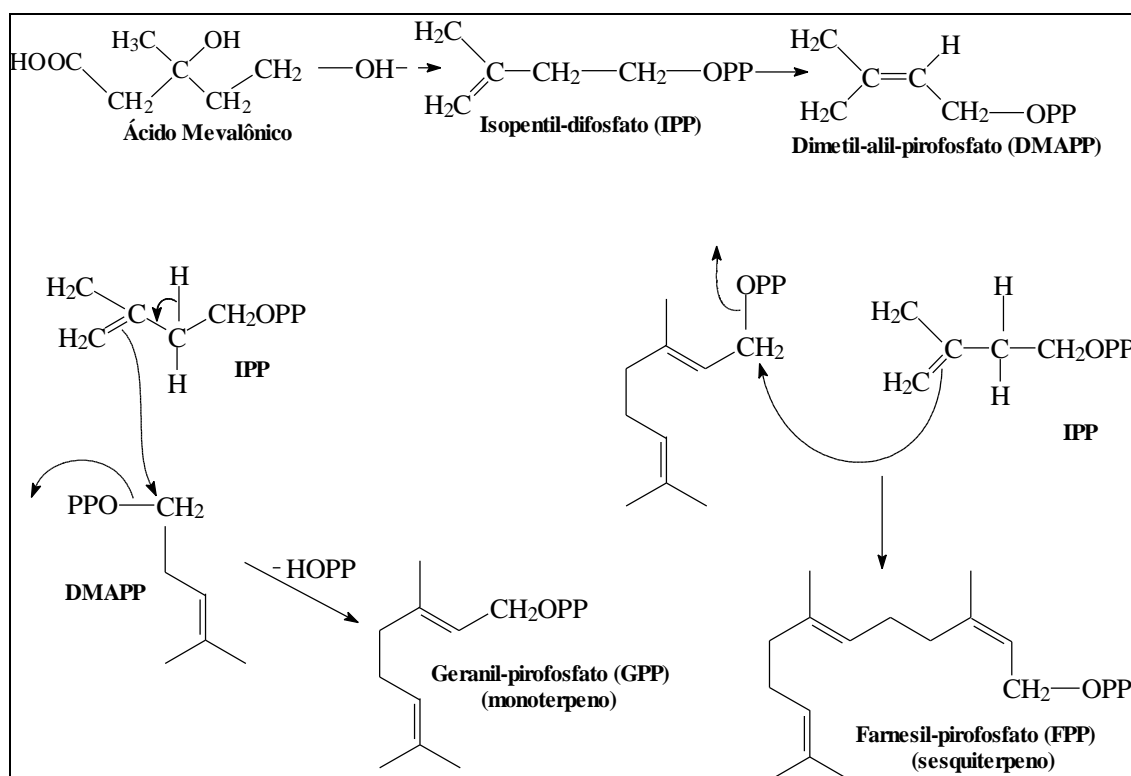
Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários formados pela junção de unidades isoprênicas, constituídas por cinco carbonos (Figura 1) (BANTHORPE e CHARLWOOD, 1980; TAIZ e ZEIGER, 1991). Podem ser classificados em grupos, de acordo com a quantidade de unidades isoprênicas presentes, como os monoterpenos, com duas unidades isoprênicas, portanto, com dez carbonos; sesquiterpenos (15 carbonos); diterpenos (20 carbonos), e assim por diante, sendo os mais encontrados nos óleos essenciais os mono e sesquiterpenos (BANTHORPE e CHARLWOOD, 1980; PATITUCCI et al., 1995). São compostos encontrados em todo o reino vegetal, principalmente no grupo Traqueófitas (BANTHORPE e CHARLWOOD, 1980).



Fonte: WATERMAN (1993).

Figura 1 - Representação esquemática do esqueleto carbônico de uma unidade isoprênica.

Os sesquiterpenos são originados da rota biossintética do ácido mevalônico (Figura 2), da qual também se originam os monoterpenos, devendo-se ressaltar que são conhecidas mais de 3.000 estruturas sesquiterpênicas e cerca de 1.000 monoterpênicas (WATERMAN, 1993). A grande diversidade de sesquiterpenos é devido ao maior número de carbonos presentes nesses compostos, o que permite maior variação estrutural e estereoquímica (MARTINS,



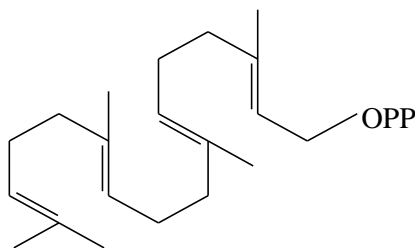
Fonte: Martins (1996), adaptado de Waterman (1993).

Figura 2 - Biossíntese dos terpenóides.

1996). Ocorrem com frequência nos óleos essenciais, sendo menos voláteis e mais viscosos que os monoterpeneos, com um odor muitas vezes fraco, com propriedades organolépticas menos pronunciadas que os monoterpeneos, podendo, no entanto, influenciar delicadamente o odor dos óleos essenciais em que ocorrem (GUENTHER e ALTHAUSEN, 1975; WATERMAN, 1993).

O cadineno (Figura 9) é um exemplo de sesquiterpeneo que ocorre em muitas famílias botânicas, como as Rutaceae, Lamiaceae, Poaceae, Lauraceae, Mirtaceae, Burseraceae, Umbeliferae, Zingiberaceae, Piperaceae, Pinaceae e outras, existindo diversas variações na sua estrutura, sendo o δ -cadineno utilizado em perfumaria e cosmética (GUENTHER e ALTHAUSEN, 1975).

Os diterpeneos, formados por 20 carbonos, originam-se do geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (Figura 3) (BANTHORPE e CHARLWOOD, 1980). São



Fonte: BANTHORPE e CHARLWOOD (1980).

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura molecular do geranylgeranyl pirofosfato (GGPP).

constituintes minoritários nos óleos essenciais (WATERMAN, 1993), ocorrendo com frequência em espécies das ordens Lamiales e Asterales, embora a maior fonte desses compostos seja as espécies das ordens Fabales e Geraniales (BANTHORPE e CHARLWOOD, 1980). De ocorrência mais comum em resinas, os diterpenos possuem a propriedade de endurecerem em contato com o ar, servindo para fechar cortes existentes nas plantas, como em muitas espécies da família Euphorbiaceae (TAIZ e ZEIGER, 1991). É incomum a presença desses compostos em extrações de óleo essencial, realizadas por arraste de vapor, em virtude da sua baixa pressão de vapor. São, de modo geral, altamente viscosos ou sólidos, com alto peso molecular (GUENTHER e ALTHAUSEN, 1975).

No gênero *Leonurus*, isolaram-se diversos desses compostos, como leosibirina, isoleosibina e leosibiricina, isolados em *L. sibiricus* (SAVONA et al., 1982), preleoeterina, leoeterina e preispanolona, que são diterpenos labdânicos de *L. heterophyllus* (HON et al., 1991, 1993) e leocardina, isolada em *L. cardiaca* (MALAKOV et al., 1985). Os diterpenos labdânicos são utilizados para distinguir drogas do gênero *Leonurus*, pois ocorrem apenas em *L. sibiricus* e *L. heterophyllus* (SAVONA et al., 1982; HON et al., 1991).

Os sesquiterpenos participam de processos ligados à senescência das plantas, enquanto os diterpenos estão relacionados à regulação de crescimento, pois são precursores do ácido abscísico e de giberelinas, respectivamente

(BANTHORPE e CHARLWOOD, 1980; TAIZ e ZEIGER, 1991).

A ocorrência de óleos essenciais na espécie *L. sibiricus* foi relatada por Karpovich, citado por OGA et al. (1986).

2.3. Importância dos óleos essenciais

Para que as plantas produzam os óleos essenciais, há um custo elevado em termos de DNA, enzimas e energia, que são retirados do metabolismo primário, presumindo-se que haja alguma vantagem para as plantas que os produzem em relação às que não os produzem (DEANS e WATERMAN, 1993). De acordo com Swain, citado por CROTEAU e JOHNSON (1984), são substâncias produzidas pelas plantas em resposta às necessidades ecológicas e de seu desenvolvimento, e conforme BROWN JR. (1988), exercem funções protetoras ou sinalizadoras.

A distinção de materiais genéticos pode ser feita pela análise da produção de óleos essenciais, em que se identificam os “quimiótipos”, que são constituídos de populações de plantas da mesma espécie, mas que apresentam distinção quanto às espécies químicas que produzem (HAY e SVOBODA, 1993), conforme verificado por MARTINS (1996), em *Ocimum selloi*.

Podem ter a função de repelir herbívoros ou de diminuir o seu apetite, como três sesquiterpenos isolados da espécie *Parabenzoin trilobum*, que inibiram o apetite de larvas das mariposas *Spodoptera litorallis* e *Trimeresia miranda* (Wada et al., citados por LEVIN, 1973).

Atuam também como fitoalexinas, combatendo fitopatógenos. PANDEY e DUBEY (1992), ao testarem diversos óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de plantas sobre a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos, verificaram que os óleos extraídos de *Hyptis suaveolens* e *Ocimum canum* (Lamiaceae) provocaram 100% de inibição do crescimento micelial de *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum* e *Rhizoctonia solani*. SCORTICHINI e

ROSSI (1991) observaram que os monoterpenos β -pineno, geraniol e citronelol exercem controle *in vitro* sobre a bactéria *Erwinia amylovora*, raça NCPPB 595.

A atividade moluscicida de monoterpenóides (timol, carvacrol e limoneno) presentes no extrato de *Lippia* sp., de sesquiterpenóides de *Warburgia ugandensis*, *Ambrosia maritima* e *A. confertiflora* e de diterpenóides de *Bacharis trimera* e *Wedelia scaberrima* foi verificada por SINGH et al. (1996).

Podem ainda atrair insetos úteis, como os polinizadores; exercer funções alelopáticas, estimulando ou inibindo a germinação de sementes e, ou, o desenvolvimento de outras plantas; atuar como “controladores” da combustão da celulose em certos ecossistemas em que a germinação de certas espécies depende de calor para ocorrer; e controlar a atividade de fungos celulolíticos, regulando assim a taxa de decomposição do material vegetal, o que resulta em maximização da utilização de nutrientes no sistema (DEANS e WATERMAN, 1993).

A utilização dos óleos essenciais pelo ser humano é feita de maneira crescente e diversificada, seja nas indústrias (farmacêutica, cosmética e alimentícia) (VERLET, 1993), ou utilizando-os diretamente das plantas que os produzem, como é normalmente feito nas práticas da medicina fitoterápica (MARTINS et al., 1994). Possuem efeitos terapêuticos variados, como estimulantes digestivos, sedativos, antidepressivos e antissépticos (HOFFMANN, 1990).

Cerca de 700 milhões de dólares por ano são movimentados no mercado de óleos essenciais no mundo, obtidos de espécies variadas, com destaque para os óleos de rosa, menta e cítricos, responsáveis por mais de 300 milhões de dólares. A maior parte dessa produção é proveniente de países em desenvolvimento, que, com o crescimento da demanda mundial, poderão aumentar sua produção (VERLET, 1993).

2.4. Extração de óleos essenciais

De acordo com Charles e Simon, citados por LOPES (1997), várias técnicas podem ser empregadas para extração de óleos essenciais, como a hidrodestilação, destilação por arrastamento de vapor, extração com solventes orgânicos ou com CO₂ líquido, devendo-se ressaltar que o último processo apresenta um ótimo resultado, mas com o inconveniente de ser extremamente caro. CRESPO et al. (1991), esclareceram que o método de extração deve ser escolhido de acordo com as características de cada espécie. O processo mais utilizado para realizar as extrações é o arrastamento com vapor d'água, que apresenta um bom rendimento, facilidade de execução e custo baixo (MANCINI, 1984; CICOGNA JÚNIOR et al., 1987; MARTINS, 1996).

O tempo de destilação é um fator que pode alterar tanto o rendimento do óleo essencial, quanto a sua composição, conforme verificaram MANCINI (1984), em *Mentha arvensis* (hortelã-do-brasil), e CICOGNA JÚNIOR et al. (1987), em *Caryophyllus aromaticus* (cravo-da-índia) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão), ao testarem diversos tempos de hidrodestilação.

2.5. Análise qualitativa dos óleos essenciais

A separação e a identificação dos componentes que normalmente formam os óleos essenciais oferecem algumas dificuldades, por causa da existência de diversos compostos isoméricos e da instabilidade apresentada por certos terpenos (RUDLOFF, 1974).

A utilização da cromatografia em fase gasosa tem se mostrado efetiva para as análises de misturas complexas, obtendo-se bons resultados qualitativos e quantitativos, especialmente após o surgimento dos equipamentos mais modernos, que realizam grande parte das operações, como a integração e o cálculo da área dos picos dos cromatogramas (Bonato, citado por MARTINS, 1996). Segundo SILVERSTEIN et al. (1981), as técnicas cromatográficas possuem como vantagens a rapidez e a grande precisão dos resultados obtidos nas análises.

A comparação entre cromatogramas obtidos pela injeção de padrões conhecidos e amostras com compostos desconhecidos é muito útil em quimiotaxonomia, ou para identificação e controle de qualidade de drogas (WOLFENDER e HOSTETTMANN, 1995), dentre as inúmeras utilidades que esta técnica possui. Ainda segundo os autores, a utilização conjunta da cromatografia de fase gasosa e da espectrometria de massa tem se mostrado essencial para a análise e identificação de compostos presentes em misturas complexas dos óleos essenciais, ressaltando que, até o momento, a análise de compostos pela utilização da espectrometria de massa é a mais eficiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção das plantas para as extrações

Em maio de 1996, foram semeados dois fenótipos de *Leonurus sibiricus* L. (macaé), encontrados no campus da UFV (um com flores brancas e outro com flores roxas). As sementes utilizadas foram coletadas em novembro do ano anterior, de plantas nascidas espontaneamente em área submetida ao segundo ano de pousio, e acondicionadas em sacos de papel, armazenados em local seco, ao abrigo da luz e à temperatura entre 23 e 26 °C.

Utilizaram-se nove bandejas de isopor de 8 x 16 perfurações em cada uma, num total de 1.152 células, tendo cada fenótipo ocupado metade destas. Em cada célula, medindo 3,5 cm de lado, foram colocadas aproximadamente quatro sementes. O substrato utilizado nas bandejas de isopor foi composto de areia : esterco bovino curtido : terra, na proporção de 3:2:1. As bandejas permaneceram sob um telado de sombrite 50% e polietileno transparente, até as mudas atingirem aproximadamente 8 cm.

As mudas foram transplantadas, em julho de 1996, para canteiros de 2,0 x 1,5 m, localizados na área da Horta Biodinâmica, da UFV, com espaçamento de 0,4 x 0,3 m, totalizando 25 plantas em cada um. Para a adubação, foram utilizados 13,3 L de esterco de aves decomposto/m². Cada canteiro constituiu de

duas parcelas, devendo-se ressaltar que as plantas utilizadas nos diversos experimentos foram apenas as nove plantas do interior dos canteiros (parcela útil), constituindo-se as demais em bordaduras.

No Quadro 1, observa-se o resultado da análise de solo realizada na área experimental. Por causa das condições de fertilidade existentes, optou-se por realizar a fertilização com esterco de aves decomposto, cujos resultados da análise encontram-se no Quadro 2.

Quadro 1 - Resultado da análise* de amostras do solo da área experimental na Horta Biodinâmica do Departamento de Fitotecnia da UFV, em Viçosa-MG

pH (H ₂ O)	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC		V	M
								Efetiva	Total		
	mg/dm ³	%
5,3	1,0	16	0	2,0	0,7	3,9	2,78	2,78	6,68	41,6	0

P e K - extrator Mehlich 1.

Al, Ca e Mg - extrator cloreto de potássio 1 mol/L.

H+Al - extrator acetato de cálcio 0,5 mol/L pH 7,0.

* Análise realizada pelo Laboratório de Análises Químicas do Solo, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

Quadro 2 - Resultado da análise* de amostras do esterco de aves utilizado na área experimental da Horta Biodinâmica do Departamento de Fitotecnia da UFV, em Viçosa-MG

N	P	K	Ca	Mg	U ¹	MO ²	Zn	Mn	Cu	Fe
.....%
1,65	3,16	1,25	10,99	0,72	15,3	32,3	371,0	591,3	101,9	1.4321

* Análise realizada pelo Laboratório de Biologia do Solo, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

¹ - umidade.

² - matéria orgânica.

O solo foi classificado como “muito argiloso”, de acordo com a análise realizada pelo Laboratório de Física do Solo, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, com 48 parcelas em 24 canteiros, distribuídos em seis blocos. Os tratamentos constituíram de dois fenótipos (plantas com flores roxas e brancas), duas épocas de coleta (início e pleno florescimento) e separação da planta em duas frações, para cada coleta (folhas + inflorescências e caules), formando um fatorial 2³.

As irrigações foram realizadas quando necessário, elevando-se a disponibilidade de água do solo para a capacidade de campo, além de capinas manuais periódicas, apenas quando a presença de invasoras tornava-se excessiva.

3.2. Coleta e preparo das amostras

A primeira época de coleta das plantas foi atingida quando cerca de 20% delas apresentavam a cor dos botões florais bem definidas nas inflorescências, antes da antese. A segunda época de coleta se deu quando aproximadamente 50% das plantas apresentavam pelo menos um ramo plenamente florido.

Para a coleta, escolheram-se três plantas homogêneas e representativas da parcela útil, que foram cortadas na base do caule, pouco acima do solo, e levadas em seguida ao laboratório, para a secagem. As coletas foram realizadas entre 7 e 8 horas da manhã, que, de acordo com MARTINS (1996), foi o horário em que se obteve maior rendimento de óleo essencial para *Ocimum selloi* Benth., espécie pertencente à mesma família botânica que *Leonurus sibiricus* L.

No laboratório, as plantas de cada parcela coletada foram colocadas em geladeira, sendo retiradas paulatinamente para o preparo do material para secagem. Esse preparo consistiu em separar os caules das demais partes (folhas e inflorescências) e seccioná-los em pedaços de aproximadamente 2 cm. As inflorescências também foram seccionadas, individualizando cada glomérulo. As duas frações assim constituídas de folhas + inflorescências e caules foram colocadas para secar separadamente, em sacos de papel, dentro de estufa com

circulação forçada de ar, a uma temperatura de $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por nove dias. Após a secagem, as plantas foram acondicionadas em embalagens impermeáveis de polipropileno, com 0,06 mm de espessura, e armazenadas em câmara fria a aproximadamente 13°C , dentro de caixas de papelão lacradas e etiquetadas, onde permaneceram até a realização das extrações do óleo essencial.

3.3. Extração do óleo essencial

Utilizou-se para essa finalidade o método por arraste de vapor (MARTINS, 1996; LOPES, 1997), no qual se empregou o equipamento mostrado na Figura 4.

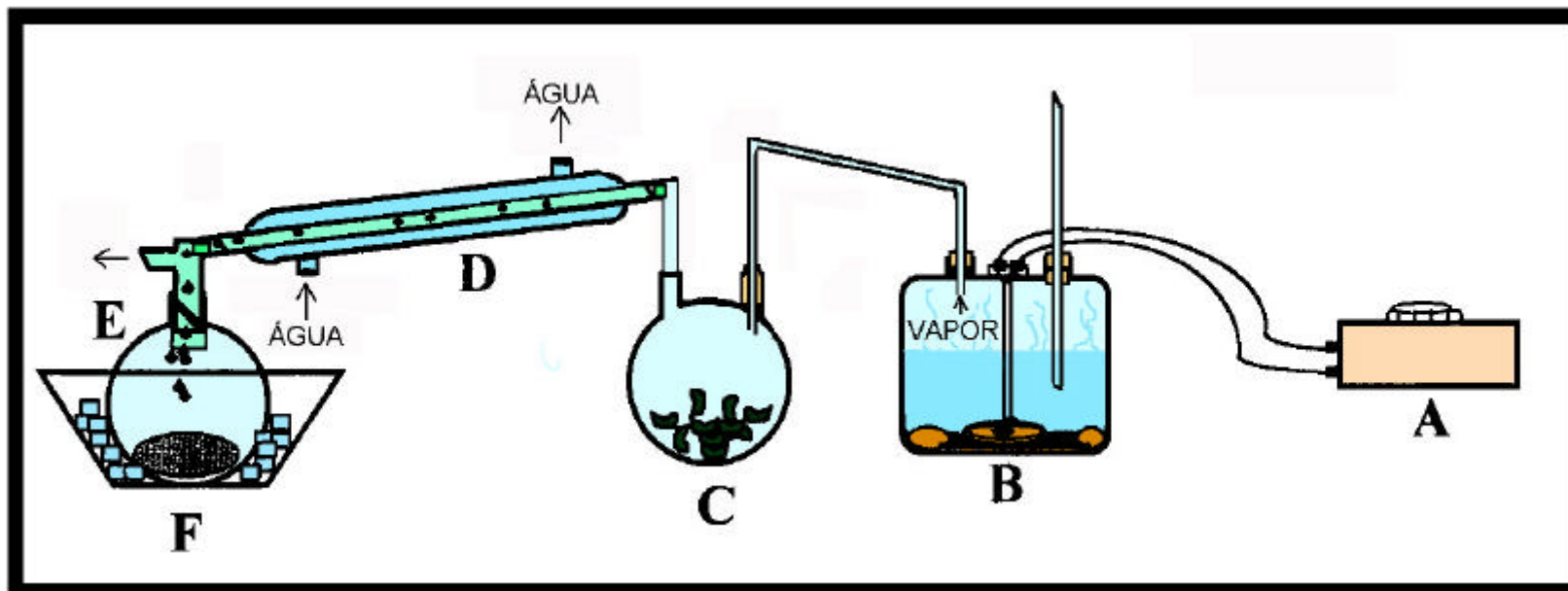
Antes de realizar as extrações do óleo essencial, procederam-se a diversos testes preliminares, com a finalidade de ajustar a metodologia, os quais tiveram os seguintes resultados: tempo de arraste - aproximadamente 90 minutos; massa de plantas secas utilizadas na extração - aproximadamente 10 g; e volume de hidrolato coletado - 1,5 L.

O hidrolato coletado foi colocado em funil de separação e a extração do óleo essencial feita pela adição de 100 mL de cloreto de metileno, agitando-se vigorosamente por cerca de 10 segundos, repetindo-se a operação por três vezes. O óleo solubilizou-se na fase orgânica, descartando-se a fase aquosa. A umidade residual da fase orgânica foi retirada com a adição de sulfato de magnésio anidro em excesso, por algumas horas. Em seguida, filtrou-se o material e removeu-se o solvente, utilizando-se um evaporador rotativo.

Determinou-se a massa de óleo obtida e calculou-se a porcentagem correspondente de óleo, em relação à massa de plantas utilizada na extração.

3.4. Análise do rendimento

Para interpretação dos dados de produção de óleo essencial obtidos, realizou-se a sua análise de variância.



Fonte: adaptado de LOPES (1997).

Figura 4 - Esquema da montagem utilizada para a extração de óleo essencial por arraste de vapor. A - regulador de tensão, B - gerador de vapor (com ebulidor), C - balão com material vegetal, D - condensador e E - balão com o hidrolato; F - cuba com água e gelo.

3.5. Análises qualitativas

Primeiramente, utilizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD) (JORGE NETO et al., 1986/1987), realizada com uma amostra de cada tratamento. As amostras foram aplicadas em placas de vidro, sobre as quais havia fina camada de sílica gel (aproximadamente 250 μm), contendo indicador de fluorescência, que constituiu a fase estacionária. Como fase móvel, utilizou-se o sistema de solventes hexano-éter dietílico, na proporção de 2:1. Após a corrida cromatográfica, as placas foram reveladas com solução de ácido fosfomolibdico, a 3%.

Posteriormente, escolheram-se 18 amostras do óleo obtido (duas de cada tratamento e mais uma amostra do óleo das flores de cada fenótipo), para realizar a cromatografia em fase gasosa (CG). Utilizou-se um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC14A. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida, com fase estacionária SE-54, de 30 m de comprimento e diâmetro externo de 0,3 mm. Utilizou-se o hidrogênio (H_2) como gás carreador, numa vazão de 2 mL/minuto.

As temperaturas utilizadas foram 260°C para o injetor e 300°C para o detector por ionização de chama. A programação de temperaturas para realizar as análises foi: 60°C (2 minutos); 60 a 120°C (6°C/min); 120 a 290°C (15°C/min); 290°C (17 minutos), de acordo com PATITUCCI et al. (1995). Utilizou-se hexano como solvente para as amostras, que foram diluídas a 4.000 $\mu\text{g/mL}$, imediatamente antes da injeção, para evitar volatilização excessiva do solvente, o que alteraria a concentração das amostras, dificultando a comparação dos cromatogramas obtidos. Injetou-se 1 μL de amostra.

Após análise dos cromatogramas, selecionaram-se duas amostras (uma de cada fenótipo) para que se realizasse a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (ZECHINI D'AULERIO et al., 1995), utilizando-se equipamento modelo 5890 A GC com detector seletivo de massa, modelo 5970 (Hewlett-Packard). A coluna cromatográfica e as condições de

operação foram as mesmas utilizadas na CG, exceto com relação à vazão do gás de arraste, que foi reduzida para 1 mL/minuto. O modo de obtenção dos espectros de massa foi o de ionização por impacto eletrônico, com 70 eV.

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento do óleo essencial

No Quadro 3, podem-se verificar os resultados da análise de variância realizada para os dados de rendimento de óleo essencial extraído de dois fenótipos de *L. sibiricus*. Nota-se que foram significativas a diferença entre as partes da planta e a interação entre as partes e a época de coleta. Não se observou diferença de rendimento entre os dois fenótipos analisados.

Pela análise do Quadro 4, verifica-se que a fração folhas+inflorescências produziu mais óleo que os caules, independente da época de coleta. Devido ao fato de as estruturas anatômicas responsáveis pela produção do óleo essencial em *L. sibiricus* se localizarem na superfície epidérmica, conforme observações realizadas anteriormente neste trabalho e por MOREIRA FILHO (1956), é de se esperar tal comportamento, pois a quantidade de superfície epidérmica presente por unidade de volume é menor para caules do que para folhas+inflorescências, isto é, os caules possuem menor superfície específica que as folhas+inflorescências.

A observação de produtividades diferenciadas do óleo essencial, de acordo com o órgão da planta colhido, já foi realizada para diversas espécies, como em *Ocimum selloi*, na qual MARTINS (1996) verificou que a produção de

Quadro 3 - Resumo da análise de variância para o conteúdo de óleo essencial extraído da matéria seca de duas partes da planta, em dois fenótipos de *Leonurus sibiricus* L., coletados em duas épocas, em Viçosa-MG

FV	GL	Quadrados Médios
		Conteúdo de Óleo Essencial
Blocos	5	0,0018
Partes (P)	1	0,7460**
Épocas (E)	1	0,0001
P x E	1	0,0310**
Fenótipos (F)	1	0,0006
F x E	1	0,0004
F x P	1	0,0001
F x P x E	1	0,0016
Resíduo	35	0,0020
CV (%)		17,57

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

Quadro 4 - Valores médios do conteúdo de óleo essencial, em porcentagem, extraído da matéria seca de duas partes da planta de *Leonurus sibiricus* L. em duas épocas de coleta, realizada em Viçosa, MG

Partes	Épocas	
	Início de Floração	Plena Floração
Folhas+Inflorescências	0,35 a B	0,40 a A
Caules	0,15 b A	0,10 b B

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

óleo é maior em sumidades floridas do que em folhas+caules jovens, variando ainda de acordo com o horário em que a coleta foi realizada. DUDAI et al. (1988) verificaram que os cálices de flores de *Majorana syriaca* produzem quase duas vezes mais óleo essencial que as corolas ou folhas.

A existência de diferença no rendimento de óleo entre as partes da planta e a época de coleta, aliada ao fato de não haver distinção entre as coletas, pode ser um indicativo de que na época de plena floração as plantas realoquem uma parte do óleo essencial existente nos caules para as sumidades floridas, o que estaria dentro das expectativas, uma vez que, ao se comportar dessa forma, uma planta anual, como é o caso de *L. sibiricus*, estaria favorecendo sua perpetuação, levando em consideração que algumas das funções dos óleos essenciais seriam a de proteção contra herbívoros e a atração de insetos polinizadores (TAIZ e ZEIGER, 1991), fatos desejáveis que ocorram nos órgãos reprodutivos.

O fato de que à época da plena floração a planta esteja mais velha e rija, isto é, com seus tecidos de sustentação já bem formados, que no caso de *L. sibiricus* é o colênquima, de ocorrência mais abundante nos caules (CUTTER, 1986), talvez torne a presença protetora dos óleos essenciais nesses órgãos menos necessária, uma vez que herbívoros têm, normalmente, preferência por tecidos mais jovens e tenros, como botões florais e folhas novas.

Em gêneros como *Melissa* e *Mentha*, existem recomendações sobre a colheita das plantas com finalidade de extração de seus óleos essenciais em épocas próximas ou na própria floração (CORREA JÚNIOR et al., 1991), pois é a época em que as plantas produzem maior quantidade de princípios ativos. Para *L. sibiricus*, essa recomendação seria válida, por exemplo, para que no processo de colheita a atenção se voltasse mais para uma parte da planta (folhas+inflorescências) do que para outra (caules), visando maior eficiência da operação.

O estudo da influência de fatores que levam à variações na produção de metabólitos secundários de interesse é uma preocupação constante em trabalhos realizados com plantas medicinais, pois com os conhecimentos gerados pode-se

maximizar a produção dos fármacos, melhorando a qualidade das drogas sem, no entanto, acarretar custos adicionais ao processo produtivo. Para BROWN JR, (1988), deve ser possível utilizar o conhecimento dos fatores que influenciam a variação de plantas medicinais para fazer com que essas plantas produzam as substâncias ou misturas de atividade benéfica mais consistentemente, em maiores quantidades, mais acessíveis e mais fáceis de extrair, padronizar e utilizar.

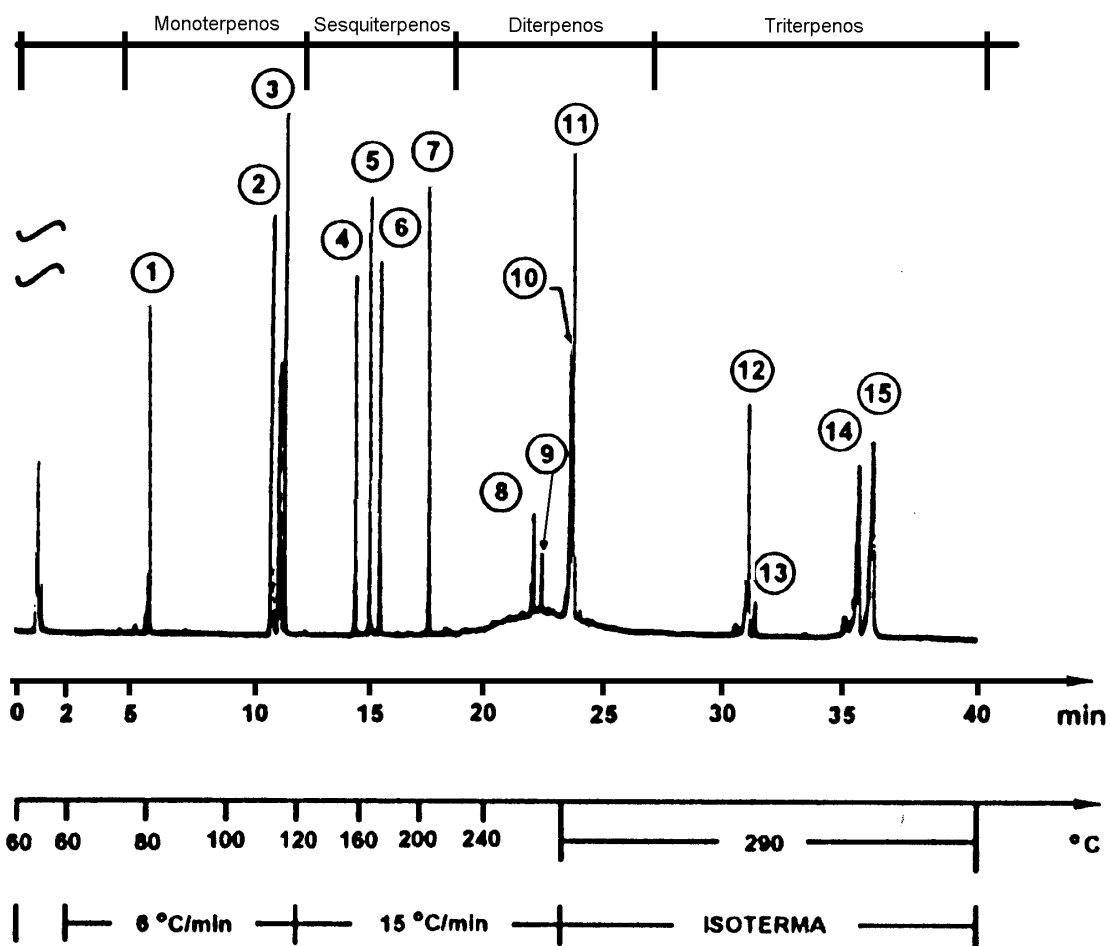
4.2. Análise qualitativa

A observação das placas de CCD indicou que o óleo essencial dos dois fenótipos seria uma mistura complexa de diversos compostos, realizando-se em seguida as análises por cromatografia em fase gasosa.

De acordo com trabalho realizado por PATITUCCI et al. (1995), ao utilizar coluna cromatográfica e condições de operação específicas, é possível a separação de compostos terpênicos que existam num extrato vegetal, agrupando-os em classes, conforme o tempo de retenção apresentado pelos mono, sesqui, di e triterpenos presentes no extrato. A injeção de padrões mono-funcionalizados dessas classes de terpenos (Figura 6) permitiu a determinação dos tempos de retenção para cada uma, que foram: monoterpenos - 4 a 12 minutos; sesquiterpenos - 12 a 19 minutos; diterpenos - 19 a 27 minutos; e triterpenos - 27 a 42 minutos (Figura 5).

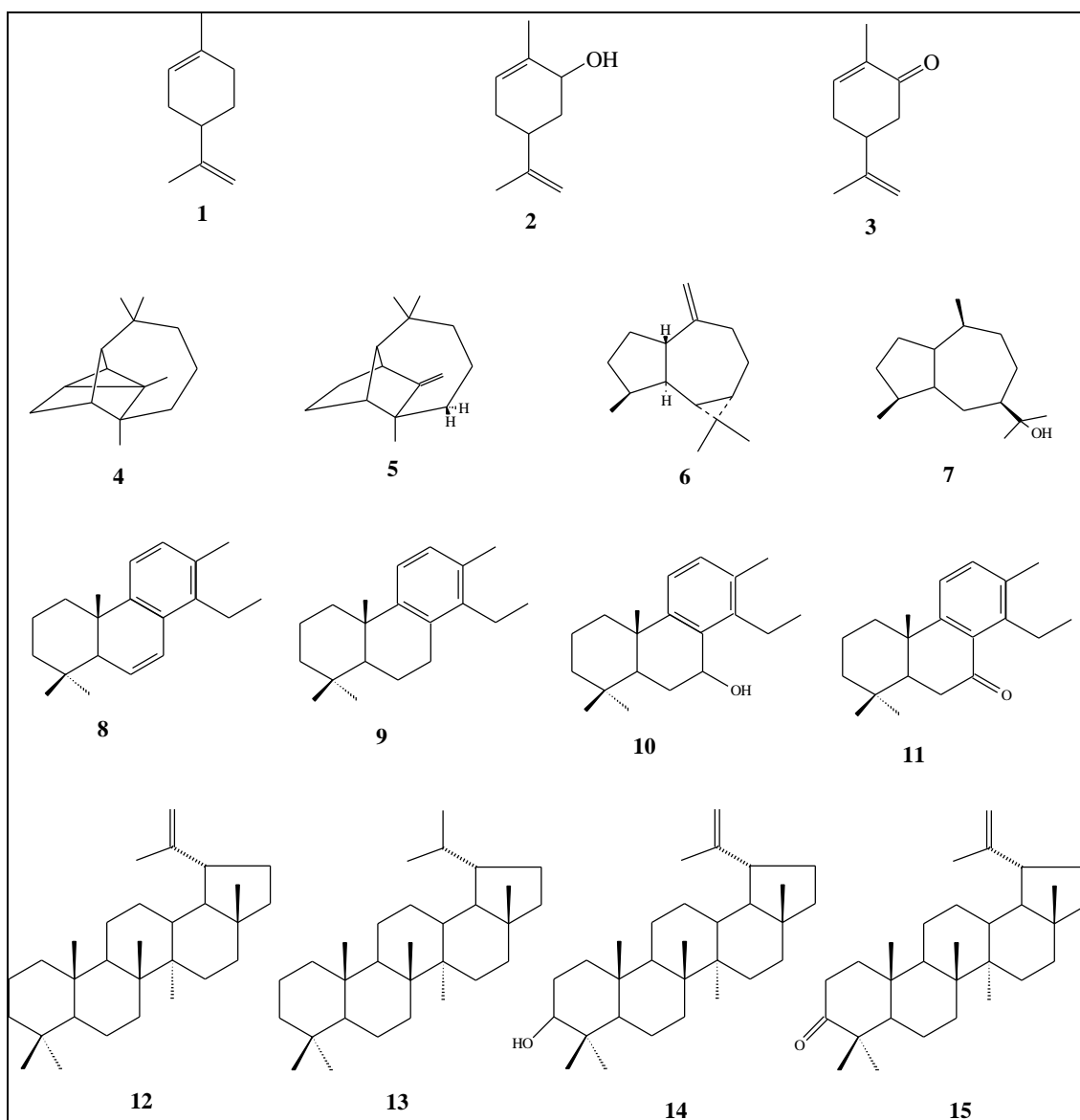
Utilizando a mesma metodologia e coluna cromatográfica, pode-se notar que o óleo essencial de *L. sibiricus* é uma mistura altamente complexa, constituída basicamente por compostos sesquiterpênicos e diterpênicos (Figuras de 7 a 10). PATITUCCI et al. (1995), também obtiveram cromatograma com picos nas regiões de sesquiterpenos e diterpenos, ao analisar amostra de óleo de copaíba comercial, cuja composição química já foi determinada como sendo realmente de sesqui e diterpenos (Ferrari et al., e Arrenius et al., citados por PATITUCCI et al., 1995).

Não se observou diferença entre os cromatogramas obtidos de amostras dos diversos tratamentos, podendo-se dizer que o óleo essencial originado de plantas com flores brancas e roxas, coletadas no início ou plena floração e



Fonte: Retirado de PATITUCCI et al. (1995).

Figura 5 - Cromatograma (CGAR) da mistura de padrões terpênicos (fase estacionária SE-54).



Fonte: PATITUCCI et al. (1995).

Figura 6 - Estruturas de padrões terpênicos monofuncionalizados. De 1 a 3 - monoterpenos, de 4 a 7 - sesquiterpenos, de 8 a 11 - diterpenos e 12 a 15 - triterpenos.

extraído de caules ou de folhas+inflorescências, não variou quanto à sua composição, existindo, contudo, diferenças na concentração dos compostos entre as amostras, o que foi observado pela diferença que há entre as áreas de picos com mesmo tempo de retenção. As Figuras 7 e 8 mostram cromatogramas representativos do óleo extraído de folhas+inflorescências dos dois fenótipos de *L. sibiricus*.

Podem-se observar, nas Figuras 9 e 10, cromatogramas obtidos de amostras provenientes de óleo extraído de caules dos dois fenótipos e nota-se que existe uma predominância de picos na região dos diterpenos, o que leva a crer que nesse órgão haja maior acúmulo de compostos dessa natureza, sem que, no entanto, os compostos sesquiterpênicos estejam ausentes.

De acordo com WATERMAN (1993), os diterpenos são constituintes minoritários em óleos essenciais. GUENTER e ALTHAUSEN (1975) relataram que é rara a ocorrência desta categoria de compostos em amostras obtidas por arrastamento de vapor, em virtude da sua baixa pressão de vapor e do seu alto peso molecular.

Diversos autores citam espécies do gênero *Leonurus*, inclusive *L. sibiricus*, como produtoras de diterpenos, mas cuja extração foi realizada com a utilização de solventes orgânicos (Me_2CO), com ou sem refluxo (SAVONA et al., 1982; MALAKOV et al., 1985; HON et al., 1991, 1993). A presença de picos na região de diterpenos nos cromatogramas de todas as amostras fornece uma forte evidência de que realmente existam compostos diterpênicos no óleo essencial extraído, principalmente nas amostras provenientes de caules, embora o processo de extração utilizado tenha sido o arrastamento por vapor d'água.

Pela análise dos espectros obtidos pela CG-EM e comparação com os existentes no banco de dados do equipamento, puderam ser identificados três compostos, todos sesquiterpênicos (Figura 11), e ser determinados o tempo de retenção e a massa molecular de cinco outros compostos, não-identificados pela comparação realizada (Quadro 5). Apesar de não ter sido possível identificar os compostos indicados pelos picos de 4 a 8 do Quadro 5, a análise dos tempos de retenção e da massa molecular indicou que esses compostos seriam sesqui (nº 4) e diterpenos (nº 5 a 8) (PATITUCCI et al., 1995).

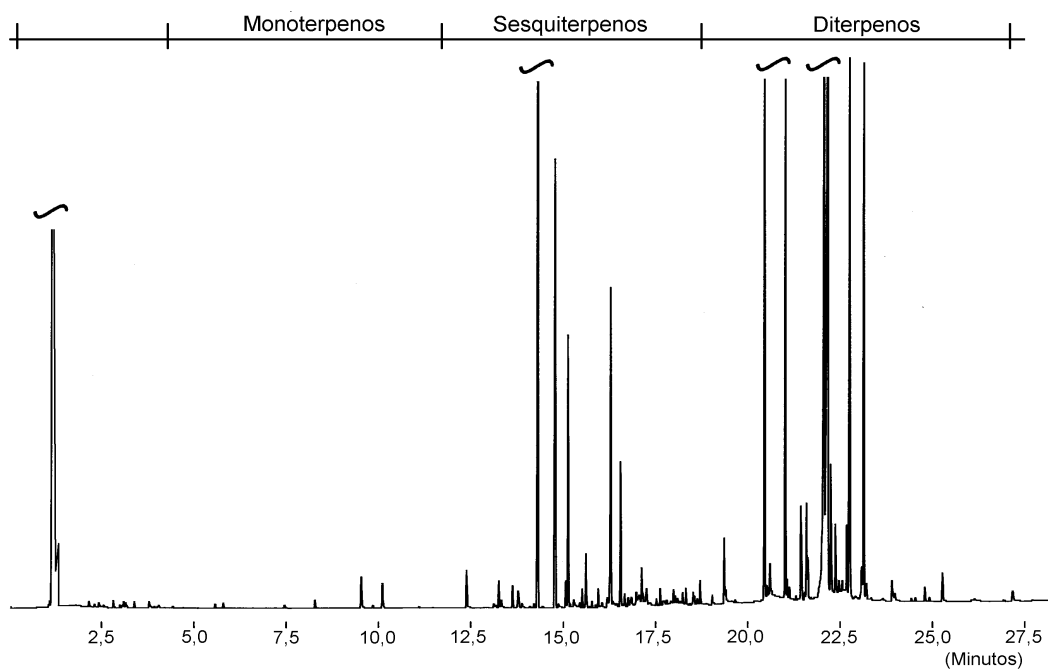


Figura 7 - Cromatograma do óleo essencial extraído de folhas+inflorescências de plantas do fenótipo de flores roxas de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa-MG (coluna com fase estacionária SE-54).

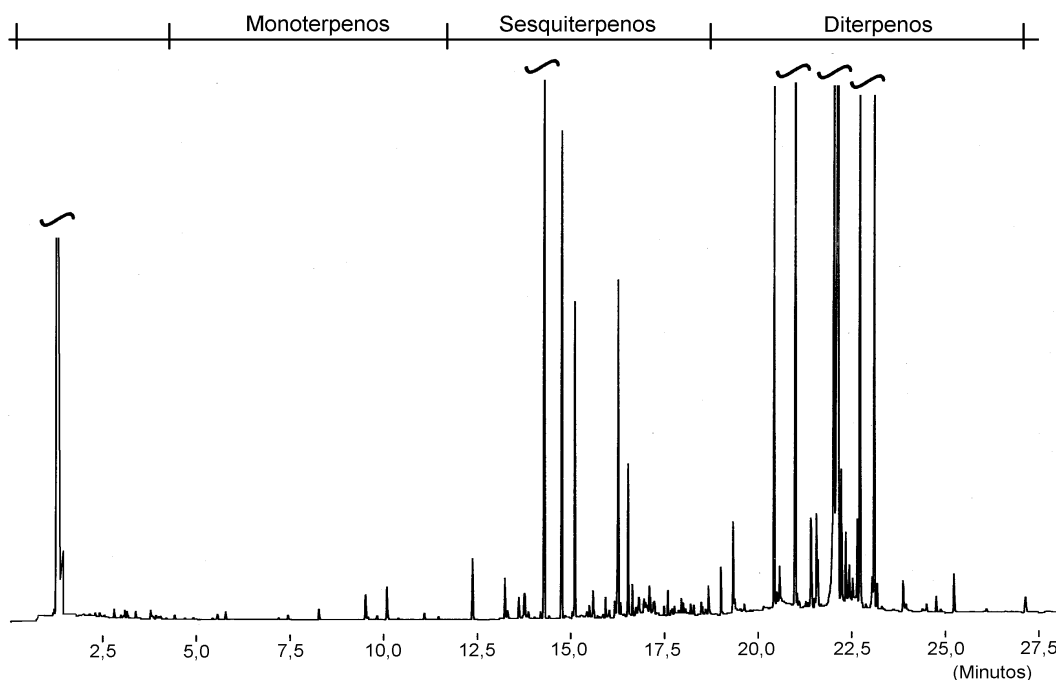


Figura 8 - Cromatograma do óleo essencial extraído de folhas+inflorescências de plantas do fenótipo de flores brancas de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa-MG (coluna com fase estacionária SE-54).

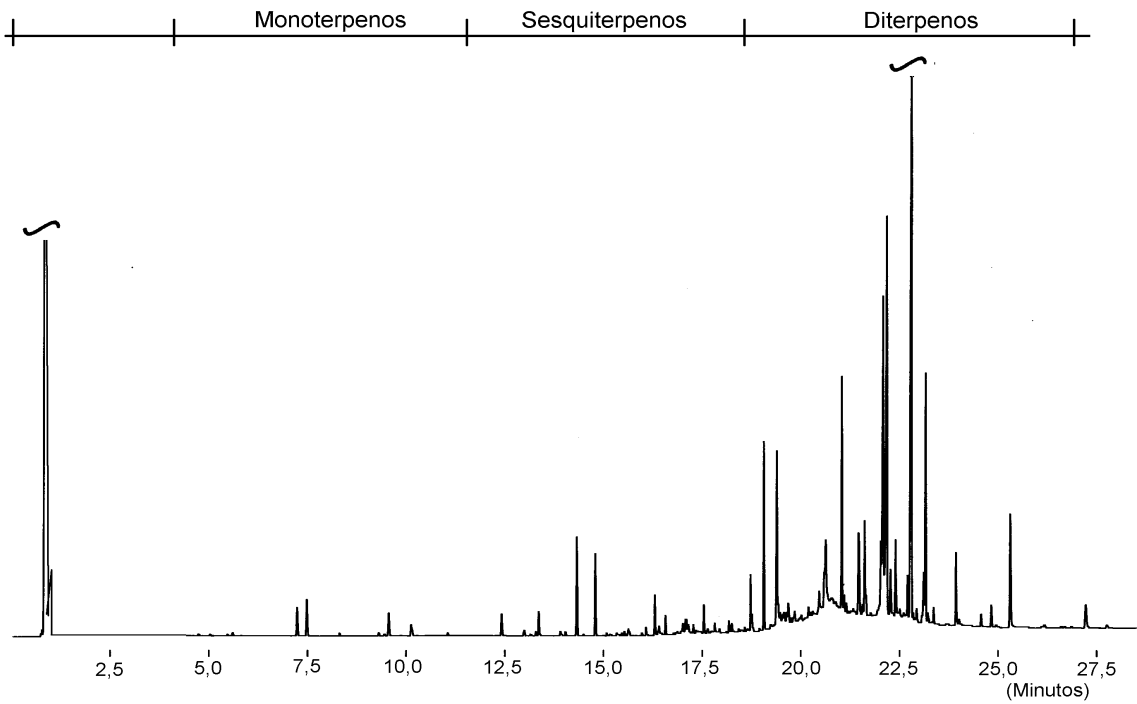


Figura 9 - Cromatograma do óleo essencial extraído de caules de plantas do fenótipo de flores roxas de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa-MG (coluna com fase estacionária SE-54).

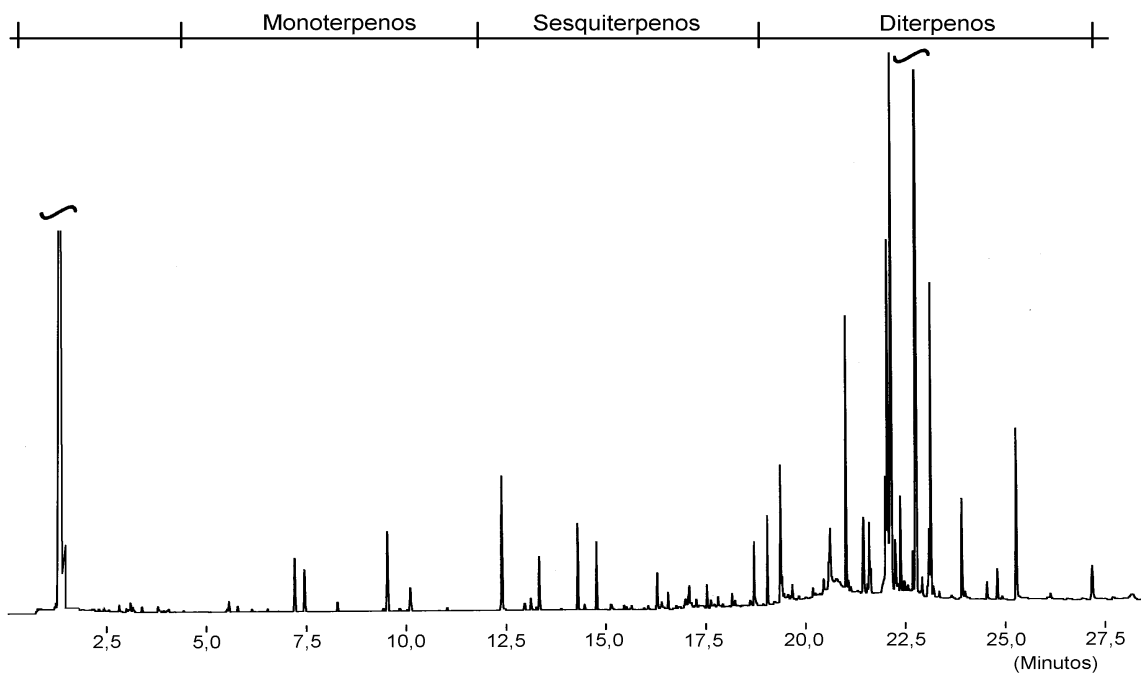


Figura 10 - Cromatograma do óleo essencial extraído de caules de plantas do fenótipo de flores brancas de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa-MG (coluna com fase estacionária SE-54).

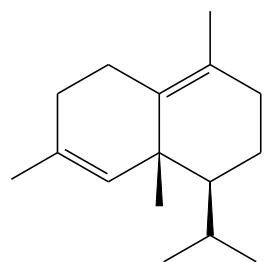
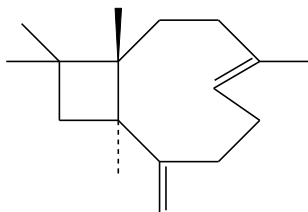
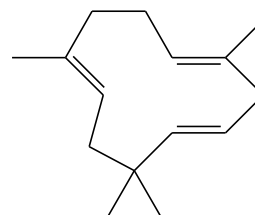
a) *trans*-cariofilenob) α -humulenoc) δ -cadineno

Figura 11 - Estruturas dos compostos identificados no óleo essencial de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa-MG

Quadro 5 - Constituintes do óleo essencial extraído de folhas+inflorescências de plantas do fenótipo de flores brancas de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa, MG, determinados por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa

Pico	Componente	Massa Molecular	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
1	<i>trans</i> -cariofileno	204	16,26	10,14
2	α -humuleno	204	16,62	9,09
3	δ -cadineno	204	17,25	4,27
4	S.N.I.*	220	18,12	8,65
5	D.N.I.**	286	21,65	t
6	D.N.I.	316	22,09	11,59
7	D.N.I.	318	22,50	5,99
8	D.N.I.	376	23,68	3,16

* Sesquiterpeno não-identificado.

** Diterpeno não-identificado.

t - teores traço.

Os sesquiterpenos identificados são de ampla ocorrência no reino vegetal, sendo o cadineno o mais citado por GUENTHER e ALTHAUSEN (1975), ocorrendo em gêneros como *Citrus*, *Ocimum* e *Lavandula*, que possuem grande importância econômica. JORGE NETO et al. (1987), identificaram o cariofileno em duas espécies do gênero *Senecio* (Asteraceae).

Nas Figuras 12 e 13, podem-se observar o cromatograma obtido na CG-EM e os espectros de massa dos compostos identificados, respectivamente.

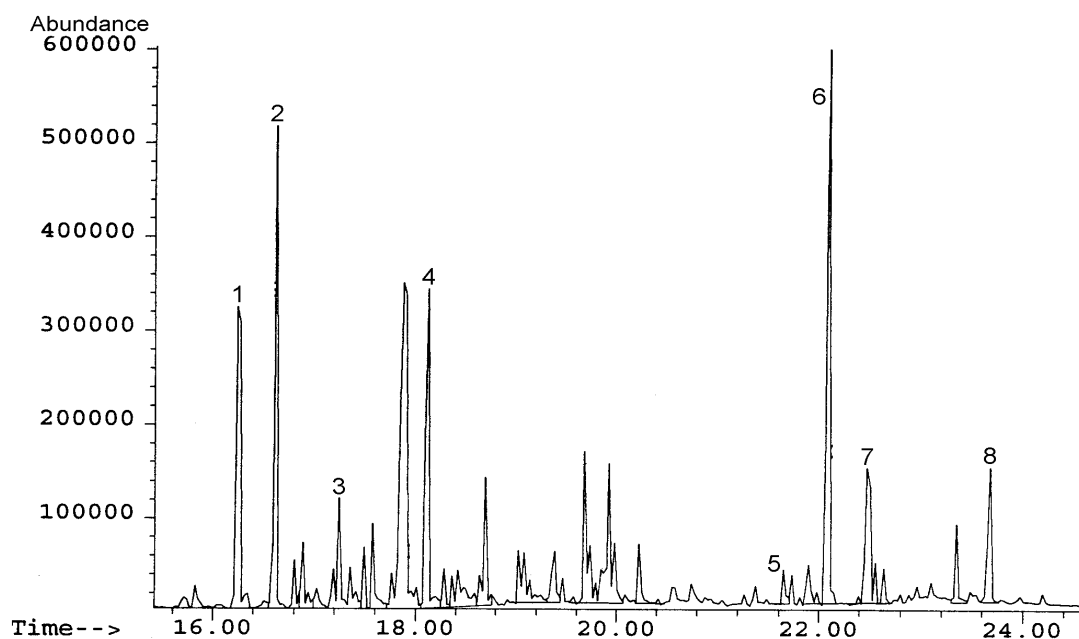


Figura 12 - Cromatograma de óleo essencial extraído de folhas+inflorescências de plantas do fenótipo de flores brancas de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa-MG, obtido em CG-EM (coluna com fase estacionária SE-54).

Embora tenha sido obtida uma alta correlação entre os espectros dos compostos presentes no óleo essencial de *Leonurus sibiricus* com os existentes no banco de dados do espectrômetro de massa (99 % para *trans*-cariofileno e 97% para α -humuleno e δ -cadineno), para que se pudesse ter maior segurança desta identificação seria necessário o cálculo do índice de retenção relativo, ou também chamado de índice de Kovats, obtido a partir da comparação de

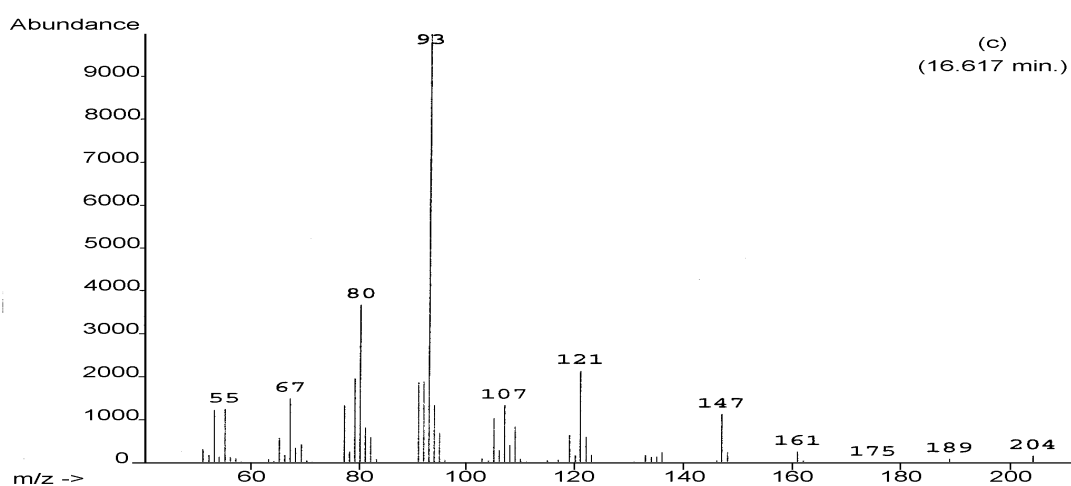
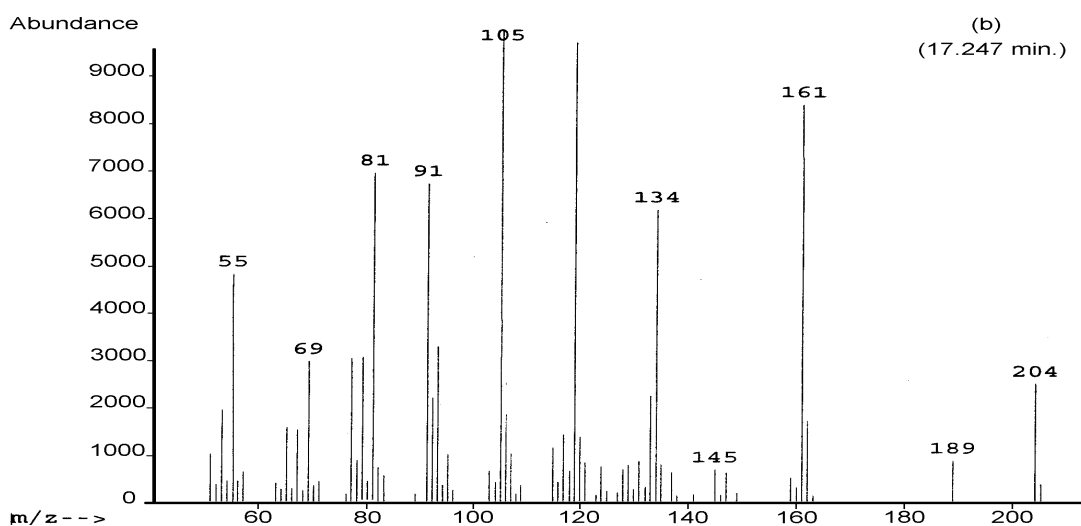
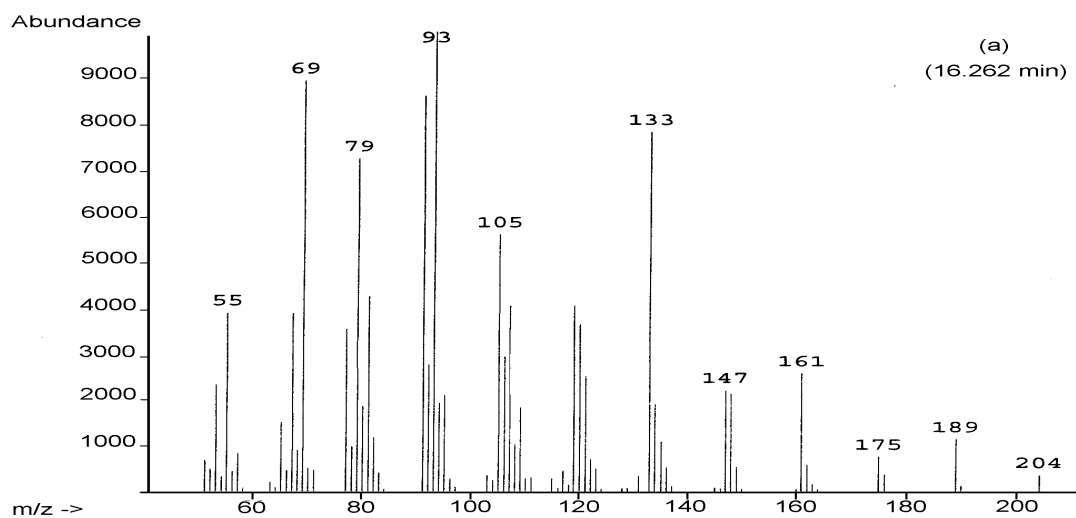


Figura 13 - Espectros de massa de componentes sesquiterpênicos identificados no óleo essencial de *Leonurus sibiricus* L., cultivado em Viçosa-MG. (a) - *Trans*-cariofileno, (b) - α -humuleno e (c) - δ -cadineno

cromatograma da injeção de padrões de hidrocarbonetos, realizada nas mesmas condições da amostra. Isto eliminaria as dúvidas, que são originadas do fato de que terpenos diferentes podem apresentar espectros de massa semelhantes.

Tendo sido este o primeiro trabalho realizado para determinar a configuração química do óleo essencial de macaé, apenas três compostos puderam ser identificados, havendo, portanto, a necessidade de que se realizem mais trabalhos, para que se possa identificar um número maior desses compostos, uma vez que todas as análises cromatográficas realizadas indicaram que este óleo é constituído de dezenas de componentes.

5. CONCLUSÕES

Não foram observadas diferenças de rendimento ou composição entre os óleos essenciais extraídos de folhas+inflorescências e caules de *Leonurus sibiricus* L. de flores roxas e de flores brancas.

Existem evidências de que, na época da plena floração, uma parte do óleo essencial presente nos caules seja realocada para as partes reprodutivas da planta.

Verificou-se que o óleo essencial de *Leonurus sibiricus* L. é uma mistura complexa, formada principalmente de compostos sesquiterpênicos e diterpênicos.

CAPÍTULO 3

EFEITO DE LUZ, TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MACAÉ (*Leonurus sibiricus* L.)

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da influência de fatores como luz e temperatura sobre a germinação de sementes é importante para que sejam conseguidas maior rapidez e uniformidade nos testes de germinação, bem como a padronização dos resultados obtidos, além da obtenção de informações sobre o comportamento reprodutivo da espécie, como a existência de dormência e o tempo de germinação, dentre outras.

A falta de informações a respeito do comportamento das sementes de *Leonurus sibiricus* L., planta medicinal largamente utilizada pela população, vulgarmente conhecida como “macaé”, em relação aos fatores mencionados, motivou o presente trabalho, que teve por objetivo determinar o efeito da luz e da temperatura sobre a germinação de sementes de dois fenótipos (flores brancas e flores roxas), encontrados no campus da UFV, submetidas a crescentes tempos de armazenamento. Para isto, foram realizados testes de germinação, nos quais se variaram as condições de luz e temperatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Germinação

2.1.1. Efeito da temperatura

A temperatura exerce ação importante tanto na germinação total das sementes, quanto na velocidade e uniformidade do processo, pois influencia a velocidade de absorção da água na embebição e as reações bioquímicas que ocorrem durante este período (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988). Vários trabalhos foram realizados nesse sentido, com plantas silvestres e cultivadas, e os resultados mostram uma grande diversidade de respostas quanto à temperatura ótima de germinação, ou seja, a temperatura na qual ocorre a maior germinação total, na maior velocidade.

NÓBREGA et al. (1995) observaram que sementes de camomila (*Matricaria recutita*) germinam melhor à temperatura de 15°C. Para mamona (*Ricinus communis*), CARNEIRO e PIRES (1983) obtiveram maior germinação das sementes à temperatura de 30°C, independente do substrato utilizado, temperatura esta que também proporcionou maior germinação para *Solanum viarum*, uma espécie invasora do sul da Flórida, conforme verificado por AKANDA et al. (1996). GARCIA (1987) verificou que a temperatura alternada

de 20-30°C favorece a maior e mais rápida germinação de aquênios de picão (*Bidens pilosa*). Para sementes de cedro (*Cedrella odorata*), a temperatura alternada de 20-30 °C promoveu maior germinação total, mas com velocidade baixa (ANDRADE e PEREIRA, 1994). Pode-se notar que não apenas a temperatura, mas também o modo de fornecê-la as sementes (constante ou alternada), influencia a germinação. Segundo MAYER e POLJAKOFF-MAYBER (1975), o efeito da temperatura pode variar muito, de acordo com a espécie.

2.2. Dormência

A presença de dormência (natural ou induzida) mais acentuada é uma característica comum em plantas consideradas invasoras de culturas (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975; TAMASHIRO e LEITÃO FILHO, 1978), como é o caso do macaé, pois essas plantas ainda não foram submetidas a um trabalho de melhoramento genético. Segundo CARVALHO e NAKAGAWA (1988), a dormência possui uma função ecológica importante, ligada à perpetuação de genótipos favoráveis através do tempo. BURROWS (1996) observou que as sementes das espécies *Melicope simplex*, *Myoporum laetum*, *Myrsine divaricata* e *Urtica ferox* germinam paulatinamente, demorando até cinco anos para que um lote de sementes alcance 60% de germinação.

A existência de dormência em sementes é atribuída a três sistemas, que funcionariam integrados às diversas estruturas das sementes e a agentes ambientais. Estes sistemas, de acordo com CARVALHO e NAKAGAWA (1988) são:

- sistema de controle de entrada de água no interior das sementes - impede que água penetre nas sementes, mesmo que estejam em condições ideais de germinação. De acordo com ROLSTON (1978), este sistema é mais freqüente em plantas das famílias Fabaceae, Cannaceae, Chenopodiaceae, Convallariaceae, Convolvulaceae, Geraniaceae, Malvaceae, Solanaceae, Anacardiaceae e Rhamnaceae. Ocorre, geralmente, pela presença de substâncias cerosas na casca

e pode ser vencido por escarificação física ou química desta. KHAN (1977) citou que pode ocorrer impermeabilidade ao oxigênio em certas espécies, como em *Avena fatua*, e em sementes dimórficas de *Xanthium pennsylvanicum*;

- sistema de controle do eixo embrionário - caracteriza-se pelo fato de que à época da maturação das sementes o embrião ainda não está completamente formado, o que impede que as sementes germinem normalmente até que aquele complete o seu desenvolvimento. É um sistema mais comumente encontrado em plantas parasitas; e

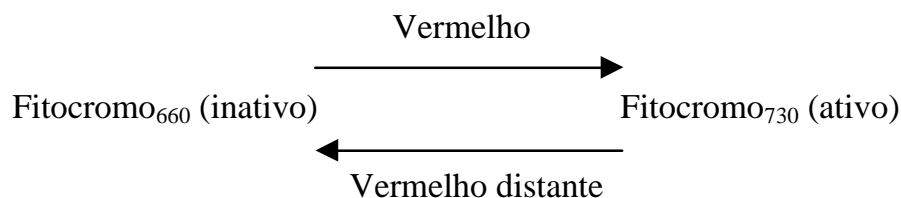
- sistema de controle do equilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras de crescimento - provavelmente é o sistema mais complexo, o qual engloba diversos subsistemas, quais sejam: sensível à luz, ao oxigênio e, ou, CO₂, ao etileno, à temperatura, à umidade e a substâncias receptoras de hidrogênio ou elétrons. Estes subsistemas podem agir individualmente ou em combinações.

2.2.1. Efeito da luz

A luz é um importante agente de quebra de dormência de sementes (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975), ao qual as espécies cujas sementes possuam esta característica podem ou não responder, de acordo com o mecanismo de dormência que possuam (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988). THANOS e DOUSSI (1995) observaram a existência desse mecanismo de dormência, que é controlado pelo sistema de fitocromos (TOOLE, 1973; Mayer e POLJAKOFF-MAYBER, 1975) em *Sideritis syriaca* (Lamiaceae), planta medicinal das montanhas de Creta, e que, portanto, depende da luz para sua germinação. Algumas espécies do gênero *Ocimum*, também da família Lamiaceae, apresentam o mesmo mecanismo de dormência.

Para certas espécies vegetais, o efeito da luz pode se dar também como inibidor da germinação, que ocorreria após exposição das sementes a um alto fluxo de luminosidade (GRIME et al., 1981).

CRESSWELL e GRIME (1981) sugerem que a exigência de luz para que a germinação de sementes de algumas espécies vegetais aconteça pode estar relacionada à exposição da planta-mãe, durante o seu crescimento, a determinado tipo de luz. Assim, as sementes originadas de plantas expostas à luz de um comprimento de onda de 730 nm (vermelho distante) teriam o seu sistema fitocromo na forma inativa, necessitando, portanto, de luz para ativá-lo, permitindo a germinação. Por outro lado, sementes produzidas por plantas expostas à luz em que o comprimento de onda predominante seja o de 660 nm (vermelho) possuem o sistema fitocromo na forma ativa, não necessitando de luz para sua germinação. A interconversão dessas duas formas de fitocromos tem a seguinte representação esquemática (TOOLE, 1973):



A associação entre luz e temperaturas alternadas pode ser necessária para promover a germinação das sementes. GRIME et al. (1981) observaram esse fenômeno em 65 de um total de 403 espécies que ocorrem espontaneamente na Inglaterra.

2.2.2. Armazenamento

O tempo de armazenamento é um fator que influencia a germinação de muitas espécies que produzem sementes com dormência primária, pois este tipo de dormência pode ocorrer ou em virtude da presença de compostos químicos que inibem a germinação, que com o passar do tempo são naturalmente degradados, ou do desenvolvimento incompleto do embrião após a maturação, característica esta mais comum em plantas epífitas e parasitas. Em ambos os casos, é necessário um período variável de armazenamento após a colheita das

sementes, no qual irão ocorrer as devidas transformações, físicas ou químicas, que permitirão a posterior germinação das sementes (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975). Para sementes que possuem embrião com desenvolvimento incompleto, é necessário que haja umidade durante o armazenamento.

KU et al. (1996) verificaram que sementes de espécies invasoras como *Equinochloa crus-galli*, *Cyperus serotinus* e *Bidens tripartita* apresentaram germinação de 10 a 30%, após 30 dias de armazenamento, enquanto sementes de *Scirpus juncooides*, *Potamogeton distinctus* e *Monochoria vaginalis* não germinaram até 120 dias após a coleta. GRIME et al. (1981) relataram que um grande número de espécies do sul da Inglaterra têm a germinação de suas sementes elevada após um período de armazenamento, destacando que as sementes de pequeno porte se sobressaem neste aspecto, citando, ainda, que a taxa de germinação das espécies estudadas diminui com o aumento do peso das sementes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das sementes

As sementes utilizadas no experimento foram colhidas de dez plantas cultivadas de cada fenótipo, em novembro de 1996. Foi feito beneficiamento manual das sementes, que foram, em seguida, acondicionadas em sacos de papel, separados para cada fenótipo e época de armazenamento, mantidos em local fresco, seco e ao abrigo da luz. Procedeu-se, então, aos testes descritos a seguir, realizados logo após a colheita (época 0), com 30 e 60 dias de armazenamento.

3.2. Realização dos testes

Para a realização dos testes de germinação, 50 sementes por repetição foram colocadas em caixas Gerbox sobre duas folhas de papel Germitest previamente esterilizado (estufa à 120 °C por 2 horas) e umedecido com água destilada até a saturação.

Os tratamentos constituíram-se de duas temperaturas (20-30 e 25 °C), ausência e presença de luz e os dois fenótipos (flores brancas e flores roxas), num esquema fatorial 2 x 2 x 2, com quatro repetições, totalizando 32 parcelas para cada teste, no delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada unidade

experimental constituiu de uma caixa Gerbox, contendo 50 sementes.

Realizaram-se três testes para avaliar a qualidade das sementes, sendo um após cada período de armazenamento.

Nos tratamentos sob ausência de luz, os Gerbox foram completamente envolvidos em camada dupla de papel alumínio. Todos os testes foram conduzidos em germinadores com luz suplementar. Diariamente, os Gerbox foram trocados de posição dentro dos germinadores, com o intuito de uniformizar o máximo possível as condições do teste.

As contagens de plântulas normais, anormais e de sementes mortas foram feitas diariamente, sendo iniciadas aos sete e encerradas 21 dias após o início dos testes. Nos tratamentos submetidos à ausência de luz, as contagens foram realizadas em sala completamente fechada, sob luz verde de segurança (Kendrick e Frankland, citados por TAKAKI, 1992).

A porcentagem de germinação (G) foi calculada a partir do total de plântulas normais obtidas. Com os dados de número de plântulas normais germinadas por dia, calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG), utilizando a seguinte fórmula (NAKAGAWA, 1994):

$$IVG = \frac{E1}{N1} + \frac{E2}{N2} + \dots + \frac{En}{Nn}$$

em que

E1, E2 e En = número de plântulas normais contadas na 1^a, 2^a e enésima contagem; e

N1, N2 e Nn = número de dias após o início do teste, nos quais se realizou a 1^a e 2^a, enésima contagem.

A análise de variância foi realizada para G e IVG, excluindo-se o fator luz, para o qual se utilizou apenas estatística descritiva (Quadro 1), em virtude do efeito drástico causado por este fator.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Numa primeira análise, observou-se o efeito drástico do fator luz sobre G e IVG, nas sementes dos dois fenótipos (Quadro 1). Verificou-se que os tratamentos com ausência de luz não foram eficientes em promover a germinação, independente da temperatura utilizada. No entanto, no experimento realizado com sementes armazenadas por 60 dias, pôde-se observar que no tratamento em que se utilizou temperatura alternada de 20-30°C, houve germinação, mesmo em condição de ausência de luz, que, ainda assim, ocorreu numa porcentagem baixa (32 % para as sementes do fenótipo branco e 24 % para o fenótipo roxo). Isto indica que após esse tempo de armazenamento o estímulo dado pela alternância de temperatura seria o suficiente para desencadear o processo de germinação, não havendo mais necessidade da luz, provavelmente em virtude da diminuição de intensidade da dormência.

A germinação das sementes iniciou-se aos sete e nove dias e encerrou-se aos 19 e 20 dias após o início dos testes, para os tratamentos a 20-30°C e 25°C, respectivamente.

O comportamento de IVG, de modo geral, foi bastante parecido com G, ou seja, onde houve maior germinação total de sementes, a velocidade de germinação também foi maior, exceto no teste realizado com sementes de 60 dias. Nesse não houve diferença significativa de IVG entre todos os tratamentos

Quadro 1 - Valores médios de porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação em sementes recém-colhidas (0), com 30 e 60 dias de armazenamento, de dois fenótipos (flores brancas e roxas) de *Leonurus sibiricus* L., em Viçosa, MG

Tratamentos	Germinação (%)					
	Brancas			Roxas		
	0	30	60	0	30	60
Com luz, 25°C	1	26	84	0	36	88
Com luz, 20-30°C	69	90	79	75	87	80
Sem luz, 25°C	0	0	2	0	0	2
Sem luz, 20-30°C	1	1	32	0	0	24
	Índice de Velocidade de Germinação					
	Brancas			Roxas		
	0	30	60	0	30	60
Com luz, 25°C	0,06	1,32	5,15	0	1,96	5,09
Com luz, 20-30°C	2,64	4,64	5,00	3,22	4,59	5,33
Sem luz, 25°C	0	0	0,09	0	0	0,09
Sem luz, 20-30°C	0,02	0,09	1,79	0	0	1,33

com luz, independente da temperatura utilizada e do fenótipo, e para G houve separação entre os tratamentos com luz, dependendo da temperatura, mas não dos fenótipos (Quadro 4).

A análise de variância foi realizada, eliminando-se os resultados dos tratamentos sem luz, visando avaliar a influência do tempo de armazenamento e da temperatura sobre G e IVG das sementes dos dois fenótipos. No Quadro 2, pode-se observar que a temperatura, o tempo de armazenamento e os fenótipos interagiram entre si, afetando significativamente G e IVG.

Na temperatura de 25 °C, a germinação e a velocidade desta aumentaram gradativamente, à medida que se elevou o tempo de armazenamento, atingindo valores máximos para as sementes armazenadas por 60 dias. Nas sementes armazenadas por 30 dias e recém-colhidas, a germinação ocorreu, embora em pequena porcentagem (Quadro 3). Nota-se, também, que na temperatura de 20-30°C as variáveis alcançaram o valor máximo com sementes armazenadas por 30 dias, significando que após esse período de armazenamento, a temperatura de 20-30°C foi o suficiente para promover a quebra da dormência. Para sementes com 60 dias, a temperatura de 20-30°C não foi adequada para se obter a máxima germinação, deduzindo-se que o choque térmico não foi benéfico para sementes mais velhas.

Esses fatos podem estar indicando que a planta produziu uma pequena porcentagem de sementes com uma intensidade de dormência mais baixa, que pôde ser quebrada em condições ideais de luz e temperatura (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975). Estas sementes teriam, portanto, capacidade de germinar imediatamente após a maturação, desde que houvesse as condições necessárias. Depois desse período, a perda da dormência das sementes restantes do lote ocorreria gradativamente, distribuindo-se no tempo, estratégia esta utilizada com frequência pelas plantas para sua perpetuação (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988), especialmente pelas plantas invasoras, as quais não sofreram melhoramento genético.

Segundo CARVALHO e NAKAGAWA (1988), a dormência é um mecanismo complexo, pois sua ocorrência depende de vários fatores. Um deles

Quadro 2 - Resumo da análise de variância para porcentagem total de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de *Leonurus sibiricus* colhidas em Viçosa-MG

FV	GL	Quadrados Médios	
		% de Germinação	Índice de Velocidade de Germinação
Armazenamento (A)	2	8649,3333**	53,9965**
Fenótipo (F)	1	102,0833**	0,6517**
F x A	1	2,3333	0,0309
Temperatura (T)	1	19764,0800**	46,9716**
T x A	1	6917,3333**	11,2510**
T x F	1	24,0833	0,0332
T x A x F	2	90,3333**	0,4833**
Resíduo	36	11,9166	0,0507

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

seria genético, isto é, a habilidade natural que a planta possuiria em responder aos estímulos do meio. Os outros seriam os fatores do próprio meio, os quais podem ocorrer numa combinação muito grande, em diferentes etapas do desenvolvimento das sementes, e que nesse caso foram chamados pelos autores de “combinações ecológicas”, que poderiam determinar comportamentos diferentes entre sementes produzidas pela mesma planta em ciclos distintos, e até mesmo entre sementes de uma mesma planta produzidas num mesmo ciclo. Sendo o macaé uma espécie que provavelmente possui uma base genética bastante extensa, pois não foi alvo de nenhum trabalho de seleção artificial, é de se esperar que haja uma variedade maior de respostas da planta às condições do meio, ou seja, às “combinações ecológicas”.

Pelo Quadro 4, pode-se perceber que houve diferença significativa para a variação de temperatura na variável G em todos os tempos de armazenamento e que em IVG essa diferença só não ocorreu para as sementes armazenadas por 60 dias. Houve diferença entre os dois fenótipos, para as duas variáveis, ora numa, ora noutra temperatura, não ocorrendo apenas em G para sementes armazenadas

Quadro 3 - Valores médios de porcentagem total de germinação e de índice de velocidade de germinação para sementes-recém colhidas (0), com 30 e 60 dias de armazenamento, de dois fenótipos (flores brancas e flores roxas) de *Leonurus sibiricus* em Viçosa-MG

Temperaturas	Armazenamento	Germinação (%)		Índice de Velocidade de Germinação	
		Branças	Roxas	Branças	Roxas
25°C	0	1 a C	0 a C	0,03 a C	0 a C
	30	26 b B	36 a B	1,32 b B	1,95 a B
	60	84 a A	88 a A	5,15 a A	5,09 a A
20-30°C	0	69 b C	75 a B	2,64 b B	3,22 a C
	30	90 a A	87 a A	4,64 a A	4,59 a B
	60	79 a B	80 a B	5,00 b A	5,33 a A

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e da mesma letra maiúscula na coluna, para porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

Quadro 4 - Valores médios de porcentagem total de germinação e de índice de velocidade de germinação para sementes recém-colhidas (0), com 30 e 60 dias de armazenamento, de dois fenótipos (flores brancas e flores roxas) de *Leonurus sibiricus*, em Viçosa-MG

Armazenamento	Temperaturas	Germinação (%)		Índice de Velocidade de Germinação	
		Branças	Roxas	Branças	Roxas
0	25°C	1 a B	0 a B	0,03 a B	0 a B
	20-30°C	69 b A	75 a A	2,64 b A	3,22 a A
30	25°C	26 b B	36 a B	1,32 b B	1,95 a B
	20-30°C	90 a A	87 a A	4,64 a A	4,59 a A
60	25°C	84 a A	88 a A	5,15 a A	5,09 a A
	20-30°C	79 a B	80 a B	5,00 b A	5,33 a A

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e da mesma letra maiúscula na coluna, para porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

por 60 dias. As sementes originadas de plantas do fenótipo de flores roxas mostraram-se com maior poder de germinação e vigor, em relação às do fenótipo branco.

As sementes, de modo geral, podem não germinar se estiverem quiescentes ou dormentes. Na quiescência, quando são fornecidas as condições necessárias de temperatura, água e oxigênio, a germinação ocorre. Na dormência, as sementes viáveis, mesmo em condições ideais, não germinam (KHAN, 1977; LABORIAU, 1983). Pode haver intensidades diferentes de dormência nas sementes produzidas por uma mesma planta, num mesmo ciclo. Sendo a dormência primária (natural), essa é caracterizada pelo fato de sempre ocorrer numa dada espécie, estando também associada à maturação das sementes. Se secundária (induzida), esta apenas aconteceria no caso de indução externa, ou seja, pela atuação de um fator externo durante a maturação, ou mesmo após esta, que provocaria a dormência. Os fatores considerados mais importantes como causadores de dormência são variações bruscas na temperatura, baixa concentração de oxigênio (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975) e baixa umidade (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988).

O fato de as sementes recém-colhidas de macaé terem apresentado valores de germinação bastante baixos, exigindo condição especial de temperatura alternada para germinarem, indica a existência de uma dormência primária, e não simplesmente quiescência. A resposta positiva à temperatura alternada pode ser considerada uma exigência do gênero *Leonurus*, pois as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) recomendam a utilização da temperatura de 20-30 °C para germinação de *L. cardiaca*. Para a espécie *L. sibiricus*, a resposta a essa temperatura alternada foi bastante positiva, tendo sido significativa para G em todos os tempos de armazenamento e para IVG só não o foi nas sementes armazenadas por 60 dias (Quadro 5). GARCIA (1987) encontrou comportamento semelhante para a espécie *Bidens pilosa*. A germinação termoperiódica permite às sementes detectar sua posição no perfil do solo, pois as flutuações diurnas de temperatura são rapidamente amortecidas em camadas mais profundas do solo (LARCHER, 1975; LABOURIAU, 1983). Esta característica é encontrada em

grande número de espécies medicinais e invasoras (BRASIL, 1992) e representa uma ferramenta bastante eficaz dessas plantas para detectarem condições propícias de germinação, que normalmente não ocorrem em grandes profundidades no solo, para a maior parte das espécies vegetais.

A sensibilidade à luz apresentada pelas sementes também funcionaria como um “sensor”, auxiliando a semente a detectar condições favoráveis do meio para que possa germinar e a plântula originada para que tenha maior probabilidade de sobreviver.

O tempo de armazenamento, tendo influenciado positivamente a germinação e a velocidade desta, ou seja, quanto maior o armazenamento, maior a germinação, fornece indícios de que as sementes de macaé apresentam dormência natural ou primária. Sobre este tipo de resposta, MAYER e POLJAKOFF-MAYBER (1975) advertem que em muitas espécies de plantas existe a necessidade de um período pós-colheita das sementes, no qual a maturação destas irá se completar, seja no término do desenvolvimento do embrião, seja alterando a composição química da semente. De acordo com Rice, citado por TAIZ e ZEIGER (1991), durante este período pós-colheita podem ser degradadas algumas substâncias inibidoras da germinação. GRIME et al. (1981), verificaram que 158 espécies apresentaram germinação inferior a 10% nas sementes recém-coletadas e 128 apresentaram germinação superior a 80%, demonstrando a grande variabilidade natural nesse aspecto.

A intensidade de dormência é controlada geneticamente (VIDAVER, 1977). A existência de diferenças entre os fenótipos de *L. sibiricus*, tanto em G quanto em IVG, pode indicar que houve distinção não apenas de fenótipos, mas também de genótipos, devendo-se ressaltar que o de flores roxas teria capacidade de germinar mais em menor tempo, enquanto o de flores brancas necessitaria de um tempo maior, de acordo com os resultados obtidos. Esta pode ser uma resposta da espécie a uma pressão do meio, pois um novo fenótipo, com características reprodutivas distintas, pôde se expressar, indicando desempenhar uma função ecológica.

O fenótipo de flores roxas é o mais comum na região de Viçosa, sendo o de flores brancas de ocorrência bastante restrita. Observou-se, em testes preliminares e durante o experimento, que plantas provenientes de sementes vindas de flores brancas muitas vezes originam indivíduos que produzem flores roxas. Diante deste fato, o fenótipo de flores brancas não deve ser considerado uma variedade, pois demonstrou não estar estável.

Não houve diferença morfológica detectável entre as plantas dos dois fenótipos, segundo botânicos do Setor de Taxonomia e Sistemática Vegetal, do Depto. de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa, para onde o material foi levado, com a finalidade de identificação.

5. CONCLUSÕES

As sementes recém-coletadas dos dois fenótipos estudados possuem dormência primária, que pode ser superada por luz e temperatura alternada de 20-30°C. Esta dormência tende a diminuir naturalmente com o armazenamento das sementes por até 60 dias.

O efeito de luz e temperatura alternada como promotores da germinação e do aumento da velocidade foi interativo.

O tratamento que promoveu maior germinação das sementes de *Leonurus sibiricus* foi o que utilizou temperatura alternada de 20-30°C e luz suplementar.

Foram observadas diferenças na germinação e na velocidade desta entre sementes originadas de plantas de flores roxas e de flores brancas de *L. sibiricus*.

2. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de caracterizar dois fenótipos de *Leonurus sibiricus* L., um apresentando flores roxas e outro com flores brancas, realizaram-se estudos quanto aos padrões isozimáticos, à anatomia da epiderme e do mesofilo foliar, ao rendimento e à composição do óleo essencial extraído no início e em plena floração de caules e de folhas+inflorescências, e à germinação de sementes recém-colhidas e armazenadas por 30 e 60 dias.

Para obtenção de material suficiente e mais homogêneo para a realização dos diversos testes, foi instalado um plantio de *L. sibiricus* na Horta Biodinâmica, do Departamento de Fitotecnia da UFV, mantido de julho a dezembro de 1996.

As plantas utilizadas no estudo dos padrões isozimáticos apresentaram polimorfismo no sistema peroxidase, devendo-se ressaltar que os demais sistemas testados (xiquimato desidrogenase, glutamato desidrogenase, fosfatase ácida, glutamato oxaloacetato transaminase, malato desidrogenase, glicose 6-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, leucina aminopeptidase e esterase) não apresentaram boa resolução das bandas, exceto a esterase.

Observando-se cortes diafanizados de folhas dos dois fenótipos em microscopia de luz, pôde-se perceber a existência de diferenças entre a frequência de tricomas glandulares e não-glandulares na superfície abaxial dos dois

fenótipos, devendo-se ressaltar que o roxo os possui em maior número que o branco. Nas observações feitas com a microscopia eletrônica de varredura, obteve-se maior detalhamento das estruturas epidérmicas e de sua distribuição, notando-se que esta é diferenciada entre a face abaxial e adaxial, nas folhas dos dois fenótipos.

O óleo essencial extraído dos dois fenótipos não diferiu nem quanto ao rendimento, nem quanto à composição química, que pôde ser identificada como uma mistura complexa de compostos sesqui e diterpênicos, pela análise dos resultados da cromatografia em fase gasosa (CG) e da cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM). Observou-se que o conteúdo do óleo extraído varia de acordo com o órgão e o estágio fisiológico da planta, sendo inferior nos caules. O conteúdo total de óleo não se alterou, mas houve um aumento deste na porção folhas+inflorescências na época de plena floração, quando comparada com o início desta fase, acompanhado de uma diminuição do seu conteúdo nos caules. Isto indica que na época de plena floração a planta realoca uma parte do óleo essencial dos caules para as partes reprodutivas.

Para avaliar o comportamento das sementes dos dois fenótipos, montaram-se testes de germinação em laboratório, em que se verificou o efeito da presença e ausência de luz e das temperaturas de 25°C constante e 20-30°C alternadas sobre a germinação de sementes recém-coletadas, com 30 e 60 dias de armazenamento. As sementes provenientes do fenótipo de flores roxas apresentaram maior porcentagem e velocidade de germinação em relação às do fenótipo de flores brancas. Observou-se, para os dois fenótipos que em sementes recém-colhidas existe uma dormência primária, que pode ser quebrada pela presença de luz e pelas temperaturas alternadas de 20-30°C.

As diferenças encontradas entre os dois fenótipos, em relação à frequência de tricomas e à germinação de suas sementes, fornecem indícios de que, provavelmente, o fenótipo de flores roxas estaria mais bem adaptado às condições reinantes na região de Viçosa, o que de certa forma se confirma pelo fato de a população de plantas de flores roxas ser muito maior que a de flores brancas, que raramente são observadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ASAB, M.S., CANTINO, P.D. Phylogenetic implications of leaf anatomy in subtribe Melittidinae (Labiatae) and related taxa. **Journal of the Arnold Arboretum**, Lawrence, v.68, n.1, p.1-34, 1987.
- AKANDA, R.U., MULLAHEY, J.J., SHILLING, D.G. Environmental factors affecting germination of tropical soda apple (*Solanum viarum*). **Weed Science**, Champaign, v.44, p.570-574, 1996.
- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, Imprensa Universitária, 1991, 242p.
- AMARAL JÚNIOR, A.T. **Análise multivariada e isozimática da divergência genética entre acessos de moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne)**. Viçosa-MG: UFV, 1994. 95p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- ANDRADE, A.C.S., PEREIRA, T.S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação e no vigor de sementes de cedro - *Cedrella odorata* L. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, p.34-40, 1994.
- ASCENSÃO, L., MARQUES, N., PAIS, M.S. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, London, v.75, p.619-626, 1995.
- ATAL, C.K., KAPUR, B.M. ed. **Cultivation and utilization of aromatic plants**. Jammu-Tawi, Índia: Regional Research Lab, 1982. v.1.

- BANTHORPE, D.V., CHARLWOOD, B.V. The isoprenoids. In: BELL, E.A., CHARLWOOD, B.V. (Eds). Encyclopedia of plant physiology - new series - vol. 8 - **Secondary plant products**. p.185-220, 1980.
- BISSET, N.G., BRUHN, J.G., CURTO, S. et al. Was opium known in 18th dynasty ancient Egypt? An examination of materials from the tomb of the chief royal architect Kha. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v.41, p.99-114, 1994.
- BOSABALIDIS, A., TSEKOS, I. Glandular scale development and essential oil secretion in *Origanum dictamnus* L. **Planta**, Berlin, v.156, p.496-504, 1982.
- BOZZOLA, J.J., RUSSEL, L.D. **Electron microscopy. Principles and techniques for biologists**. New York: Jones and Bartlett Publishers, 1992. 542p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- BROWN JR., K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazonica**, Manaus, v.18, n.1-2, p.291-303, 1988.
- BURROWS, C.J. Germination behaviour of seeds of the New Zealand woody species *Melicope simplex*, *Myoporum laetum*, *Myrsine divaricata* e *Urtica ferox*. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.34, p.205-213, 1996.
- CARNEIRO, J.W.P., PIRES, J.C. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.5, p.127-131, 1983.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 3. ed., 1988. 424p.
- CICOGNA JÚNIOR, O., MANCINI, B., JORGE NETO, J. Influência do tempo de destilação na composição quali e quantitativa de óleos essenciais. II - essências de cravo-da-índia e capim-limão. **Rev. de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v. 8/9, p. 173-181, 1986/1987.
- COLSON, M., PUPIER, R., PERRIN, A. Étude biomathématique du nombre de glandes des feuilles de *Mentha x piperita*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.71, p.1202-1211, 1993.

- CORREA JÚNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER-PR, 1991. 151p.
- CRESPO, M.E., JIMENEZ, J., NAVARRO, C. Special methods for the essential oils of the genus *Thymus*. In: LINSKENS, H.F., JACKSON, J.F. (Eds.) **Modern methods of plant analysis**. New Series, v.12, **Essential oils and waxes**. Berlin: Springer-Verlag, p.41-62, 1991.
- CRESSWELL, E.G., GRIME, J.P. Induction of a light requirement during seed development and its ecological consequences. **Nature**, Neptune, v.291, p.583-585, 1981.
- CROTEAU, R., FELTON, M., KARP, F. *et al.* Relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). **Plant Physiology**, Rockville, v.67, p.820-824, 1981.
- CROTEAU, R., JOHNSON, M.A. Biosynthesis of terpenoids in glandular trichomes. In: RODRIGUEZ, E., HEALEY, P.L., MEHTA, I. ed. **Biology and chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum Press, 1984. p.133-186.
- CUTTER, E.G. Epiderme. In: **Anatomia vegetal** - primeira parte - células e tecidos. 2. ed. São Paulo: Livraria Roca, 1986. p.97-143.
- DEANS, S.G., WATERMAN, P.G. Biological activity of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. (Eds.) **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Avon: Longman Group, 1993. p.97-112.
- DUDAI, N., WERKER, E., PUTIEVSKY, E., *et al.* Glandular hairs and essential oil in the leaves and flowers of *Majorana syriaca*. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v.37, p.11-18, 1988.
- FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist**, London, v.108, p.229-257, 1988.
- GARCIA, A.R. **Estudo de fatores do ambiente na germinação de frutos polimórficos de *Bidens pilosa* L.** Viçosa-MG: UFV, 1987. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1987.
- GOODWIN, T.W., MERCER, E.I. Terpenes and terpenoids. In: **Introduction to plant biochemistry**. Braunschweig: Pergamon Press, 1972. p.256-282.

- GOTTLIEB, O.R., SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.39, n.8, p.707-716, 1987.
- GRIME, J.P., MASON, G., CURTIS, A.V., *et al.* A comparative study of germination characteristics in a local flora. **Journal of Ecology**, Oxford, v.69, p.1017-1059, 1981.
- GUENTHER, E., ALTHAUSEN, D. **The essential oils**. Huntington: Robert E. Krieger Publishing Company, 1975. 6v.
- HAY, R.K.M., SVOBODA, K.P. Botany. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. ed. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Avon: Longman Group, 1993. p.5-22.
- HENDERSON, W., HART, J.W., HOW, P., *et al.* Chemical and morfological studies on sites of sesquiterpenes accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**, Oxford, v.9, p.1219-1228, 1970.
- HOFFMANN, D. **New holistic herbal**. 3.ed., St. Ives: Element Books Ltd., 1990. 284p.
- HON, P.M., LEE, C.M., SHANG, H.S. Prehispanolone, a labdane diterpene from *Leonurus heterophyllus*. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, p.354-356, 1991.
- HON, P.M., WANG, E.S., LAM, S.K.M. et al. Preleoheterin and leoheterin, two labdane diterpenes from *Leonurus heterophyllus*. **Phytochemistry**, Oxford, v.33, p.639-641, 1993.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: MacGraw-Hill, 1940. 523p.
- JORGE NETO, J., ROCHA, A.B., POZETTI, G.L. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Senecio pohlii* Schultz Bipontinus ex Baker e *Senecio brasiliensis* (Sprengel) Lessing através das cromatografias em camada delgada e em fase gasosa. **Rev. de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v.8/9, p.91-98, 1986/1987.
- KHAN, A.A. Seed dormancy:changing concepts and theories. In: KHAN, A.A. ed. **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1977, p.29-50.
- KU, Y.C., SEONG, K.Y., SONG, D.Y. Studies on dormancy and germination of paddy weeds. **Korean Journal of Weed Science**, v.16, n.1, p.8-13, 1996.

- LABORIAU, L.G. **A germinação das sementes.** Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, 1983, 175p.
- LARCHER, W. **Physiological plant ecology.** Berlin: Springer-Verlag, 1975, 252p.
- LEVIN, D.A. The role of trichomes in plant defense. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v.48, n.1, p.3-15, 1973.
- LOPES, R.C. **Caracterização isozimática, divergência genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell.** Viçosa-MG: UFV, 1997. 91p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2. ed., Nova Odessa: Plantarum, 1991. 299p.
- LUO, S.R. Separation and determination of alkaloids of *Leonurus sibiricus*. **Chung Yao Tung Pao**, Beijing, v.10, n.1, (Resumo), 1985.
- LÜTGE, U., SCHNEPF, E. Elimination of secondary plant products. In: **Transport in plants II** - part B - tissues and organs. Ed.: Lütge, U. e Pitman, M.G. Berlin: Springer-Verlag, 1976. p.266-277.
- MALAKOV, P., PAPANOV, G., JAKUPOVIC, J. *et al.* The structure of leocardin, two epimers of a diterpenoid from *Leonurus cardiaca*. **Phytochemistry**, Oxford, v.24, n.10, p.2341-2343, 1985.
- MANCINI, B. Influência do tempo de destilação na composição quali e quantitativa de óleos essenciais. I - essência de hortelã do Brasil. **Rev. de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v.6, p.1-7, 1984.
- MARKERT, C.L., MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic and species specific patterns. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, Washington, v.45, p.753-762, 1959.
- MARTINS, E.R. **Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** Viçosa-MG: UFV, 1996. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C. *et al.* **Plantas medicinais.** Viçosa-MG, Imprensa Universitária, 1994. 220p.

- MAYER, A.M., POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1975. 192 p.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. Labiatae. In: **Anatomy of the dicotyledons**. v.II, Oxford: Clarendon Press, 1950. p. 1041-1053.
- MOREIRA FILHO, H. **Contribuição ao estudo da *Leonurus sibiricus***. Curitiba-PR: Universidade do Paraná, 1956. 81p. (Tese de Livre Docência).
- NAGASAWA, H., ONOYAMA, T., SUZUKI, M. et al. Effects of motherwort (*Leonurus sibiricus*) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. **Anticancer Research**, v.10, n.4, (Resumo), 1990.
- NAGLE, N.E., HAARD, N.F. Fractionation and characterization of peroxidase from ripe banana fruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, p.576-579, 1975.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO, N.M. (Eds.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.49-86.
- NÓBREGA, L.H.P., CORRÊA JR., C., RODRIGUES, T.J.D., CARREGARI, S.M.R. Efeito da luz e da temperatura na germinação de camomila (*Matricaria recutita*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, p.137-140, 1995.
- O'BRIEN, T.P., McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi Pty Ltd., 1981. 382p.
- OGA, S., AKISUE, G., LOPES, E.A. et al. Efeito do extrato bruto de *Leonurus sibiricus* L. no sistema nervoso central de ratos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.22, n.2, p.131-139, 1986.
- PANDEY, V.N., DUBEY, N.K. Effect of essential oils from some higher plants against fungi causing damping-off disease. **Biologia Plantarum**, Praha, v.34, n.1-2, p.143-147, 1992.
- PATITUCCI, M.L., VEIGA JR., V.F., PINTO, A.C. et al. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos vegetais. **Química Nova**, São Paulo, v.18, n.3, p.262-266, 1995.

- PEREIRA, E.A. **Caracterização morfoisozimática de 24 ecótipos de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.)**. Viçosa-MG: UFV, 1986. 63p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1986.
- PIERCE, L.C., BREWBAKER, J.C. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Hort Science**, Alexandria, v.8, n.1, p.17-22, 1973.
- ROLSTON, M.P. Water impermeable seed dormancy. **Bot. Review**, New York, v.44, n.3, p.365-396, 1978.
- RUDLOFF, E.V. Gas-liquid chromatography of terpenes. In: GIDDINGS, J.C., KELLER, R.A. (Eds.) **Advances in chromatography**. New York: Marcell Dekker, Inc., 1974. p.173-229. v.10.
- SAVONA, G., PIOZZI, F., BRUNO, M., *et al.* Diterpenoids from *Leonurus sibiricus*. **Phytochemistry**, Oxford, v.21, n.11, p.2699-2701, 1982.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. **Biochemical Genetics**, London, v.3, p.37-39, 1969.
- SCHAUENBERG, P., PARIS, F. **Guide to medicinal plants**. Cambridge: The Lutterworth Press, 1977. 349p.
- SCORTICHINI, M., ROSSI, M.P. Preliminary in vitro evaluation of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* **Journal of Applied Bacteriology**, Cambridge, v.71, p.109-112, 1991.
- SHAW, C.R., PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, London, v.4, p.297-320, 1970.
- SIEGEL, B.Z., GALSTON, A.W. The isoperoxidases of *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, Rockville, v.42, p.221-226, 1967.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1981. 451 p.
- SINGH, A., SINGH, D.K., MISRA, T.N., *et al.* Molluscicides of plant origin. **Biological Agriculture and Horticulture**, New York, v.13, p.205-252, 1996.

- SOLTIS, D.E., HAUFLE, C.H., DARROW, D.C. *et al.* Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **Amer. Fern. J.**, Berkeley, v.73, p.9-27, 1983.
- SUGIURA, S., INOUE, S., HAYASHI, Y., *et al.* Structure and synthesis of leonurine. **Tetrahedron**, Oxford, v.25, p.5155-5161, 1969.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. In: **Plant Physiology**, Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1991. p. 318-345.
- TAKAKI, M. Germinação de sementes de espécies invasoras de culturas. II. *Leonurus sibiricus* L. (Labiatae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.35, n.4, p.641-646, 1992.
- TAMASHIRO, S.Y., LEITÃO FILHO, H.F. Observações sobre o ciclo de vida de *Bidens pilosa* (Compositae, Heliantheae). **Hoehnea**, São Paulo, v.7, p.27-40, 1978.
- THANOS, C.A., DOUSSI, M.A. Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. **Israel Journal of Plant Science**, Tel-Aviv, v.43, p.227-237, 1995.
- TOOLE, V.K. Effects of light, temperature and their interactions on the germination of seeds. **Seed Science and Technology**, Oxford, v.1, p.339-396, 1973.
- TSCHESCHE, R., DIEDERICH, A., JHA, H.C. Caffeic acid 4-rutinoside from *Leonurus cardiaca*. **Phytochemistry**, Oxford, v.19, p.2783, 1980.
- TURNER, J.C., HEMPHILL, J.K., MAHLBERG, G. Trichomes and cannabinoid content of developing leaves and bracts of *Cannabis sativa* (Cannabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.67, n.10, p.1397- 1406, 1980.
- UPHOF, J.C.T. **Plant hairs**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1962. 292 p.
- VENKATACHALAM, K.V., KJOONAS, R., CROTEAU, R. Development and essential oil content of secretory glands of sage (*Salvia officinalis*). **Plant Physiology**, Rockville, v.76, p.148-150, 1984.
- VERLET, N. Commercial aspects. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. ed. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Avon: Longman Group, 1993. p.151-174.

- VIDAVER, W. Light and seed germination. In: KHAN, A.A. ed. **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1977, p.189-198.
- WATERMAN, P.G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. ed. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Avon: Longman Group, 1993. p.47-62
- WERKER, E., FAHN, A. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait. - development, ultrastructure, and secretion. **Botanical Gazzete**, Chicago, v.142, n.4, p.461-476, 1981.
- WIDÉN, C.J., BRITTON, D.M. A chromatographic and cytological study of *Dryopteris dilatata* in eastern North America. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.47, n.9, p.1337-1344, 1969.
- WOLFENDER, J.L., HOSTETTMANN, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometric to the investigation of medicinal plants. In: ARNASON, J.T. (Eds.) **Phytochemistry of medicinal plants**. New York: Plenum Press, 1995. p.189-215.
- ZECHINI D'AULERIO, A., ZAMBONELLI A., BIANCHI, A., *et al.* Micro morphological and chemical investigation into the effects of fungal diseases on *Melissa officinalis* L., *Mentha x Piperita* L. and *Salvia officinalis* L. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.143, p.179-183, 1995.