



JOÃO ANTÔNIO DE ALMEIDA GRANJA

**ASPECTOS FÍSICOS E FISIOLÓGICOS DE SEMENTES DE
QUEBRA-PEDRA (*Phyllanthus niruri* L.)**

LAVRAS – MG

2017

JOÃO ANTÔNIO DE ALMEIDA GRANJA

**ASPECTOS FÍSICOS E FISIOLÓGICOS DE SEMENTES DE
QUEBRA-PEDRA (*Phyllanthus niruri* L.)**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães

Orientador

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Granja, João .

Aspectos físicos e fisiológicos de sementes de Quebra-Pedra
(*Phyllanthus niruri* L.) / João Granja. - 2017.

62 p.

Orientador(a): Renato Mendes Guimarães.

.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Sementes. 3. *Phyllanthus niruri*. I.
Guimarães, Renato Mendes. . II. Título.

JOÃO ANTÔNIO DE ALMEIDA GRANJA

**ASPECTOS FÍSICOS E FISIOLÓGICOS DE SEMENTES DE
QUEBRA-PEDRA (*Phyllanthus niruri* L.)**

**PHYSICAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF STONE
BREAK SEEDS (*Phyllanthus niruri* L.)**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 18 de abril de 2017.

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho UFLA

Dra. Stella Dellyzete Veiga Franco da Rosa EMBRAPA

Dr. João Almir de Oliveira UFLA

Dr. Adenilson Henrique Gonçalves UFLA

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

LAVRAS – MG

2017

DEDICATÓRIA

Às minhas tias Syneide Granja e Deyse Granja (Boneca), que apesar de não estarem mais entre nós, permanecerão comigo nas lembranças de um tempo no qual as coisas eram mais simples e felizes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, principalmente meus pais, Antônio e Tereza, por todo o incentivo, apoio e por todo aprendizado de vida, que transcende em muito aquilo que nos é ensinado na academia, e influencia diretamente na minha construção como ser humano. É uma experiência que será levada pela eternidade.

A todos os meus irmãos, Sheyla, Eduardo, Edna, Carlos (Caca) e Brunna, que apesar de não ser irmã em termos consanguíneos, sempre foi uma forte base familiar para mim. Agradeço pelo apoio, mas acima de tudo por servirem como exemplo, pilar e inspiração nessa jornada que vem se encerrando. Um agradecimento especial a Caca, por toda a alegria proporcionada na minha vida.

Agradeço a Bety, minha namorada e companheira, por todo apoio e paciência que tem comigo, além de todo o aprendizado compartilhado.

Ao Professor Renato, meu orientador, por todos os ensinamentos, que vão me acompanhar além da universidade, transmitidos com sua típica e infinita paciência.

À todos os amigos feitos nesse período. Todas as conversas, brincadeiras e troca de conhecimentos foram essenciais na minha formação como indivíduo e conseqüentemente influenciaram na produção do trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras e ao Setor de sementes pela disponibilização da maravilhosa estrutura para a realização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, em especial aos professores José Eduardo e Suzan, por todo apoio, aprendizado e disponibilidades oferecidos no decorrer dessa jornada

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Professor Ílio Montanari Jr. do CPQBA/UNICAMP, pela disponibilização das sementes para o desenvolvimento do trabalho.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.*

(Marcel Proust)

RESUMO

A espécie *Phyllanthus niruri* L., popularmente conhecida como Quebra-Pedra, é uma planta medicinal amplamente utilizada pela humanidade ao longo de sua história. É usada principalmente para auxiliar na eliminação de cálculos renais e já há estudos que comprovam seu potencial hepatoprotetor, anti-inflamatório e antioxidante. Existem diversas pesquisas em relação aos aspectos médicos e farmacológicos dessa espécie, entretanto há poucas pesquisas sobre os seus aspectos agronômicos, principalmente no que diz respeito às características das sementes. Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho, analisar os aspectos físicos, o comportamento germinativo e o espectro no infravermelho próximo das sementes de quebra-pedra, relacionando-os com a coloração das mesmas. Foi observado que as sementes apresentam heteromorfia e desse modo foram divididas de acordo com sua coloração, em marrons e amarelas, e foram avaliados os seguintes parâmetros: peso de mil sementes, análise de raios-X, biometria das sementes, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e os espectros no infravermelho próximo. Foi também realizado o teste de tetrazólio para a identificação de sementes viáveis dentre as remanescentes ao final do teste de germinação. Foram utilizadas quatro temperaturas (25, 30, 35 °C e alternada 25 - 35 °C) e dois regimes de luz (luz e escuro) para avaliar a germinação. Foi observada germinação apenas nas sementes marrons e os maiores valores desse parâmetro foram observados na presença de luz com temperatura de 25 °C. Observou-se também que as sementes marrons estão mais desenvolvidas do que as sementes amarelas e recomenda-se o uso das sementes marrons para um eventual cultivo. No segundo capítulo do trabalho foram utilizadas apenas as sementes marrons, e o objetivo foi verificar a dormência assim como a superação desta. Foram realizados três experimentos, utilizando diversos tratamentos de superação de dormência. No primeiro foram estabelecidos quatro tratamentos, sendo estes: controle, água quente, KNO_3 50Mm e GA_3 10 μM e dois regimes de luz (luz e escuro). Outros dois experimentos foram realizados a partir dos resultados desse primeiro teste, variando a concentração do KNO_3 , combinando com GA_3 e o fotoperíodo. Em todos os experimentos foi realizado o teste de tetrazólio nas sementes remanescentes do teste de germinação. Foram avaliados a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de sementes viáveis. Foi constatado que as sementes apresentam dormência, sendo esta fisiológica, e que os tratamentos com KNO_3 nas concentrações de 50 e 100 Mm foram os mais efetivos na promoção da germinação e aumento do IVG. Entretanto essa efetividade está diretamente ligada à concentração dos compostos utilizados.

Palavras chaves: Germinação, Dormência, Coloração, Biometria, Heteromorfia.

ABSTRACT

The species *Phyllanthus niruri* L., popularly known as Stone-Breaker, is a medicinal plant widely used by mankind throughout its history. It is mainly used to aid in the elimination of kidney stones and there are already studies that prove its potential hepatoprotective, anti-inflammatory and antioxidant. There are several researches regarding the medical and pharmacological aspects of this species, however, there is little research on its agronomic aspects, especially with regard to the characteristics of the seeds. The objective of this work was to analyze the physical aspects, the germinative behavior and the infrared spectrum near the rock breaking seeds, relating them to their coloring. It was observed that the seeds showed heteromorphism and were therefore divided according to their coloration in brown and yellow, and the following parameters were evaluated: weight of one thousand seeds, X-ray analysis, seed biometry, germination, speed index Germination (IVG) and near-infrared spectra. The tetrazolium test was also performed to identify viable seeds among the remaining seeds at the end of the germination test. Four temperatures (25, 30, 35 °C and alternating 25 - 35 °C) and two light regimes (light and dark) were used to evaluate germination. Germination was observed only in brown seeds and the highest values of this parameter were observed in the presence of light with a temperature of 25 °C. It was also observed that the brown seeds are more developed than the yellow seeds and it is recommended the use of the brown seeds for an eventual cultivation. In the second chapter of the study, only the brown seeds were used, and the objective was to verify dormancy as well as to overcome it. Three experiments were carried out, using several treatments of dormancy overcoming. In the first one, four treatments were established: control, hot water, 50 mM KNO₃ and 10µM GA₃ and two light regimes (light and dark). Two other experiments were carried out from the results of this first test, varying the KNO₃ concentration, combining with GA₃ and the photoperiod. In all experiments the tetrazolium test was carried out on the remaining seeds of the germination test. The percentage of germination, germination speed index (IVG) and percentage of viable seeds were evaluated. It was verified that the seeds present dormancy, being this physiological, and that the treatments with KNO₃ in the concentrations of 50 and 100 mM were the most effective in the promotion of the germination and increase of the IVG. However, this effectiveness is directly linked to the concentration of the compounds used

.Key Words: Germination, Dormancy, Color, Biometry, Heteromorphism.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Plantas Medicinais: Definição e histórico	12
2.2 Economia e cultivo de plantas medicinais	13
2.3 Plantas medicinais no Brasil	15
2.4 <i>Phyllanthus niruri</i> L	16
2.4.1 Aspectos botânicos e taxonômicos	16
2.4.2 Uso medicinal e propriedades farmacológicas	17
2.4.3 Aspectos da semente de <i>Phyllanthus niruri</i>	18
2.5 SEMENTE: DEFINIÇÃO, IMPORTÂNCIA E MATURAÇÃO	18
2.5.1 Dormência	19
2.5.2 Tipos de dormência	20
3. CONCLUSÃO	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
SEGUNDA PARTE: ARTIGOS	28
ARTIGO 1: Biometria, germinação e espectro no infravermelho próximo de sementes de <i>Phyllanthus niruri</i> l. com diferentes cores	27
ARTIGO 2: Métodos de superação de dormência e fotoperíodo em sementes de <i>Phyllanthus niruri</i> L.	47

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Phyllanthus niruri* L. é uma das plantas medicinais mais tradicionais da cultura popular mundial. Presente nos sistemas médicos mais antigos do planeta é conhecida no Brasil como Quebra – Pedra e é usada popularmente para o tratamento de diversas enfermidades como: diabetes, malária, febre, diarreia, urolitiase. Em diversos estudos tem sido confirmado o potencial dessa espécie na prevenção e combate a urolitíase e ação hepatoprotetora contra o vírus da hepatite B, além de diversos trabalhos preliminares nos quais foram descritos o seu potencial anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, entre outros.

Entretanto, mesmo com essa relevância em relação aos aspectos farmacológicos, existem poucos estudos sobre os aspectos agrônômicos, que são de fundamental importância para sistematizar e coordenar os métodos de obtenção dessas plantas. Boa parte das espécies medicinais atualmente é obtida por meio do extrativismo, prática essa que pode causar danos irreparáveis a população das espécies desejadas e ao meio ambiente, além de prejudicar o comércio de plantas medicinais e não ser uma fonte segura de fornecimento de matéria – prima vegetal para o uso na produção de medicamentos.

Phyllanthus niruri L. se propaga principalmente por sementes e foi observado que heteromorfia nestas, possibilitando que sejam divididas em duas cores: amarelas e marrons. Esse fenômeno pode está associado ao estágio de maturação fisiológica da espécie. Os estudos sobre a maturação fisiológica são importantes, pois esse processo é de grande importância para o entendimento e elucidação do momento em que a semente atinge o máximo de vigor e viabilidade. Além disso, em espécies que são pouco estudadas e não domesticadas, geralmente são observadas sementes dormentes, outro fator que deve ser considerado para se entender o comportamento germinativo das sementes dessa espécie.

Diante da carência desse tipo estudo, com esse trabalho objetivou-se analisar os aspectos físicos, biométricos da semente e do processo de germinação de *Phyllanthus niruri*. Assim se torna possível verificar se a heteromorfia presente nas sementes está associada com a maturação fisiológica e também se a espécie possui sementes dormentes e qual seria o método mais eficaz para a superação dessa dormência. Sendo assim, se torna possível

fornecer informações básicas sobre as características das sementes que possam auxiliar no processo de domesticação e cultivo dessa espécie.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

Plantas medicinais podem ser definidas como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos para homens ou animais, ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (ZHANG, 1998; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). Essas plantas são muito importantes não só quando apresentam efeito direto como agente terapêutico, mas também se funcionarem como base para a síntese de drogas farmacológicas ou se forem utilizadas como modelos para a elucidação da ação de compostos farmacologicamente ativos (ZHANG, 1998). As propriedades medicinais dessas espécies são reconhecidas até por outros primatas, como foi constatado por BOWLER et al., 2015 através da observação de grupos de símios, os quais faziam uso repetido de algumas dessas plantas.

A utilização das plantas medicinais pela espécie humana como recurso terapêutico remonta desde as civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE et al., 2007; FIRMO et al., 2011). De acordo com estudos arqueológicos têm sido observadas que as propriedades terapêuticas das plantas são conhecidas desde os povos pré - históricos (KHAN, 2014; HALBERSTEIN, 2005). Civilizações como a egípcia, chinesa, indiana grega e mesopotâmica já utilizavam as plantas medicinais de modo sistemático e produziram uma considerável base de material teórico acerca da utilização dessas espécies. (HALBERSTEIN, 2005; GURIB-FAKIM, 2006).

Ao longo da história, as plantas medicinais tiveram presença marcante na sociedade, entretanto, a partir do final século XIX, com o desenvolvimento dos medicamentos alopáticos e início da indústria farmacêutica propriamente dita, desencadeados pela síntese do ácido acetil salicílico (aspirina), houve um enfraquecimento da presença das plantas medicinais na cultura popular (RASKIN et al., 2002). Contudo, mesmo com essa redução, atualmente é observado que o interesse e o uso dessas espécies vêm crescendo novamente. Cerca de 80% da população de países em desenvolvimento dependem do uso dessas plantas para a atenção básica a saúde (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; VEIGA, 2008), situação essa favorecida pelo preço muitas vezes inacessíveis dos medicamentos convencionais e ao fato de que uma parcela significativa dessa população reside em locais muito distantes dos centros de

saúde (VEIGA, 2008). O uso das plantas medicinais também é muito comum em países desenvolvidos (ZHANG, 1998; WHO, 2005); em países como Alemanha, Austrália, França, EUA, estima-se que aproximadamente 40 – 50% da população fazem uso das plantas medicinais ou de drogas derivadas destas (FAO, 2008), mas a utilização nesses países é em sua maioria motivada por um modismo cultural que cerca os produtos de procedência natural (VEIGA, 2008).

Aproximadamente 70.000 espécies de plantas são utilizadas mundialmente na medicina popular e os números sobre esse uso, quando avaliados por região, são mais consideráveis ainda. Na Índia, são usadas cerca de 7.500 espécies para fins medicinais, das 17.000 espécies nativas do país (LANGE, 2004). Países como China também tem um expressivo uso dessas espécies (6.000) e na Europa, aproximadamente 2.000 espécies são usadas para fins medicinais (LANGE, 2004; LANGE, 2006).

É estimado que cerca de 40% dos medicamentos convencionais da terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais e destes, 25% são derivados de plantas medicinais. Em alguns grupos de medicamentos essa porcentagem ainda é maior, chegando a 70% no caso das drogas anticancerígenas e antibióticos (CALIXTO, 2000; CALIXTO, 2003). Embora apenas 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada, cerca de 140 mil metabólitos oriundos de plantas e microrganismos já foram isolados e caracterizados, porém ainda não foram biologicamente avaliados (CALIXTO, 2003).

2.2 Economia e cultivo de plantas medicinais

O aumento no uso das plantas medicinais, reflete naturalmente no comércio dessas espécies. No período de 1991 – 2003, o montante de plantas medicinais comercializadas foi de aproximadamente 300.000 toneladas, rendendo uma circulação de capital considerável. Entretanto cerca de 80% desse comércio é monopolizado por apenas 12 países (Tabela 1), sendo estes em sua maioria europeus e da região da Ásia temperada (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2002; LANGE, 2004; LANGE, 2006). Em 2002 esse mercado gerou uma receita de aproximadamente US\$ 60.000.000 (FAO, 2008).

Quadro 1: Maiores exportadores e importadores de plantas medicinais no período de 1991 - 2003. Adaptado de Lange, 2006.

País importador	Volume (Ton)	Valor (US\$)	País exportador	Volume	Valor
Hong Kong	59.950	263.484,200	China	150.600	266.038,500
EUA	51.200	139.379,500	Hong Kong	55.000	221.021,200
Japão	46.450	131.031,500	Índia	40.400	61.665,500
Alemanha	44.750	104.457,200	México	37.600	14.257,500
Coréia do Sul	33.500	49.889,200	Alemanha	15.100	68.243,200
França	21.800	51.975,000	EUA	13.050	104.572,000
China	15.550	41.602,800	Egito	11.800	13.476,000
Itália	11.950	43.006,600	Bulgária	10.300	14.355,500
Paquistão	10.650	9.813,800	Chile	9.850	26.352,000
Espanha	9.850	27.648,300	Marrocos	8.500	13.685,400
Reino Unido	7.950	29.551,000	Albânia	8.050	11.693,000
Malásia	7.050	38.685,400	Cingapura	7.950	52.620,700
TOTAL	320.550	930. 524, 400	TOTAL	368.100	847.980,800

O aumento do uso de plantas medicinais gera uma demanda crescente e contínua dessas espécies, tanto por razões comerciais como para o consumo próprio, o que pode levar a problemas, como o esgotamento desse recurso. Um agravante para essa questão é que uma parte significativa das espécies medicinais utilizadas no mundo é obtida por meio do extrativismo, principalmente devido à falta de informações e dificuldades no cultivo (CARVALHO; ANNE; CARNELOSSI, 2010). Das 400 espécies utilizadas para a produção de medicamentos na Índia, apenas aproximadamente 20 são oriundas de cultivo (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2002). Na Alemanha, das 1.543 espécies medicinais comercializadas, apenas 3 – 6% são obtidas por meio do cultivo (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2002; (LANGE, 2004). Outro fator que mantém a preferência do uso de plantas medicinais coletadas do seu ambiente natural (selvagens), o cultural. Isso ocorre em diversos países, dentre eles a China, em relação ao uso das raízes do Ginseng, e em Botsuana, onde os usuários tradicionais de plantas medicinais afirmam que o material advindo de plantas cultivadas não tem o mesmo “poder” do material advindo de plantas selvagens (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2002).

Além disso, de acordo com alguns estudos, o teor e diversidade de metabólitos secundários em plantas selvagens são maiores do que nas cultivadas, devido ao maior tempo de desenvolvimento e o grande número de interações ecológicas em que essas plantas estão inseridas, que supera em muito o das plantas cultivadas (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2002; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

É constatado que o cultivo de plantas medicinais apresenta diversas vantagens, principalmente quando se analisa pela perspectiva de mercado, como por exemplo: A padronização do material utilizado (massa, condições de cultivo, manejo); a garantia de que a espécie que está sendo utilizada é realmente a espécie indicada, evitando assim adulterações ou o risco de consumo de alguma espécie tóxica por engano; controle de qualidade assegurado e o produto pode ser ajustado ao regulamento e preferência dos consumidores (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2002; PHONDANI et al., 2016). O cultivo pode contribuir também de maneira significativa para amenizar a perda de diversidade provocada pelo extrativismo e além disso permite um manejo na produção de modo a possibilitar um aumento no teor de princípios ativos na planta (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005; PHONDANI et al., 2016).

2.3 Plantas medicinais no Brasil

Atualmente, no Brasil estima-se que aproximadamente 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal nos últimos anos (ETHUR et al., 2011). As raízes históricas do uso das plantas medicinais no país remontam à prática indígena, que influenciada pelas culturas africana e portuguesa, produziu uma vasta base de conhecimento popular (TEIXEIRA et al., 2002; GIRALDI; HANAZAKI, 2010). Dessa miscigenação cultural resultou uma das farmacopeias populares mais diversas do mundo (MELO et al., 2007).

Justificada pela carência de estudos na área e pela presença marcante das plantas medicinais na cultura popular brasileira, foi aprovada em 2006 a Política Nacional para Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e que juntamente com A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPICS), também de 2006, representaram um marco na regulamentação do uso dessas plantas e serviram como base para a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, em 2009 que tem por objetivos a ampliação das opções terapêuticas no atendimento médico, além da manutenção, proteção ao conhecimento tradicional e a biodiversidade nacional, além de inclusão social e fortalecimento da agricultura familiar (BRASIL., 2009).

Em 2005, foi criada a RDC N° 267, que aprova o regulamento técnico de plantas que são usadas para preparar chá e em 2010 foi lançada a RDC N° 17, que estabelece os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano durante as inspeções sanitárias, incluindo os medicamentos fitoterápicos. Essas medidas regulam e consolidam definitivamente o uso das plantas medicinais no país (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010).

2.4 *Phyllanthus niruri* L.

2.4.1 Aspectos botânicos e taxonômicos

O primeiro registro de *Phyllanthus niruri* L vem do livro Hortus Cliffortianus, que relata a espécie como bem definida botanicamente mas sendo sistematicamente mal interpretada por autores subsequentes (WEBSTER, 1956). Atualmente essa espécie pertence à família Phyllanthaceae, que antigamente era uma subfamília de Euphorbiaceae (BREMER et al., 2003). De acordo com WEBSTER, 1970, *P. niruri* é geralmente de porte herbáceo, subarbustos e raramente encontrada como arbusto, podendo ser monóica ou dióica, com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo desde o continente asiático até a América. Fontes mais recentes afirmam que *P. niruri* pode ser descrita como erva simples, em média com 50 cm de altura, até muito ramosa, caule principal cilíndrico com folhas reduzida a escamas. A espécie é distribuída amplamente em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na Ásia, mas espalhadas pelos mais variados ambientes (ULYSSEA; AMARAL, 1997)

MARTINS; LIMA; CORDEIRO, (2014) fizeram uma caracterização detalhada dos aspectos morfológicos dessa espécie afirmando as seguintes características: “Ervas monoicas, 0,5–2 m alt.; com ramificações filantoide, caule liso, ramos cilíndricos, glabros. Folhas membranáceas, levemente discolores, com comprimento de 2–12(–19) × 1,5–6(–10) mm; oblongas; ápice arredondado, apiculado; base assimétrica a cordada; faces adaxial e abaxial glabras; margem plana; nervação cladodrôma; pecíolos 1–1,5 mm compr; estípulas 1–2 mm compr., estreitamente triangulares a lineares, glabras. Inflorescências em címulas axilares, compostas, geralmente, por flores solitárias; brácteas 1–4 mm compr., lineares. 1,5–2 mm compr., obovais a largamente obovais, membranáceas; estames 3, filetes completamente livres, anteras com deiscência horizontal; disco 5-segmentado; pedicelo 2,5–4 mm compr. Flores femininas 2,5–3 mm compr.; sépalas 5, 2–3 mm compr., obovais a largamente obovais,

membranáceas; ovário ca. 0,5 mm compr., estiletes 3, 2-fidos até a metade; disco inteiro; pedicelo 2–5 mm compr. Cápsulas ca. 2 × 3 mm.”

Esta espécie está distribuída em ambientes como floresta Amazônica, sudeste da Índia e da China (COUTO et al., 2013; PORTO et al., 2013). No Brasil é encontrada em praticamente em todo o país, sendo considerada uma planta daninha. É uma planta ruderal que cresce principalmente durante a estação chuvosa em praticamente todos os tipos de solo, sendo bastante comum em fendas de calçadas terrenos baldios, quintais e jardins, sendo registrada em todos os estados brasileiros (LORENZI; MATOS, 2008). Em termos de propagação, a de *P. niruri* é basicamente por sementes, apesar de possuir potencial para a propagação por meio de estaquia (CONSATTI; FREITAS; PÉRICO, 2002). Embora a propagação por sementes ser a mais recomendada para o cultivo dessa espécie (LORENZI; MATOS, 2008), a germinação é muito baixa (VENTURI; RANDI, 1997; SHAKILA, ARUMUGAM RAJESWARI, 2006).

2.4.2 Uso medicinal e propriedades farmacológicas

Phyllanthus niruri L. é uma das espécies mais importantes na cultura tradicional mundial. Está presente nos sistemas médicos mais tradicionais do mundo como, por exemplo, na medicina tradicional chinesa, no Jamu Indonésio e no Ayurveda, medicina milenar e tradicional hindu (BAGALKOTKAR et al., 2006). Esta espécie é utilizada popularmente para o tratamento de diversas enfermidades como: diabetes, malária, febre, diarreia, urolitíase, entre outras (GIRIBABU et al., 2014). Além disso, em pesquisas têm sido observada promissora utilização desta como hepatoprotetora (LIU et al., 2014), larvicida em relação ao mosquito *Aedes aegypti* (SURESH et al., 2015), anti-inflamatória e antinociceptiva (PORTO et al., 2013), anti HIV (NAIK; JUVEKAR, 2003), antidiabética (OKOLI et al., 2010), urolitíase (BOIM; HEILBERG; SCHOR, 2010; MARQUES, 2010) entre outras. Na composição química da planta de *P. niruri* está presente uma ampla gama de metabólitos secundários, como flavonoides, taninos, lignanas, terpenos e cumarinas, que são os prováveis responsáveis pela vasta aplicação medicinal desta planta (BAGALKOTKAR et al., 2006)

2.4.3 Aspectos da semente de *Phyllanthus niruri*

A espécie *P. niruri* se propaga principalmente por meio de sementes (LORENZI; MATOS, 2008) As sementes dessa espécie são descritas como triangulares com dorso

longitudinalmente arqueado, medindo aproximadamente de 1,0 – 2,0 mm com coloração castanha avermelhada (KISSMANN; GROTH, 1999; GARCIA et al., 2004; BITTENCOURT; RESENDE; FAVEIRO, 2008). As sementes são castanhas, verruculosas e com comprimento de 1.0 -1.5mm e possuem um dorso com verruculosidades em forma de estrela com inscrustamentos e estruturas colunares verticais. As faces laterais e ventral dessa semente também apresentam esse tipo de verruculosidade com incrustamentos (MACHADO; OLIVEIRA; MENTZ, 2005) Essas sementes ocorrem sempre aos pares em cada lóculo, a espessura da testa é relativamente simples, o que pode caracterizá-la como semente não dormente, entretanto mais estudos são necessários para corroborar essa hipótese, mas se for verdadeira, poderia explicar sua fácil disseminação e propagação, e o fato de serem consideradas infestantes (BITTENCOURT; RESENDE; FAVEIRO, 2008).

Em relação a composição química das sementes, estas apresentam teor de óleo aproximadamente de 16%, sendo os ácidos linoleico e linolênico os seus componentes principais, além de apresentarem também o ácido ricinoléico, mas em baixa quantidade (1,2%). O teor de proteínas da semente é de cerca de 17% (AHMAD; HUSAIN; OSMAN, 1981).

2.5 Semente: definição, importância e maturação fisiológica.

A palavra semente deriva do latim *seminilla*, que é o diminutivo de *sêmen*, esperma (DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, 2001). Essa estrutura é o principal meio de perpetuação para a maioria das espécies e sua grande vantagem é a capacidade de distribuição da germinação no espaço e tempo, auxiliando assim na conservação e na propagação da espécie (DEMINICIS et al., 2009).

A semente é um dos insumos mais importantes na agricultura moderna. É através dela que modificações e aperfeiçoamentos gerados pelo melhoramento genético chegam ao agricultor (POPINNIGIS, 1985). Além disso, as sementes estão presentes de modo essencial na dieta humana. O cultivo de grãos representa cerca de 90% das sementes cultivadas no mundo, sendo assim um componente de grande importância na alimentação (BEWLEY, 1997).

A semente passa por diversas modificações até está apta para desempenhar o seu papel biológico na propagação, e esse processo pode ser denominado de maturação fisiológica. A maturação compreende as alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais que sucedem desde a fertilização do óvulo e que culmina quando a semente atinge o ponto máximo de matéria seca (POPINNIGIS, 1985). Nesse ponto (denominado ponto de maturidade

fisiológica) a semente também atinge o máximo de vigor e poder germinativo. As principais modificações observadas nas sementes durante esse processo são no teor de água, matéria seca, tamanho, poder germinativo, vigor e bioquímicas (POPINNIGIS, 1985; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; VIDIGAL et al., 2009).

Foi observado que em algumas espécies, alguns aspectos de sementes e de frutos fornecem ferramentas para a diferenciação dos estádios de maturação fisiológica. Forma, tamanho, coloração, massa, grau de umidade são alguns desses aspectos (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002; MEDEIROS et al., 2010).

Além dessas características, foi observado variação nos aspectos bioquímicos das sementes no decorrer do processo de maturação fisiológica. Foram observadas alterações no perfil de enzimas do sistema antioxidante, enzimas do metabolismo da glicose e lipídios e nas proteínas LEA com o decorrer do processo de maturação (VIDIGAL et al., 2009; NAKADA et al., 2010).

O estudo desse processo é de grande importância, pois fornece instrumentos para se conhecer o comportamento das espécies no que se refere à sua reprodução, possibilitando, assim, prever o estabelecimento e a época adequada de colheita, o que possibilita a produção de sementes com boa qualidade fisiológica (ALVES; SADER; ALVES, 2005).

2.5.1 Dormência

A dormência ocorre quando a semente, mesmo viável e em condições ideais não tem a capacidade de germinar por determinado período (ADKINS; BELLAIRS; LOCH, 2002; BASKIN; BASKIN, 2004).

O bloqueio da germinação promovido pela dormência é uma estratégia benéfica devido a promoção da germinação ao longo do tempo, aumentando assim as chances de sobrevivência da espécie. As sementes podem ser dispersas da planta matriz em diferentes estados de dormência (polimorfismo) e desse modo a germinação é distribuída no tempo (FOWLER; BIANCHETTI, 2000). Outra estratégia envolvendo a dormência é que as sementes podem entrar em estado de dormência embrionária, quando após a dispersão a semente é submetida a condições desfavoráveis para a germinação (BASKIN; BASKIN, 2004; FOWLER; BIANCHETTI, 2000).

Apesar de ser uma adaptação que favorece a sobrevivência da espécie, esta passa a ser um problema do ponto de vista tecnológico, quando as sementes são utilizadas para produção de mudas, em virtude do longo tempo para que ocorra a germinação, o que favorece o ataque

de fungos podendo acarretar em grandes perdas (FOWLER; BIANCHETTI, 2000; POPINNIGIS, 1985).

2.5.2 Tipos de dormência

Quando as sementes são dispersas da planta em estado de dormência, essa é denominada de primária (BEWLEY, 1997). É um tipo de dormência que ocorre em sementes maduras, com tegumento permeável a água e geralmente induzida pelo ácido abscísico (ABA) (SAVAGE; MERTZGER, 2006).

Em sementes com dormência fisiológica não profunda, a dormência pode ser induzida após a dispersão e nesse caso é denominada de secundária (BASKIN; BASKIN, 2004; SAVAGE; MERTZGER, 2006). Desse modo, uma vez que a semente dispersa perca a dormência primária, em decorrência de flutuações ambientais específicas, por exemplo, a dormência secundária pode imediatamente se estabelecer conforme as condições do meio em que a semente se encontra (CARDOSO, 2009).

Baseado em esquemas pregressos, BASKIN; BASKIN, (2004) construíram um modelo de classificação que inclui cinco classes de dormência: Fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e combinada (física e morfológica).

A dormência fisiológica é o tipo mais comum observado nas sementes. É muito abundante em banco de sementes de regiões temperadas e está presente na maioria das espécies consideradas modelo para o estudo de sementes (BASKIN; BASKIN, 2004). Esse tipo de dormência pode ser dividida em três níveis: Profunda, intermediária e não profunda. É um tipo de dormência ligada ao embrião e regulada basicamente em níveis metabólicos e gênicos (CARDOSO, 2009).

Para a superação deste tipo de dormência, geralmente são utilizados métodos de estratificação e aplicação de soluções promotoras da germinação, como soluções de KNO_3 , giberelinas, tiouréia, entre outras (ÇETINBAŞ; KOYUNCU, 2006; NETO et al., 2015).

A dormência morfológica está relacionada ao grau de desenvolvimento do embrião. Sementes com esse tipo de dormência apresenta embriões pequenos, pouco diferenciados e pouco desenvolvidos (ADKINS; BELLAIRS; LOCH, 2002; BASKIN; BASKIN, 2004). Embriões nesse estado, não apresentam dormência fisiológica e desse modo não necessitam de tratamentos de superação de dormência, mas apenas de tempo para o desenvolvimento do embrião (BASKIN; BASKIN, 2004).

A dormência morfofisiológica é caracterizada pelo embrião não diferenciado junto com algum componente fisiológico (BASKIN; BASKIN, 2004). Assim, para a superação da

dormência, é requerido algum pré tratamento. Para a protrusão e crescimento radicular é necessário consideravelmente mais tempo do que nos casos de dormência morfológica (BASKIN; BASKIN, 2004).

A dormência física é causada por algum bloqueio, de natureza física, na absorção de água pela semente ou pelo impedimento da protrusão radicular. Esse tipo de dormência geralmente está ligada ao tegumento, que devido a sua dureza pode bloquear tanto a entrada de água na semente como impedir a protrusão radicular (ADKINS; BELLAIRS; LOCH, 2002; BASKIN; BASKIN, 2004). Um dos métodos mais utilizados para superação desse tipo de dormência é a escarificação do tegumento da semente que pode ser física (remoção do tegumento por meio do uso de agentes químicos ou físicos), imersão em água fervente, resfriamento ou corte de uma parte do tegumento. Alguns compostos químicos (ácidos nítrico e sulfúrico, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio) também são utilizados para escarificar sementes (TUNG; SERRANO, 2011).

A dormência combinada ocorre quando é observado nas sementes as dormências físicas e fisiológica (BASKIN; BASKIN, 2004). Desse modo o tegumento da semente é impermeável a água e o componente fisiológico da dormência não é profundo. Alguns métodos como a estratificação e o armazenamento à seco são recomendados para a superação desse tipo de dormência (BASKIN; BASKIN, 2004).

3. CONCLUSÃO

As sementes de Quebra-Pedra apresentam heteromorfia e podem ser divididas em duas cores: marrons e amarelas. Dentre estas, apenas as sementes marrons germinam e o maior potencial de germinação foi observado na presença de luz e na temperatura de 25°C. Entretanto os valores da porcentagem de germinação, mesmo na temperatura ideal, são muito baixos e dessa forma as sementes podem ser consideradas dormentes. De acordo com os resultados do presente estudo, essa dormência é do tipo fisiológica e pode ser parcialmente superada com KNO₃ em determinadas concentrações.

Por meio do presente estudo, alguns aspectos fundamentais para a compreensão dos processos fisiológicos das sementes de *P. niruri* foram elucidados e isso pode servir de base para a construção preliminar de projetos de domesticação dessa espécie. Entretanto são necessárias mais pesquisas para a elucidação completa desses processos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, S. W.; BELLAIRS, S. M.; LOCH, D. S. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. **Euphytica**, v. 126, n. 1, p. 13–20, 2002.

AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.

AHMAD, M. U.; HUSAIN, S. .; OSMAN, S. M. Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 6, p. 673–674, 1981.

ALVES, E. U.; SADER, R.; ALVES, A. U. Maturação fisiológica de sementes de sabiá 1. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p. 1–8, 2005.

ANDRADE, S. F. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 464–471, 2007.

BAGALKOTKAR, G. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. Burkill 1996, p. 1559–1570, 2006.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, n. February 2007, p. 1–16, 2004.

BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, n. July, p. 1055–1066, 1997.

BITTENCOURT, G. A.; RESENDE, U. M.; FAVEIRO, S. DESCRIÇÃO MORFOANATÔMICA DAS SEMENTES DE *Senna occidentalis* (L.) LINK. (FABACEAE-CAESALPINOIDEAE) E *Phyllanthus niruri* L. (EUPHORBIACEAE). **Biofar**, v. 3, n. 1, p. 38–44, 2008.

BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. **International Braz J Urol**, v. 36, n. 6, p. 657–664, 2010.

BOWLER, M. et al. Mutual medication in capuchin monkeys - Social anointing improves coverage of topically applied anti-parasite medicines. **Scientific reports**, v. 5, n. October, p. 15030, 2015.

BRASIL. **Regulamento Técnico De Espécies Vegetais Para O Preparo De ChásDiário Oficial da União**, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde RESOLUÇÃO RDC Nº 17 , DE 16 DE ABRIL DE 2010. p. 1–65, 2010.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos**. [s.l: s.n.].

BREMER, B. et al. A An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II the angiosperm phylogeny group*. **Botanical Journal of the Linnean Society** , v. 141, n. 141, p. 399–436, 2003.

CALIXTO, J. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 200, p. 37–

39, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.

CARDOSO, J. V. M. CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DA DORMÊNCIA EM SEMENTES. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 619–631, 2009.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. ed. Jaboticabal: [s.n.].

CARVALHO, L. M. DE; ANNE, J.; CARNELOSSI, M. A. G. **Qualidade em plantas medicinais Embrapa**, 2010.

ÇETINBAŞ, M.; KOYUNCU, F. Improving germination of *Prunus avium* L . seeds by gibberellic acid , potassium nitrate and thiourea. **Horticultural Science**, v. 33, n. 3, p. 119–123, 2006.

CONSATTI, G.; FREITAS, E. M. DE; PÉRICO, E. **Produção de mudas de Phyllanthus niruri L . (Phyllanthaceae) através da propagação vegetativa**. Museu de Ciências Naturais - UNIVATES. **Anais...**2002

COUTO, A. G. et al. Chemical and technological evaluation of the *Phyllanthus niruri* aerial parts as a function of cultivation and harvesting conditions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 36–43, 2013.

DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, F. V. **Morfologia externa de espermatófitas**. Jaboticabal: [s.n.].

DEMNICIS, B. B. et al. revisão bibliográfica dispersão natural de sementes : importância , classificação e sua dinâmica nas pastagens tropicais *. **Revista Arquivos de Zootecnia**, v. 58, p. 35–58, 2009.

ETHUR, L. Z. et al. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de itaquí - RS. **Revista Brasileira de Plantas MedicinaiS**, v. 13, n. 2, p. 121–128, 2011.

FAO. **The state of food and agriculture, 2008**. [s.l: s.n.].

FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.

FOWLER, J.; BIANCHETTI, A. Dormência em sementes florestais. **Embrapa Florestas Documentos**, p. 1–28, 2000.

GARCIA, C. M. et al. Estudo Morfo-Anatômico de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 67–70, 2004.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395–406, 2010.

GIRIBABU, N. et al. Aqueous extract of *Phyllanthus niruri* leaves displays in vitro antioxidant activity and prevents the elevation of oxidative stress in the kidney of

streptozotocin-induced diabetic male rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686–699, 2005.

KHAN, H. Medicinal Plants in Light of History: Recognized Therapeutic Modality. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 19, n. 3, p. 216–219, 2014.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2ed. ed. São Paulo: [s.n.].

LANGE, D. Medicinal and aromatic plants: Trade, production, and management of botanical resources. **Acta Horticulturae**, v. 629, p. 177–197, 2004.

LANGE, D. International Trade in Medicinal and Aromatic Plants. Actors, volumes and commodities. In: **Medicinal and Aromatic Plants**. [s.l: s.n.]. p. 155–170.

LIU, S. et al. In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus niruri* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1061–1067, 2014.

LORENZI, H. F.; MATOS, F. J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [s.l: s.n.].

MACHADO, C. A.; OLIVEIRA, P. L.; MENTZ, L. A. SEM observations on seed of some herbaceous *phyllanthus*. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 263–263, 2005.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 86–96, 2005.

MARQUES, L. C. *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) no Tratamento de Urolitíase : Proposta de Documentação para Registro Simplificado como Fitoterápico. v. 5, p. 20–33, 2010.

MARTINS, E. R.; LIMA, L. R.; CORDEIRO, I. *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*) no estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 65, n. 2, p. 405–424, 2014.

MEDEIROS, M. A. et al. MATURAÇÃO FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 17–24, 2010.

MELO, J. G. DE et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 27–36, 2007.

NAIK, A. D. .; JUVEKAR, A. R. Effects of alkaloidal extract of *Phyllanthus niruri* on HIV replication. **Indian journal of medical sciences**, v. 57, n. 9, p. 387, 2003.

- NAKADA, P. G. et al. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, n. July 2014, 2010.
- NETO, C. K. et al. Métodos para superação de dormência em sementes de tomateiro arbóreo (*Solanum betaceum*). **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 45, n. 4, p. 420–425, 2015.
- OKOLI, C. O. et al. Evaluation of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 248–259, 2010.
- PHONDANI, P. C. et al. Promoting medicinal plants cultivation as a tool for biodiversity conservation and livelihood enhancement in Indian Himalaya. **Journal of Asia-Pacific Biodiversity**, v. 9, n. 1, p. 39–46, 2016.
- POPINNIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1985.
- PORTO, C. R. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Phyllanthus niruri* spray-dried standardized extract. v. 23, n. 1, p. 138–144, 2013.
- RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522–531, 2002.
- SAVAGE, W. E. F.; MERTZGER, G. L. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, n. 501–523, 2006.
- SCHIPPMANN, U.; LEAMAN, D. J.; CUNNINGHAM, A. B. Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. **Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries**, n. October, p. 12–13, 2002.
- SHAKILA, ARUMUGAM RAJESWARI, R. Effect of GA₃, certain chemicals and media on germination, growth and yield of *Phyllanthus niruri*. **Plant Archives**, v. 6, n. 1, p. 121–125, 2006.
- SILVEIRA, A. M. M.; VILLELA, F. A.; TILLMANN, M. A. A. MATURAÇÃO FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE CALÊNDULA (*Calendula officinalis* L.) 1. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p. 31–37, 2002.
- SURESH, U. et al. Tackling the growing threat of dengue: *Phyllanthus niruri*-mediated synthesis of silver nanoparticles and their mosquitocidal properties against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 4, p. 1551–1562, 2015.
- TEIXEIRA, B. P. et al. **A Fitoterapia no Brasil: da Medicina Popular à regulamentação pelo Ministério da Saúde**, 2002.
- TUNG, L. D.; SERRANO, E. P. Effects of warm water in breaking dormancy of rice seed. **Omonrice**, v. 136, p. 129–136, 2011.
- ULYSSEA, M.; AMARAL, L. DA G. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO GÊNERO *Phyllanthus* (EUPHORBIACEAE) OCORRENTE NA ILHA DE SANTA CATARINA, BRASIL. **INSULA**, n. 26, p. 1–28, 1997.
- VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- VEIGA, V. F. DA. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: Aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela

- população. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 308–313, 2008.
- VENTURI, S.; RANDI, A. M. Influencia da coloracao das sementes na germinacao de *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 11, n. 1, p. 87–94, 1997.
- VIDIGAL, D. S. et al. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 129–136, 2009.
- WEBSTER, G. L. STUDIES OF THE EUPHORBIACEAE, PHYLLANTHOIDEAE II. THE AMERICAN SPECIES OF PHYLLANTHUS DESCRIBED BY LINNAEUS. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 37, n. 1, p. 1–14, 1956.
- WEBSTER, G. L. A revision of phyllanthus (euphorbiaceae) in the continental United States. **Brittonia**, n. 1, p. 44–76, 1970.
- WHO. **Selected Medicinal Plants Vol. 4 Essential Medicines and Health Products Information Portal A World Health Organization resource**, 2005. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js16713e/>>
- ZHANG, X. **Regulatory situation of herbal medicines: A worldwide review**, 1998. Disponível em: <www.who.int/medicinedocs/pdf/whozip57e/whozip57e.pdf>

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS**ARTIGO 1****Aspectos físicos e fisiológicos de sementes de *Phyllanthus niruri* L. com diferentes cores**

GRANJA, J.A.A.¹; VASCONCELOS, M.C.¹; OLIVEIRA, A.S.¹; BÁRBARA, C.N.V.¹; MONFORT, L.H.F.¹; GUIMARÃES, R.M.¹

¹Departamento de agricultura, UFLA, Universidade Federal de Lavras CEP: 37200-000, Lavras-Brasil * joaoalmeida.antonio@gmail.com

Versão preliminar com vista a submissão no periódico Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

RESUMO: *Phyllanthus niruri* L., conhecida popularmente por quebra-pedra, é uma das espécies medicinais mais tradicionais conhecidas pela humanidade. A utilização popular é significativa e diversas pesquisas em relação aos aspectos farmacológicos estão sendo realizadas. Entretanto apesar de sua importância, poucos estudos agrônômicos foram realizados com essa espécie. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho analisar os aspectos biométricos, o comportamento germinativo e o espectro no infravermelho próximo das sementes de quebra-pedra, relacionando-os com a coloração das mesmas. As sementes foram separadas quanto à cor do tegumento em amarelas e marrons; foram avaliados os seguintes parâmetros: peso de mil sementes, análise de raios-X, biometria das sementes, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e os espectros no infravermelho próximo. Foram utilizadas quatro temperaturas (25, 30, 35 °C e alternada 25 - 35 °C) e dois regimes de luz (luz e escuro) para avaliar a germinação. Não foi observada germinação nas sementes amarelas e foi observada em sementes marrons maior porcentagem de germinação, assim como o IVG, a 25 °C. O maior peso de mil sementes foi nas sementes marrons, por apresentarem maior preenchimento, de acordo com os resultados da análise de Raio X. Em relação à biometria, não foi observada diferença significativa entre as cores. O espectro no infravermelho próximo diferenciou em dois pontos entre a coloração das sementes que corresponde as moléculas poliamida 11 e arilpropanóides.

Palavras – chave: Quebra–Pedra, biometria, morfologia. NIR.

ABSTRACT: *Phyllanthus niruri* L., popularly known as stone breaker, is one of the most traditional medicinal species known to mankind. The popular use is significant and several researches regarding the pharmacological aspects are being carried out. However, despite its importance, few agronomic studies were conducted with this species. Thus, the objective of this work was to analyze the biometric aspects, the germinative behavior and the infrared spectrum close to the rock breaking seeds, relating them to their coloration. The seeds were separated as to the color of the tegument in yellow and brown; The following parameters were evaluated: weight of one thousand seeds, X-ray analysis, seed biometry, germination, germination speed index (IVG) and near-infrared spectra. Four temperatures (25, 30, 35 °C and alternating 25 - 35 °C) and two light regimes (light and dark) were used to evaluate germination. No germination was observed in the yellow seeds and a higher percentage of germination was observed in brown seeds, as well as the IVG, at 25 °C. The highest weight of one thousand seeds was in the brown seeds, because they presented greater filling, according to the results of the X-ray analysis. Regarding the biometry, no significant difference between the colors was observed. The near infrared spectrum differentiated into two points between the seed coloration corresponding to the polyamide 11 and arylpropanoid molecules.

Key – words: Break Stone, Biometrics, morphology, NIR.

INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de plantas medicinais mais utilizadas destaca-se *Phyllanthus niruri* L. conhecida popularmente no Brasil como quebra-pedra. Esta espécie está presente nos sistemas médicos mais tradicionais do mundo como, no sistema médico Chinês, no Jamu Indonésiano e na Ayurveda (sistema médico tradicional da Índia), ressaltando assim a sua importância na história médica global (BAGALKOTKAR et al., 2006). *P. niruri* é utilizada popularmente para o tratamento de diversas enfermidades como: diabetes, malária, febre, diarreia, urolitiase, entre outras (OBIDIKE et al., 2010). Em sua composição química está presente uma ampla gama de metabólitos secundários, prováveis responsáveis pela vasta aplicação medicinal desta planta. Além disso, em pesquisas tem sido observada a promissora utilização desta como hepatoprotetora (LIU et al., 2014), larvicida em relação ao mosquito *Aedes aegypti* (SURESH et al., 2015), anti-inflamatória e

antinociceptiva (Obidike et al. , 2010), anti HIV (NAIK & JUVEKAR, 2003), antidiabética (OKOLI et al., 2010), urolitiáse (MARQUES, 2013) entre outras.

Ainda que a espécie seja bem explorada do ponto de vista de suas aplicações médicas, existem poucos estudos de cunho agrônômico e, por conseguinte, há poucas informações sobre seu comportamento ecofisiológico, principalmente no que diz respeito às características da semente e os aspectos da germinação.

Sementes de quebra-pedra apresentam um fenômeno denominado heteromorfia e pode ser dividida em duas cores: amarela e marrom (VENTURI & RANDI, 1997). Essa diferença de cor pode estar associada à maturidade fisiológica, sendo o aspecto morfológico considerado muitas vezes um indicativo relacionado aos estádios de maturação fisiológica (CASTELLANI et al., 2007). Quando a semente chega nas etapas finais desse processo e atinge o denominado ponto de maturidade fisiológica, elas alcançam o máximo de vigor e viabilidade, o que pode ser indicado pelo acúmulo máximo de matéria seca e de parâmetros adicionais, como peso, tamanho e teor de água, culminando em um maior potencial de germinação (AVILA et al., 2009). Este processo geralmente é acompanhado por visíveis mudanças no aspecto externo e na coloração dos frutos e das sementes para a maioria das espécies (ALVES et al., 2005).

Também podem ser observadas alterações na composição química das sementes conforme o desenvolvimento destas (NAKADA et al., 2011). Diversas técnicas são utilizadas na elucidação da composição química das sementes e uma com grande potencial para servir como indicativa desse aspecto é a Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), que vem sendo uma técnica promissora na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada na área de química de produtos naturais e de transformações orgânicas (LIMA & BAKER, 2011). Essa técnica utiliza

uma espectroscopia vibracional que emprega radiação eletromagnética na faixa de energia correspondente ao espectro de comprimentos de onda de 750 a 2.500 nm, sendo que a quantidade de luz absorvida é proporcional à concentração dos grupos funcionais de acordo com a lei de Beer (estabelece relação entre a absorbância de uma solução e a sua concentração, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática) em dispersão nos meios, tais como em insumos agrícolas (AGELET et al., 2012).

Diante da carência de estudos de cunho agrônomo com a espécie e sabendo que esse tipo de estudo é fundamental quando se trata de conhecimentos para a domesticação da planta.

Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho analisar os aspectos biométricos, o comportamento germinativo e o espectro no infravermelho próximo das sementes de quebra-pedra, relacionando-os com a coloração das mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras. As sementes de *P. niruri* utilizadas foram cedidas por meio de parceria com o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP (CPQBA/UNICAMP). As exsiccatas para identificação taxonômica e preservação estão depositadas no herbário da Unicamp sob código UEC 112740.

As sementes foram coletadas a partir dos frutos que se abriram durante o processo de secagem; foram peneiradas e assopradas para limpeza. Os plantios foram realizados no campo experimental da UNICAMP. A colheita pela qual essas sementes foram obtidas foi realizada em 2013.

Antes do início das análises as sementes foram separadas visualmente, com auxílio de lupa, em duas colorações: amarela e marrom. Após a separação por cor, as sementes foram avaliadas pelos seguintes testes e determinações:

Grau de umidade: foi determinado por meio do método gravimétrico com a utilização de estufa a 130°C (BRASIL, 2009) que se baseia no peso da água removida das sementes durante sua permanência na estufa. Como as sementes da espécie em estudo são de pequeno tamanho, o tempo de permanência na estufa foi curto (2 horas) e a massa de sementes utilizada para o teste foi de 0,1g. Devido a esse mesmo fator, não foram usados os recipientes convencionais para esse teste, mas pequenos recipientes feitos com papel alumínio.

Peso de mil sementes: foi separada uma amostra de trabalho com oito repetições de 100 sementes cada provenientes da porção “Semente Pura” para cada coloração. As sementes foram contadas manualmente e as repetições foram pesadas em balança de precisão (BRASIL, 2009).

Análise de raios X: Foi utilizada para verificar a proporção de sementes cheias e sementes vazias, além de poder detectar danos mecânicos na semente. O procedimento foi realizado utilizando quatro repetições com 50 sementes cada para ambas as colorações. As sementes foram classificadas em cheias e vazias. Os dados foram mostrados em porcentagem.

Biometria das sementes: As características biométricas, circularidade, diâmetro e perímetro, das sementes foram aferidas por meio da captura de imagem semi-automatizada do Sistema de Análise de Sementes (SAS), versão mini. Para essa análise foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes cada para ambas as colorações.

Espectroscopia de Infravermelho próximo (NIR): As amostras foram submetidas à análise de espectroscopia de infravermelho e os espectros foram gerados por meio do detector FT-IR, acoplado ao equipamento Tensor 27 da Bruker®. O software utilizado no equipamento foi o OPUS_ Spectroscopy Version 6, do mesmo fabricante. Para a construção do modelo PLS-DA (regressão por mínimos quadrados parciais com análise discriminante) para diferenciação das sementes foram obtidos espectros NIR de 35 amostras para cada cor. Para a construção do modelo de calibração realizou-se o pré-processamento dos números de onda por correção multiplicativa de sinais e em seguida foi utilizado o método de classificação multivariada por mínimos quadrados parciais com análise discriminante, em que as classes (y) são as variáveis dependentes e os espectros NIR obtidos dessas amostras as variáveis independentes (ABDI, 2003).

Os dados da espectroscopia no infravermelho próximo foram avaliados por meio de regressão por mínimos quadrados parciais com o auxílio do programa estatístico Chemoface® (NUNES et al., 2012). A determinação dos prováveis grupos funcionais químicos presentes nas sementes foi realizada com o auxílio do livro *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy* (WORKMAN JR. & WEYER, 2012) que contém uma tabela que correlaciona os comprimentos de onda (cm^{-1}) com os grupos funcionais.

Teste de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG): foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes por cor. Sementes das subamostras foram semeadas em gerbox sobre o papel mata borrão, umedecido com 2,5 vezes o peso do substrato em água destilada, mantidas em BOD, em diferentes faixas de temperatura (25, 30, 35°C e alternada 25 - 35°C) e sob duas condições de luz (luz e escuro), construindo assim um fatorial 2 x 4 x 2. Apesar de a espécie estudada não

está catalogada nas Regras para Análise de Sementes (2009), as avaliações das plântulas foram realizadas com base nestas. O IVG foi calculado pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a sementeira e a germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962). O fatorial montado nesse experimento foi 2x4x2 (cor x temperatura x luz).

Teste de Tetrazólio: As sementes remanescentes no final do teste de germinação, foram colocadas em micro tubos e submersas em solução de tetrazólio a 0,5%. Protegidas da luz, as sementes foram acondicionadas por 2 horas em B.OD. à temperatura de 40°C. Após esse procedimento, as sementes foram retiradas dos micro tubos e foram analisadas com auxílio de lupa de bancada para verificar se houve a coloração do embrião.

Análise estatística: o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes para o teste de germinação e IVG, e quatro repetições de 50 sementes para as análises de raios-X e biométrico. Foi observado que para a germinação e IVG houve muitos valores nulos, então uma metodologia de transformação de dados teve que ser utilizada.

A transformação utilizada foi o procedimento Box Cox (BOX & COX, 1964), que é geralmente usado para essa situação (DAL'COL LÚCIO, 2011). Para valores nulos esse procedimento fica restrito, por isso utilizou-se a variável somada a uma constante. Adotou-se o procedimento proposto por Yamamura (1999), com o parâmetro $c = 0,5$, gerando assim as expressões:

$$f(y) = \frac{(y + 0,5)^\lambda - 1}{\lambda}, \lambda \neq 0, e$$

$$f(y) = \ln(y + 0,5), \lambda = 0$$

que é a família de transformações Box-Cox, acrescida do parâmetro $c = 0,5$.

Após a transformação dos dados, estes foram submetidos à análise de variância no aplicativo computacional SISVAR[®] e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Para a análise de raios-X, biométrica e peso de mil sementes, biométrico os dados foram submetidos à estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na determinação do peso de mil sementes, observou-se maior valor de massa para as sementes marrons, com valor de 512,5 mg para mil sementes, o que permite inferir que 1 grama de sementes marrons da espécie em estudo contém cerca de 2000 sementes. Nas sementes amarelas a massa encontrada foi de 345 mg para mil sementes, o que significa cerca de 3000 sementes em 1 grama. De modo inverso, observou-se menores valores do grau de umidade nas sementes marrons (7,92%) quando comparadas com as amarelas (8,73%).

Em relação à análise de raios X, foi observado que 77% das sementes marrons e 2% das sementes amarelas, estavam totalmente preenchidas. Conseqüentemente, observaram-se valores inversos aos descritos acima, para o número de sementes vazias, sendo 7% para sementes marrons e 79,5% para as sementes amarelas. Esses resultados explicam em parte a relação inversamente proporcional entre o teor de água e o peso de mil sementes.

Apesar do teor de água interferir diretamente no peso das sementes e em alguns casos, esses parâmetros serem diretamente proporcionais (POZITANO et al., 2011), no presente trabalho observou-se uma relação inversamente proporcional entre os dois parâmetros, resultado esse similar ao observado por Medeiros & Granjeiro (2010). O aumento no peso de mil sementes juntamente com a diminuição do teor de água pode ser um indicador da proximidade do ponto de maturidade fisiológica da semente (RAGAGNIN et al., 1994; IOSSI et al., 2007).

Entretanto foi constatada, no presente estudo, uma elevada porcentagem de sementes amarelas vazias, o que pode explicar a diferença de peso e de umidade entre as sementes de diferentes colorações. Como o teor de água é calculado com base em massa (BRASIL, 2009) e as sementes amarelas, por estarem em sua maioria vazias (logo mais leves), pode explicar a variação observada no grau de umidade. Além disso, a composição química do tegumento pode influenciar no teor de água das sementes (CAVARIANI, et al., 2009). O tegumento das sementes amarelas pode ter uma composição química que possibilite uma maior retenção de água, o que se reflete em um maior teor de água nessas sementes.

Quanto à biometria das sementes, foi observado que os valores para os parâmetros circularidade, diâmetro máximo e mínimo e perímetro de sementes amarelas e marrons mantiveram-se semelhantes entre si (Tabela 1).

TABELA 1: Intervalo de variação dos valores para os parâmetros biométricos das sementes de *P. niruri*.

Cor	Circularidade			Diâmetro longitudinal (mm)			Diâmetro equatorial (mm)			Perímetro (cm)		
	Mín	med	máx	mín	med	máx	mín	med	máx	mín	med	máx
Amarela	0,6	0,7	0,9	1,2	1,4	1,6	0,9	1,0	1,1	0,4	0,4	0,5
Marrom	0,6	0,7	0,8	1,2	1,3	1,5	0,7	1,0	1,1	0,3	0,4	0,6

Os aspectos fisiológicos das sementes podem estar relacionados ao seu tamanho e refletem características sobre sua maturidade fisiológica. De Avila et. al. (2009) observaram essa correlação em *Eugenia uniflora* L. em sementes menores houve maiores valores de porcentagem de germinação. A tendência na diminuição do tamanho das sementes pode ser explicada pela fase de dessecação, que ocorre na última etapa do desenvolvimento das sementes e que ocasiona uma redução no tamanho destas (CASTRO et al., 2004).

Entretanto, para algumas espécies, os dados biométricos das sementes não são bons parâmetros para estimar o seu ponto de maturidade fisiológica, como no caso de *Phoenix roebelenii* O'Brien, que teve comportamento semelhante ao ocorrido para a *P. niruri*, não apresentando diferenças consideráveis nos valores das medidas biométricas das sementes (IOSSI et al., 2007).

Uma possível explicação para a mínima variação nos aspectos biométricos das sementes de algumas espécies se dá devido ao potencial destas de regular a quantidade de sementes por fruto em vez de interferir no desenvolvimento da semente (MACEDO et al., 2009).

Com os resultados do teste de germinação foi possível observar que apenas as sementes marrons germinaram (Tabela 2). Na porcentagem de germinação e no IVG das sementes marrons foi observada dupla interação entre os fatores luz x cor e temperatura x cor. A temperatura na qual foi observada maior porcentagem de germinação foi a de 25 °C e a que se observou o menor valor foi na de 35 °C (Tabela 2).

Esses resultados estão de acordo com o que Venturi & Randi (1997) observaram quando trabalharam com essa mesma espécie. Unander et al. (1995)

em um trabalho com *Phyllanthus amarus* L., também observaram essa germinação diferencial em relação a coloração da semente.

TABELA 2: Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *P. niruri* em relação à cor e em diferentes faixas de temperatura.

Temperatura (°C)	Germinação (%)		IVG	
	Sementes Amarelas	Sementes Marrons	Sementes Amarelas	Sementes Marrons
25	0 Ba	12,25 Aa	0 Bb	3,13 Aa
30	0 Ba	7,00 Ab	0 Bb	2,68 Ab
35	0 Ba	2,25 Ac	0 Bb	2,06 Ac
25 – 35	0 Ba	8,00 Ab	0 Bb	2,83 Ab
Coefficiente de Variação (%)	8,58		11,95	

Letras maiúsculas representam a diferença estatística na linha, enquanto as letras minúsculas representam a diferença estatística na coluna. CV – Coeficiente de variação.

Foi observada no teste de tetrazólio diferença estatística significativa em relação ao tratamento e a coloração. As sementes remanescentes no final do teste de germinação submetidas a temperatura de 35°C foram as que tiveram menos viáveis (Tabela 3). Nas demais temperaturas não houve diferença. Em relação a cor, o número de remanescentes viáveis nas sementes marrons foi maior que nas sementes amarelas. Considerando a ausência de germinação das sementes amarelas e o conjunto de dados descritos acima, as sementes amarelas podem ser consideradas imaturas e mal formadas ou dormentes.

TABELA 3: Porcentagem de sementes remanescentes viáveis de acordo com a temperatura e a coloração das sementes.

	Temperatura			
	25°C	30°C	35°C	25-35°C
Sementes viáveis	20 A	16 A	6 B	17 A
	Sementes Amarelas		Sementes Marrons	
Sementes viáveis	12,5 B		17,5 A	

A temperatura pode afetar cada estágio do processo germinativo de diferentes maneiras, além de estar relacionada aos processos bioquímicos inerentes às sementes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; LOPES & FRANK, 2011). Temperaturas acima da faixa ideal, em geral reduzem a germinação e a velocidade

de germinação devido a possíveis danos na estrutura da semente, pelo impedimento do desenvolvimento do embrião causado por possíveis alterações enzimáticas, redução da quantidade de aminoácidos livres, prejuízos na síntese de RNA e modificação da velocidade de reações metabólicas (OLIVEIRA et al., 2011).

Em relação às condições de luz utilizadas (presença e ausência de luz), as maiores porcentagens de germinação foram observadas na presença de luz, mas foi observada germinação no escuro também (Tabela 4).

Tabela 4: Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *P. niruri* em relação à cor e nos dois sistemas de luz.

Condições de luz	Germinação (%)		IVG	
	Coloração		Coloração	
	Sementes Amarelas	Sementes Marrons	Sementes Amarelas	Sementes Marrons
Luz	0 Ba	15,5 Aa	0 Ba	2,92 Aa
Escuro	0 Ba	9,0 Ab	0 Ba	2,44 Ab
Coeficiente de variação (%)		8,58	11,95	

Letras maiúsculas representam a diferença estatística na linha, enquanto as letras minúsculas representam diferenças estatísticas na coluna. CV – Coeficiente de variação.

O caráter fotoblástico positivo pode ser considerado “preferencial” quando é verificada a ocorrência de pelo menos alguma germinação na e ausência de luz, e “absoluto” quando as sementes não apresentassem a capacidade de germinar sob ausência de luz. Desse modo, a semente pode ser classificada como fotoblástica positiva preferencial (KLEIN & FELLIPE, 1991), classificação que pode ser atribuída as sementes de *P. niruri*.

Venturi & Randi (1997) observaram esse mesmo comportamento em trabalho realizado com a mesma espécie. Entretanto os valores diferiram consideravelmente dos apresentados no presente trabalho, no qual na temperatura de 25°C, nas sementes marrons observaram-se 15,5% e 9% de germinação na presença e

ausência de luz, respectivamente, enquanto que no trabalho de Venturi & Randi, 1997 os valores foram 30% e 1%, respectivamente.

Para a análise de espectroscopia, no modelo utilizado para a diferenciação da composição química das sementes verificou-se alto percentual de acerto para calibração, validação cruzada, alto percentual de acerto para o teste de *Y* randomization e alto percentual de acerto para o teste de validação. Com esses resultados de calibração, conclui-se que a análise teve uma acurácia satisfatória na diferenciação das sementes pela coloração. Os resultados da calibração e validação do modelo estão representados na tabela 5.

TABELA 5: Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA (análise discriminante) para diferenciação de sementes de quebra - pedra.

	Acerto (%)
Calibração	100
Calibração (<i>y</i> - randomization)	27,5
Validação cruzada	100
Teste (validação externa)	100,00

Com a análise de componentes principais (Figura 1), as sementes amarelas e marrons foram agrupadas em pontos bem distintos, o que realça uma diferença na concentração de grupos funcionais entre as sementes de diferentes cores.

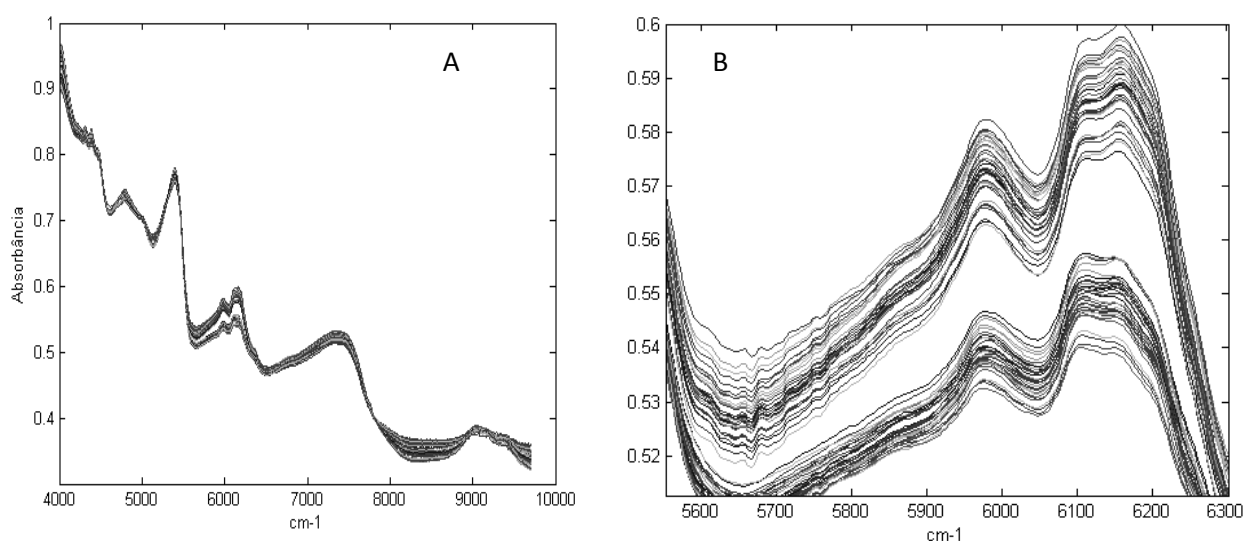


FIGURA 2: Representação dos espectros no infravermelho próximo obtidos de sementes de quebra – pedra com diferentes colorações (A). Representação mais detalhada da região dos pontos 5985 – 6150, onde foi observada a maior diferença entre os espectros das sementes marrons (espectro mais acima) e amarelas (espectro mais abaixo) (B).

Os grupos químicos com maior diferença entre as colorações das sementes foram observados nos pontos 5985 (correspondente aos radicais arilpropanóides) e 6180 (correspondente a poliamida 11). Esses compostos foram identificados em maior quantidade nas sementes marrons, o que corrobora a diferença na concentração de compostos químicos entre sementes de cores diferentes nessa espécie (Tabela 6).

TABELA 6 - Grupo funcional químico e tipo de composto químico presente nas sementes marrons e amarelas de *P. niruri* determinado por meio das faixas espectrais.

Faixa espectral (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de material
4587	N-H Proteína: N-H	Proteína/aminoácido
4785	O-H Polimérico (O-H)	Polissacarídeos
5100	N-H combinação de bandas de amidas primárias	Amidas primárias
5376	C – Cl orgânicos clorados	Hidrocarbonetos clorados
5587	OH - água	água
5985	C-H Aromático C-H (Aril)	C-H (aril)
6180	N-H poliamida	Poliamida 11
6494	O-H Polimérico (.O-H)	Amido/Polimérico, álcool

Fonte: Workman Jr. & Weyer, 2012.

Substâncias inibidoras da germinação, de diferentes categorias químicas podem estar presentes em sementes de diversas espécies (TOKUHISA et al. 2007) e dentre essas categorias, a dos compostos fenólicos se destacam. As moléculas de arilpropanóides são precursoras na formação deste tipo de composto (DEWICK, 2002), o que pode provocar dormência nas sementes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Entretanto com a degradação de compostos fenólicos, essas moléculas também são produzidas. Uma hipótese sugerida no presente trabalho é de que as sementes amarelas, que não estiverem vazias, possuem mais compostos fenólicos, fator que seria um dos responsáveis pela ausência de germinação destas. Nas sementes marrons já tem início a degradação desses compostos com o decorrer do processo de maturação fisiológica, originando assim as moléculas de arilpropanóides, cujo teor foi aparentemente maior nestas sementes.

Outra molécula que foi observada em sementes de ambas as cores, mas que do mesmo modo dos arilpropanóides, se apresentou em maior concentração nas sementes marrons, foi a poliamida 11. Esse grupo químico é um polímero produzido a partir de matéria-prima renovável de origem vegetal, (óleo de mamona). É um termoplástico ecológico que não libera componentes orgânicos voláteis; é considerado um material com alto nível de desempenho e com respostas eficazes para um crescente número de aplicações. Entretanto a função biológica dessa molécula nas sementes permanece oculta.

Com as alterações químicas observadas, é possível confirmar que há diferenças na concentração de determinados compostos entre as sementes de diferentes cores e ainda obter um indicativo de quais componentes estão presentes em maior quantidade nas sementes.

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, a não germinação das sementes amarelas não pode ser atribuída, com certeza, a imaturidade fisiológica da semente. A observação de um elevado número de sementes amarelas vazias faz com que surja a possibilidade de má formação ou até de não formação dessas sementes. Nas sementes escuras foi constatada germinação, entretanto esta foi muito baixa, o que indica a possibilidade de dormência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Ilio Montanari Jr. e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP (CPQBA/UNICAMP) pelo fornecimento das sementes para o desenvolvimento do trabalho e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AGELET, L.E.; et al, Measurement of single soybean seed attributes by near-infrared technologies. A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8314–8322, 2012.
- ALVES, Edna Ursulino et al. Maturação fisiológica de sementes de sabiá. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 2005.
- APARECIDA DE MEDEIROS, et al.. Maturação fisiológica de sementes de maxixe (*Cucumis anguria* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 017-024. 2010.
- BAGALKOTKAR,G. et al.. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 58, p.1559-1570, 2006.
- BOX GEP; COX DR.. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Society**, 26: 211-252, 1964.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J.. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, . 588p, 2000

- CASTELLANI, E. D. et al. Colheita de frutos, extração e beneficiamento de sementes de solanáceas arbóreas. **Informativo ABRATES**, v. 17, n. 1-3, p.69-75, 2007.
- CASTRO, R.D. et al. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F.
- CAVARIANI, C. et al. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 030-039, 2009.
- DAL'COL L.A. et al.. Transformação box-cox em experimentos com pimentão em ambiente protegido. **Horticultura. brasileira**, v. 29, n. 1, 2011.
- DE AVILA, A.L. et al.. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L.(Pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 1, p. 61-68, 2009.
- DEWICK, P,M.. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2.ed. Chinchester: John Wiley & Sons,. 515,p, 2002.
- HACISALIHOGU et al.,. Near-infrared reflectance spectroscopy predicts protein, starch, and seed weight in intact seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, 2010.
- IOSSI, E. et al. Maturação fisiológica de sementes de *Phoenix roebelenii* O'Brien1. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 147-154, 2007.
- KLEIN, A. L.; FELIPPE, G. M. Efeito da luz na germinação de sementes de ervas invasoras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 7, p. 955-966, 1991.
- LEONHARDT, C. et al.. Maturação fisiológica de sementes de tarumã-de-espinho (*Citharexylum montevidense* (Spreng.) no Jardim Botânico de Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 100-107, 2001.
- LIMA, A.; BAKKER, J. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 341-351, 2011
- LIU, S. et al. 2014. In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of the lignan nirtetralin B isolated from *Phyllanthus niruri* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 62-68, 2014.
- LOPES, R. R; FRANKE, L. B. Aspectos térmico-biológicos da germinação de sementes de cornichão anual sob diferentes temperaturas. **Revista brasileira de zootecnia= Brazilian journal of animal science [recurso eletrônico]**. Viçosa, MG. Vol. 40, n. 10 (out. 2011), p. 2091-2096, 2011.
- LOPES, J.C. et al.. Influência de temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de bertalha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 18-24, 2005.
- MACEDO, M. C. et al. Biometry of fruit and seeds and germination of *Magonia pubescens* ST. Hil (SAPINDACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 202-211, 2009.

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

MARQUES, L. C.. *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) no Tratamento de Urolitíase: Proposta de Documentação para Registro Simplificado como Fitoterápico. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 5, n. 03, 2013.

MEDEIROS, M. A.; GRANGEIRO, L. C. Maturação fisiológica de sementes de maxixe (*Cucumis anguria L.*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 017-024, 2010.

MENDES, A. M. S et al.. Crescimento e maturação dos frutos e sementes de urucum. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 133-141, jan./abr, 2006.

NAIK, A. D.; et al.. Effects of alkaloidal extract of *Phyllanthus niruri* on HIV replication. **Indian journal of medical sciences**, v. 57, n. 9, p. 387, 2003.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 113-122, 2011.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

OBIDIKE, I.C. et al.. The anti-inflammatory and antinociceptive properties of the chloroform fraction from *Phyllanthus niruri* plants is mediated via the peripheral nervous system. **Journal of Dietary Supplements**, v.7, p. 341–350, 2010.

OKOLI, C. O. et al.. Evaluation of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, 2010.

OLIVEIRA, A.K.M. et al.. Germinação de sementes de *Aspidosperma tomentosum* Mart.(Apocynaceae) em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 3, p. 392, 2011.

POZITANO, M.et al.. Caracterização física e germinação de sementes de *Senna macranthera*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, 2011.

RAGAGNIN, L.I.M et al.. Maturidade fisiológica de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotzsch. **Ciência Florestal**, v.4, n. 1, p. 23 – 41, 1994.

SILVEIRA, F. A. O.. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Marctia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC.(Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 847-851, 2004

SOUZA, A.M.; BREITKREITZ, M.C.; FIGUEIRAS, P.R.; ROHWEDDER, J.J.R.; POPPI, R.J. experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.

SURESH, U. et al.. Tackling the growing threat of dengue: *Phyllanthus niruri*-mediated synthesis of silver nanoparticles and their mosquitocidal properties against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 114, n. 4, p. 1551-1562, 2015

TOKUHISA, D et al. Phenolic compound inhibitors in papaya seeds (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 180-188, 2007.

UNANDER, D.W.U et al.. Factors affecting germination and stand establishment of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae). **Economic Botany**, v.49, n.1, p.49-55, 1995

VENTURI, Silvia; RANDI, A. M.. Influência da coloração das sementes na germinação de *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus niruri* L.(Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 11, n. 1, p. 87-94, 1997

WORKMAN JR. J.; e Weyer, L. **Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. 2^o edição, CRC Press, 2012.

YAMAMURA K.. Transformation using $(x+0.5)$ to stabilize the variance of populations. **Journal Researches on Population Ecology** 42: 229-234, 1999.

ARTIGO 2

MÉTODOS DE SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE

Phyllanthus niruri L.

Versão preliminar com vista a submissão no periódico Seed Science Research

Resumo: *Phyllanthus niruri* L. é uma das plantas medicinais mais conhecidas e utilizadas pela humanidade. É conhecida popularmente como quebra-pedra e utilizada principalmente para auxiliar na eliminação de cálculos renais, porém há estudos comprovando também o seu potencial hepatoprotetor. Embora tenha importância farmacológica reconhecida, os estudos agrônômicos com essa espécie são escassos, especialmente em relação às características das sementes. Diante disso, com esse trabalho objetivou-se determinar se as sementes de *P. niruri* são dormentes, determinar a natureza da dormência e a influência de diferentes métodos na sua superação, bem como seu comportamento. Foram realizados três experimentos, utilizando diversos tratamentos de superação de dormência. No primeiro destes, foram estabelecidos quatro tratamentos, sendo estes: controle, água quente, KNO₃ 50Mm e GA₃ 10µM e dois regimes de luz (luz e escuro). Outros dois experimentos foram realizados a partir dos resultados desse primeiro teste, variando a concentração de KNO₃ combinando com GA₃, e o fotoperíodo. Em todos os experimentos foi realizado o teste de tetrazólio nas sementes remanescentes do teste de germinação. Foram avaliados a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de sementes viáveis. Foi constatado que as sementes apresentam dormência, sendo esta fisiológica, e que os tratamentos com KNO₃ nas concentrações de 50 e 100 Mm foram os mais efetivos na promoção da germinação e aumento do IVG.

Palavras – chave: KNO₃, GA₃, Quebra–Pedra, Qualidade fisiológica.

Abstract: *Phyllanthus niruri* L. is one of the medicinal plants most known and used by mankind. It is popularly known as stone breaker and used mainly to aid in the elimination of kidney stones, but there are studies also proving its hepatoprotective potential. Although recognized pharmacological importance, agronomic studies with this species are scarce, especially in relation to the characteristics of the seeds. The objective of this work was to determine if the seeds of *P. niruri* are dormant, to determine the nature of dormancy and the influence of different methods in their overcoming, as well as their behavior. Three experiments were carried out, using several treatments of dormancy overcoming. In the first of these, four treatments were established: control, hot water, 50MM KNO₃ and 10µM GA₃ and two light regimes (light and dark). Two other experiments were carried out from the results of this first test, varying the concentration of KNO₃ in combination with GA₃, and the photoperiod. In all experiments the tetrazolium test was carried out on the remaining seeds of the germination test. The percentage of germination, germination speed index (IVG) and percentage of viable seeds were evaluated. It was verified that the seeds present dormancy, being this physiological, and that the treatments with KNO₃ in the concentrations of 50 and 100 Mm were the most effective in the promotion of the germination and increase of the IVG.

Key Words: KNO₃, GA₃, Photoperiod, Break-Stone.

Introdução

Uma das plantas medicinais mais importantes e mais utilizadas pela população é *Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae), que é conhecida popularmente como quebra-pedra, esta é uma pequena erva amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e em ambos os hemisférios (Calixto et al. 1998; Khanna et al. 2002), sendo utilizada principalmente para eliminação de cálculos renais (Calixto et al. 1998; Bagalkotkar et al. 2006; Marques 2010). Além disso, pesquisas realizadas em sua maioria *in vitro* e com animais, confirmam propriedades hepatoprotetoras, redutoras de lipídios na corrente sanguínea, antioxidantes e antidiabéticas (Khanna et al. 2002; Sabir & Rocha 2008; Okoli et al. 2010; Liu et al. 2014) . Essa espécie está presente nos sistemas médicos mais antigos e tradicionais da humanidade como a medicina tradicional Chinesa, o Jamu Indonesiano e a medicina tradicional hindu, (Bagalkotkar et al., 2006).

Assim como na maioria das espécies medicinais, apesar dos diversos estudos das propriedades farmacêuticas e medicinais dessa planta, existem poucos trabalhos sobre os aspectos do seu cultivo e germinação. De acordo com os resultados dos poucos trabalhos com *P. niruri* nessa área, tem sido observado que a germinação nessa espécie é baixa e desincronizada (Venturi & Randi 1997) e um dos fatores que pode levar a isso é a dormência nas sementes.

A dormência pode ser identificada quando sementes viáveis e intactas não germinam sob condições favoráveis para que esse processo ocorra. Isso caracteriza uma adaptação ecológica das espécies para sobreviver às condições ambientais adversas (Adkins et al. 2002; Baskin & Baskin 2004) e esse fenômeno pode ser provocado por mecanismos ligados ao tegumento ou ao embrião propriamente dito. Quando a dormência está ligada ao tegumento, esta pode ser provocada pelo impedimento da entrada de água na semente, bloqueio da protrusão radicular devido a dureza desse envoltório ou a presença de substâncias químicas inibidoras neste (Adkins et al., 2002). Quando relacionada com o embrião, a dormência pode ser classificada em: morfológica e fisiológica.

A dormência morfológica ocorre quando o embrião está imaturo, enquanto a fisiológica está associada à presença de substâncias inibidoras no próprio embrião (Adkins et al. 2002). Além dos fatores intrínsecos mencionados acima, a dormência pode estar associada a fatores extrínsecos, tais como temperatura, luz, umidade e substrato (Bewley & Black, 1994).

Apesar de ser uma adaptação que favorece a sobrevivência da espécie, esta passa a ser um problema do ponto de vista tecnológico, quando as sementes são utilizadas para produção de mudas, em virtude do longo tempo para que ocorra a germinação, o que favorece o ataque de fungos podendo acarretar em grandes perdas (Popnigis 1985; Fowler & Bianchetti 2000).

Diversos métodos são conhecidos e podem ser testados para a superação da dormência. No caso de dormência provocada por impermeabilidade do tegumento ou presença de substâncias inibidoras no mesmo, pode ser utilizado o procedimento de escarificação (remoção do tegumento por meio do uso de agentes químicos ou físicos), imersão em água fervente, resfriamento ou corte de uma parte do tegumento. Entretanto a duração desses tratamentos podem não ser o suficiente para quebrar a dormência (Tung & Serrano 2011). Alguns compostos químicos (ácidos nítrico e sulfúrico, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio) também são utilizados para escarificar sementes (Tung & Serrano 2011), porém o seu uso pode acarretar danos no embrião, danos mecânicos e rompimento de células essenciais do tegumento, favorecendo assim a entrada de fungos (Rolston 1979; Smiderle & Sousa 2003).

Para a superação da dormência fisiológica, são utilizados os métodos de estratificação e aplicação de soluções promotoras da germinação, como soluções de KNO_3 , giberelinas, tiouréia, entre outras (Çetinbaş & Koyuncu 2006; Neto et al. 2015).

Além disso, a luz é uma variável que também pode ser utilizada na promoção da germinação e superação da dormência (Copeland & McDonald 2001; Vaz Mondo et al. 2010). A luz funciona por meio do estímulo do fitocromo, produzindo respostas germinativas nas sementes e desse modo, a presença ou ausência de luz pode promover a germinação em algumas espécies (Crepaldi et al. 1998).

Todas as estratégias mencionadas apresentam diversas vantagens e desvantagens e desse modo, na escolha de uma metodologia para a superação da dormência devem ser levadas em conta a praticidade e o custo do método. Além disso a técnica utilizada deve ser eficaz na superação da dormência sem prejudicar as sementes não dormentes que podem estar no lote (Eira et al. 1993).

Devido à escassez de estudos com essa abordagem para a espécie *P. niruri* e com vista em fornecer ferramentas para o cultivo e uma possível domesticação dessa espécie, com esse trabalho objetivou-se determinar se as sementes de *P. niruri* são dormentes e se sim, determinar a natureza da dormência e a influência de diferentes métodos de sua superação.

Material e métodos

Local do experimento e obtenção das sementes

Os experimentos foram executados no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras. As sementes de *P. niruri* utilizadas foram obtidas por meio de parceria com o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP (CPQBA/UNICAMP). As exsicatas para identificação taxonômica e preservação estão depositadas no herbário da Unicamp sob código UEC 112740.

As sementes foram coletadas a partir de plantios realizados no campo experimental da UNICAMP. Os frutos foram secados no secador, na temperatura de 40°C. Esse processo provocou a abertura dos frutos e assim as sementes foram colhidas, peneiradas e assopradas para limpeza. As sementes utilizadas no presente trabalho foram colhidas em 2013 e o experimento foi executado em 2014

Foi observado heteromorfia nas sementes, podendo estas ser divididas em duas cores: amarela e marrom. Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de estudo, foi observado que as sementes amarelas não germinaram, e desse modo só foram utilizadas sementes marrons no presente estudo.

Tratamentos para a superação da dormência

Experimento 1

As sementes foram semeadas em caixas plásticas tipo gerbox sobre o papel mata borrão e mantidas em BOD na temperatura de 25 °C. Na testemunha, esse papel foi umedecido com 2,5 vezes o seu peso com água destilada. Nos tratamentos para a superação da dormência, no lugar de água, o papel foi umedecido com solução de KNO₃ na concentração de 50mM, solução de GA₃ (10µM). Em outro tratamento, as sementes foram imersas em água quente (100 °C) e foram deixadas em repouso até que a temperatura estabilizasse a 25 °C. Nesse tratamento em específico, as sementes foram secadas parcialmente com papel toalha e quando semeadas, o papel mata borrão foi umedecido com água destilada.

Todos os tratamentos foram submetidos a dois regimes de luz (presença e ausência de luz), sendo que o sistema com luz teve luz por 24 horas. As caixas que ficaram no escuro foram envolvidas com papel alumínio e quando foi feita a avaliação, essa foi realizada em uma sala com luz verde. A condução do experimento gerou um fatorial 4x2.

Experimento 2

A partir dos resultados do primeiro experimento, outros tratamentos foram elaborados para a condução de outro experimento. Os tratamentos foram: Testemunha, que foi instalado da mesma forma que a testemunha no experimento 1 e os métodos de superação de dormência foram: papel mata borrão umedecido com solução de KNO_3 na concentração de 50mM, solução de KNO_3 na concentração de 100mM, solução de GA_3 na concentração de 10 μM , solução de KNO_3 50mM + GA_3 10 μM e solução KNO_3 100mM + GA_3 10 μM . Os demais procedimentos, inclusive os sistemas de luz, foram idênticos ao experimento 1. O fatorial gerado foi de 6x2.

Experimento 3

Baseado nos resultados dos experimentos anteriores, em que os melhores resultados foram obtidos com KNO_3 , foram instalados novos tratamentos que ampliassem a gama de concentração desse composto. As concentrações utilizadas foram: 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM e 300mM. Para cada concentração foram utilizadas 8 repetições com 50 sementes cada, sendo que quatro dessas repetições ficaram expostas a um fotoperíodo com 24h de luz e as outras quatro repetições foram submetidas a um fotoperíodo de 16/8. Os demais procedimentos foram idênticos aos experimentos anteriores. O fatorial gerado foi de 7x2.

Teste de Tetrazólio

As sementes remanescentes do teste de germinação de todos os experimentos foram colocadas em micro tubos e submersas em solução de tetrazólio a 0,5%. Protegidas da luz, as sementes foram acondicionadas por 2 horas em B.OD. à temperatura de 40°C. Após esse procedimento, as sementes foram retiradas dos micro tubos e foram analisadas com auxílio de lupa de bancada, para verificar se houve coloração no embrião.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as avaliações foram realizadas com base nas Regras para Análise de Sementes (2009). O IVG foi calculado pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962).

No primeiro e no terceiro experimentos, para a germinação e IVG, os dados apresentaram muitos valores nulos e por isso uma metodologia de transformação de dados teve que ser utilizada. A transformação utilizada foi a mesma usada por Lúcio et al. (2011). Utilizou-se a metodologia Box-Cox (Box & Cox 1964) com a adaptação realizada por Yamamura (1999), com o parâmetro $c=0,5$, gerando assim as expressões:

$$f(y) = \frac{(y + 0,5)^\lambda - 1}{\lambda}, \lambda \neq 0, \text{ e}$$

$$f(y) = \ln(y + 0,5), \lambda = 0$$

que é a família de transformações Box-Cox, acrescida do parâmetro $c=0,5$. Após a transformação dos dados, estes foram submetidos à análise de variância no aplicativo computacional SISVAR[®] e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

No segundo experimento também foi necessária a transformação de dados (germinação e IVG), porém como não foi observado valores nulos, a transformação utilizada foi arco seno ($\sqrt{x/100}$).

Resultados

Experimento 1

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) apenas em relação aos tratamentos de superação de dormência, não sendo verificada interação ou variação significativa em relação a luminosidade. Dentre os tratamentos, o com KNO_3 foi o que promoveu maior potencial de germinação (Figura 1). A testemunha e o tratamento com giberelina, não diferiram entre si e no tratamento com água quente não houve germinação.

A velocidade de germinação não foi afetada pelos tratamentos e nem pela luminosidade.

A porcentagem de sementes remanescentes viáveis ficou em torno de 20%, com exceção do tratamento com água quente, no qual nenhuma semente corou quando submetidas ao teste do tetrazólio, e assim foram consideradas mortas (Figura 2). Quando foi analisado o potencial de germinação (sementes não germinadas viáveis + sementes germinadas), não houve diferença significativa entre os tratamentos cujas sementes apresentaram alguma

germinação (Figura 3). Com esses resultados foi possível concluir que a semente de *P. niruri* são dormentes, já que nos tratamentos nos quais a germinação foi mais alta o número de sementes remanescentes viáveis do teste de germinação, foi menor que no controle.

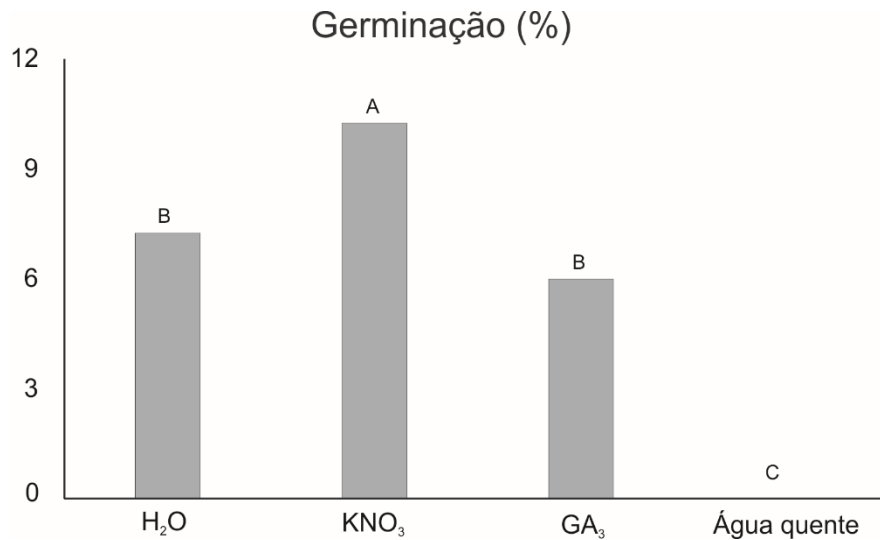


Figura 1: Porcentagem de germinação das sementes de *Phyllanthus niruri* L. em diferentes tratamentos para a superação da dormência.

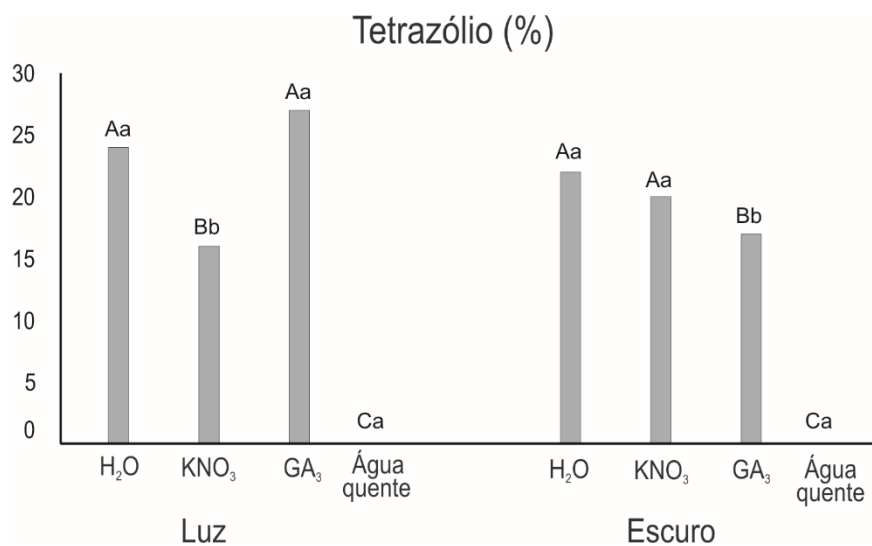


Figura 2: Porcentagem de sementes remanescentes viáveis após o teste de germinação observada no teste de tetrazólio. Letras maiúsculas representam diferença dentro de cada luminosidade, enquanto as letras minúsculas representam a diferença entre as luminosidades.

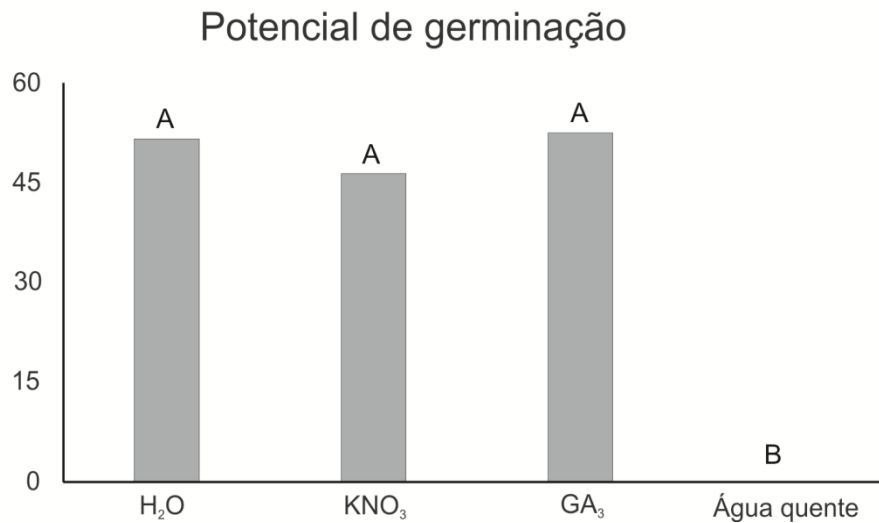


Figura 3: Potencial de germinação das sementes de *P. niruri* que é obtido pela soma das sementes germinadas com as sementes viáveis. Os valores são mostrados em porcentagem.

Experimento 2

Foi observada diferença significativa para os fatores Tratamento de quebra de dormência e regime de luz, mas não houve interação no que se refere a germinação. Dentre os tratamentos, todos que possuíam KNO₃ promoveram a germinação; a testemunha e o tratamento com GA₃ apresentaram os menores valores e não diferiram entre si e foi observado que a adição de GA₃ nas soluções de KNO₃ não alterou de modo significativo a germinação. Por meio do teste de tetrazólio foi constatado que o tratamento controle apresentou menos sementes viáveis que os demais, e estes não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação dos efeitos na germinação dos tratamentos de quebra de dormência na porcentagem de germinação em sementes de *Phyllanthus niruri* e porcentagem de sementes remanescentes viáveis observadas no teste de tetrazólio.

Tratamento de Superação de dormência	% de Germinação	% de Sementes viáveis
Controle	16,5 B	16 B
KNO ₃ 50 mM	26,2 A	39,5 A
KNO ₃ 100 mM	27,5 A	33,5 A
GA ₃	15,5 B	27 A
KNO ₃ 50mM + GA ₃	22,2 A	34 A
KNO ₃ 100mM + GA ₃	32,2 A	44,8 A
C.V.	21,6	18

A presença de luz favoreceu significativamente a germinação, apesar de ter sido observada germinação na ausência de luz (25,9% e 20,75 % respectivamente).

Nos dados do IVG foi observada interação entre os fatores luminosidade e tratamentos para quebra de dormência, sendo que na presença de luz não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos. Já no escuro, não foi observada diferença significativa nas sementes do controle e as tratadas com GA₃ enquanto que nos demais tratamentos, os quais continham KNO₃ os valores foram maiores (Tabela 2).

Tabela 2: Interação entre os fatores tratamento para a superação da dormência e regime de luz para os valores de IVG em diferentes tratamentos para a superação da dormência em sementes de *P. niruri*.

Tratamentos para superação de dormência						
Regime de luz	Controle	KNO ₃ 50 mM	KNO ₃ 100mM	GA ₃	KNO ₃ 50mM + GA ₃	KNO ₃ 100mM + GA ₃
Luz	2,31 Aa	2,08 Aa	2,34 Aa	1,66 Aa	2,25 Aa	2,67 Aa
Escuro	0,76 Ab	2,54 Aa	2,55 Aa	0,99Ab	2,33 Aa	2,96 Aa
C.V.	21,46					

Letras maiúsculas representam a diferença estatística na linha, enquanto as letras minúsculas e apresentam a diferença estatística na coluna.

Experimento 3

Foi constatada diferença estatística significativa para os fatores “tratamento” e “fotoperíodo” mas não a interação. Os tratamentos que promoveram o maior potencial de germinação foram os com concentrações de 50, 100 e 150mM de KNO₃. Houve germinação no tratamento com a concentração de 200mM de KNO₃ mas foi menor do que a do Controle. Não foi observada germinação na concentração de 300mM de KNO₃ (Tabela 3).

Já em relação ao fotoperíodo, aquele que mais estimulou a germinação foi o de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, no qual foi observada uma porcentagem de germinação de 6,5 % contra 5,0% no fotoperíodo de 24 horas.

Com relação as sementes viáveis pelo teste de tetrazólio, só foi observada diferenças estatísticas significativas apenas em relação aos tratamentos, sendo que as maiores porcentagens de sementes viáveis foram observadas nos tratamentos Controle, KNO₃ 100 e KNO₃ 150.

Tabela 3: Porcentagem de germinação de cada tratamento em cada fotoperíodo e porcentagem de sementes remanescentes viáveis de *P. niruri* submetidas aos tratamentos para a superação da dormência.

Fotoperíodo	Tratamento						
	Controle	KNO ₃ 50 mM	KNO ₃ 100 mM	KNO ₃ 150 mM	KNO ₃ 200 mM	KNO ₃ 250 mM	KNO ₃ 300 mM
24 h	11,5 B	21,5 A	16 A	16,5 A	5 C	0,5 D	0 D
16/8 h	14 B	21 A	25,5 A	17,5 A	12,5 C	1 D	0 D
C.V.				15,81			
Tetrazólio (%)	20,75 A	13 B	19,12 A	18 A	7,25 C	2,25 D	1,5 D
C.V.				31,54			

Os resultados obtidos com IVG revelaram um padrão semelhante com o observado para germinação, no entanto os valores para a concentração de 150mM foram significativamente inferiores às concentrações de 50 e 100mM e estatisticamente iguais ao controle.

Discussão

Com os resultados obtidos nos experimentos, foi observado que os tratamentos que promoveram maior porcentagem de germinação e influenciaram de modo positivo na velocidade de germinação, foram os que com a utilização de KNO₃, principalmente nas concentrações de 50 e 100Mm. Em diversos estudos tem sido observado que o KNO₃ é uma alternativa viável para aumentar a porcentagem e velocidade de germinação. Faron et al. 2004 observaram esses resultados positivos com *Hypericum perforatum* L., e Amaro et al. 2012 concluíram que a utilização de KNO₃ promove a geminação em um experimento com sementes de *Occimun basilicum*. Experimentos realizados umedecendo o substrato no qual as sementes foram semeadas com KNO₃ também apresentaram resultados positivos na promoção da germinação com sementes de quina (Vasconcelos et al. 2011), sementes de funcho e de *Cuscuta* (Tavili et al. 2010).

Apesar desse composto ser bastante utilizado na superação da dormência de diversas espécies, os mecanismos pelos quais essa superação ocorre, ainda não são claros (Arc & Rajjou 2013; Yan et al. 2016) . Algumas hipóteses são construídas com base em estudos de cunho molecular e genético.

De acordo com referências mais antigas, o potencial de superação de dormência atribuído aos compostos nitrogenados, como KNO₃ e Óxido nítrico (NO) é devido a ação que esses compostos exercem na oxidação de substratos envolvendo NADPH e NADP, na via das pentose fosfatos e conseqüentemente no metabolismo da glicose (Hendricks & Taylorson

1974). Além disso, a via das pentoses fosfato tem como produtos finais riboses, que são açúcares essenciais para o funcionamento da célula e esta via por meio da oxirredução de NADPH e NADP, fornece compostos para a biossíntese de lipídios e para a regulação da atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante (Hendricks & Taylorson 1974).

Em referências mais atuais há relatos de que o nitrato advindo da dissociação do KNO_3 , influencia na concentração de ácido abscísico (ABA) através da regulação de uma proteína chamada NLP8. Essa molécula atua primariamente em um processo de sinalização que induz a expressão de uma enzima denominada ABA 8'Hidrolase, conhecida também como CYP707A (Yan et al. 2016). Essa enzima reduz a concentração de ABA em diferentes momentos do processo de maturação fisiológica, dependendo da sua isoforma, influenciando na concentração desse hormônio nas sementes e favorecendo o processo de germinação (Okamoto et al. 2006; Yan et al. 2016).

Em alguns estudos é sugerida uma via um pouco diferente para esse efeito do KNO_3 . Nesses trabalhos é afirmado que a quebra de dormência atribuída ao nitrato pode ser devido a ação do óxido nítrico (NO). Esse composto pode ser produzido a partir de moléculas de nitrito ou nitrato, reação essa catalisada pela a enzima nitrato redutase e até mesmo em condições não enzimáticas, pode ser produzido a partir de nitrito (Yamasaki 2000; Bethke et al. 2004). O óxido nítrico atua na superação da dormência e promove a germinação por meio da diminuição da sensibilidade ao ABA (Gibbs et al. 2014); desse modo quando ocorre o acúmulo de NO, isso é acompanhado pelo decréscimo de ABA (Liu et al. 2009). A promoção da germinação devido ao decréscimo de ABA ocorre por causa da ação sinalizadora de NO na desestabilização das proteínas do grupo ERF VII, que atuam como fatores de transcrição. Essa desestabilização ocorre via a regra do N-terminal (Gibbs et al. 2014). Essa alteração na estrutura desse grupo de proteínas regula a expressão do gene *Abscic acidi insensitive* (ABI5), fazendo com que a sensibilidade ao ABA seja reduzida e assim ocorra a promoção da germinação (Gibbs et al. 2014).

Um dos resultados observados no presente estudo foi que com a aplicação dos tratamentos para a superação da dormência, a diferença na germinação na presença e na ausência de luz passou a não ser significativa no experimento 1 e no IVG do experimento 2. O uso de KNO_3 , em geral diminui a exigência de luz para a germinação devido a uma ação estimulante que esse composto exerce no fitocromo A (Batak et al. 2002). Essa ação é dada pelo acúmulo de cGMP, um mensageiro secundário que media processos de regulação gênica que envolve o fitocromo (Ludidi & Gehring 2003; Arc & Rajjou 2013) além de aumentar a

sensibilidade a hormônios endógenos da semente, como as giberelinas por exemplo (Arc & Rajjou 2013).

Entretanto esse efeito varia de acordo com a espécie estudada. Em *Ageratum conyzoides*, por exemplo, na ausência de luz, foi observada uma redução da germinação quando foi utilizado KNO_3 (Ikeda et al. 2008).

A eficácia do KNO_3 , entretanto está relacionada à concentração da solução utilizada, sendo que concentrações mais elevadas podem prejudicar a germinação. Altas concentrações desse composto podem causar um aumento considerável na pressão osmótica, dificultando a absorção de água pela semente, prejudicando assim a germinação (Bush et al. 2000). Além disso, o KNO_3 é um sal de baixo peso molecular e isso possibilita uma maior penetração desse composto nos tecidos da semente, podendo causar um efeito fitotóxico (Bonome et al. 2006; Kissmann et al. 2010).

Os resultados do teste de tetrazólio no experimento 2 e experimento 3 corroboram essa afirmação. No experimento 3, observa-se que nas concentrações mais elevadas desse composto, uma parcela considerável das sementes estava morta. Essa redução do potencial germinativo foi evidenciada por Frett et al. 1991 trabalhando com sementes de tomates e aspargos e também foi constatada por Kissmann et al. 2010 com barbatimão.

Comumente o uso do GA_3 promove o aumento da porcentagem de germinação (Vieira et al. 2002; Rahman et al. 2006; Neto et al. 2015). As giberelinas promovem a síntese de enzimas que atuam no afrouxamento das paredes celulares (endo - β - mananases e expansinas) que formam os tegumentos, bem como a síntese das enzimas hidrolíticas (α -amilase) do endosperma (Vieira et al. 2002; Scalon et al. 2006; Botin & Carvalho 2014).

Entretanto, no presente estudo a aplicação exógena desse hormônio não afetou de modo significativo a germinação e o IVG. Em *Annona cacans* Warm. também não foi constatada eficácia do GA_3 na promoção da germinação (Dalanhol et al. 2013). Para *Lolium rigidum* L. o GA_3 foi completamente ineficiente no incremento da germinação mas quando foi utilizado um tipo diferente de giberelina (GA_4) já houve um pequeno aumento na porcentagem de sementes germinadas (Goggin et al. 2009).

Existem diversos grupos de giberelinas utilizadas comercialmente como por exemplo o GA_3 mais utilizado, GA_7 , GA_4 (Hedden & Kamiya 1997; George et al. 2008) e observando os resultados do presente trabalho pode-se inferir que o tipo de giberelina utilizada nos experimentos aqui descritos possivelmente não era a mais adequada para a espécie em estudo.

Conclusão

Com os resultados do presente estudo, pode-se afirmar que as sementes de *Phyllanthus niruri* possuem dormência do tipo fisiológica e o composto que mais promoveu a germinação e o IVG foi o KNO₃. Entretanto essa eficiência está estritamente ligada com a concentração do composto.

Além disso, o KNO₃ reduziu a exigência de luz para a germinação das sementes de *P. niruri*.

Referências bibliográficas

- Adkins, S.W., Bellairs, S.M. & Loch, D.S., 2002. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica*, 126(1), pp.13–20.
- Amaro, H.T.R. et al., 2012. Superação de dormência em sementes de manjerição (*ocimum basilicum* l.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(SPL.ISS), pp.218–223.
- Arc, E. & Rajjou, L., 2013. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination AND GERMINATION. *Frontiers in Plant Science*, 4(September), pp.1–13.
- Bagalkotkar, G. et al., 2006. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 58(Burkill 1996), pp.1559–1570.
- Baskin, J.M. & Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(February 2007), pp.1–16.
- Batak, I. et al., 2002. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research*, 12, pp.253–259.
- Bethke, P.C. et al., 2004. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, pp.847–855.
- Bonome, L.T.S. et al., 2006. Efeito Do Condicionamento Em Sementes. *Ciência e Agrotecnologia*, pp.422–428.
- Botin, A.A. & Carvalho, A.D.E., 2014. Reguladores De Crescimento Na Produção De Mudanças Florestais. *Revista de Ciências Agroambientais*, pp.83–96.
- Box & Cox, 1964. L-Moments : Analysis and Estimation of Distributions Using Linear Combinations of Order Statistics Author (s): J . R . M . Hosking Published by : Wiley for the Royal Statistical Society Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2345653> . , 52(1), pp.105–124.
- Bush, E.W. et al., 2000. Enhancement of seed germination in common carpetgrass and

- centipedegrass seed. *HortScience*, 35(4), pp.769–770.
- Calixto, J.B. et al., 1998. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Medicinal research reviews*, 18(4), pp.225–258.
- Çetinbaş, M. & Koyuncu, F., 2006. Improving germination of *Prunus avium* L. seeds by gibberellic acid, potassium nitrate and thiourea. *Horticultural Science*, 33(3), pp.119–123. Available at: <http://agriculturejournals.cz/publicFiles/51353.pdf>.
- Copeland, L.O. & McDonald, M.B., 2001. *Principles of seed science and technology* 4th ed., Boston.
- Crepaldi, I.C., Santana, J.R.F. & Lima, P.B., 1998. Quebra de dormência de sementes de pau-ferro (*caesalpinia*). *Sitientibus*, 18, pp.19–29.
- Dalanhol, S.J. et al., 2013. Dormência em sementes de *Annona cacans* Warm. (Annonaceae). *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, 11(sup11), pp.S183–S189.
- Eira, M.T.S., Freitas, R.W.A. & Mello, C.M.C., 1993. Superação Da Dormencia Do Tamboril.Pdf. *Revista Brasileira de Sementes*, 15(2), pp.177–181.
- Faron, M.L.B. et al., 2004. Temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e H. Brasiliense Choisy. *Bragantia*, 63(2), pp.193–199.
- Fowler, J. & Bianchetti, A., 2000. Dormência em sementes florestais. *Embrapa Florestas Documentos*, pp.1–28. Available at: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/6091>.
- Frett, J., Pill, W. & Morneau, D., 1991. A comparison of priming agents for Tomato and Asparagus Seeds. *HortScience*, 26(9), pp.1158–1159.
- George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J. De, 2008. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; Miscellaneous compounds. In *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. pp. 227–281.
- Gibbs, D.J. et al., 2014. Article Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular cell*, 5, pp.369–379.
- Goggin, D.E. et al., 2009. ABA inhibits germination but not dormancy release in mature imbibed seeds of *Lolium rigidum* Gaud. *Journal of Experimental Botany*, 60(12), pp.3387–3396.
- Hedden, P. & Kamiya, Y., 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 48, pp.431–460.
- Hendricks, S.B. & Taylorson, R.B., 1974. Promotion of Seed Germination by Nitrate, Nitrite

- ,. *Plant Physiology*, pp.304–309.
- Ikeda, F.S.. et al., 2008. LUZ E KNO 3 NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Ageratum conyzoides* L . SOB. *Revista Brasileira de Sementes*, 30(532), pp.193–199.
- Khanna, A.K., Rizvi, F. & Chander, R., 2002. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1), pp.19–22.
- Kissmann, C. et al., 2010. Germinação de sementes de *stryphnodendron* mart. osmocondicionadas. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(2), pp.26–35.
- Liu, S. et al., 2014. In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus niruri* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2), pp.1061–1067.
- Liu, Y. et al., 2009. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 183(4), pp.1030–1042.
- Lúcio, A.D.C. et al., 2011. Transformação box-cox em experimentos com pimentão em ambiente protegido. , pp.38–42.
- Ludidi, N. & Gehring, C., 2003. Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), pp.6490–6494.
- Marques, L.C., 2010. *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) no Tratamento de Urolitíase : Proposta de Documentação para Registro Simplificado como Fitoterápico. , 5, pp.20–33.
- Neto, C.K. et al., 2015. Métodos para superação de dormência em sementes de tomateiro arbóreo (*Solanum betaceum*). *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 45(4), pp.420–425.
- Okamoto, M. et al., 2006. CYP707A1 and CYP707A2 , Which Encode Abscisic Acid 8 # - Hydroxylases , Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in *Arabidopsis* 1. *Plant Physiology*, 141(May), pp.97–107.
- Okoli, C.O. et al., 2010. Evaluation of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. *African Journal of Biotechnology*, 9(2), pp.248–259. Available at: <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Popinnigis, F., 1977. Fisiologia de sementes. *Brasília: AGIPLAN*, p.289.
- Rahman, M.H. et al., 2006. Effects of Gibberellic Acid (GA 3) on Breaking Dormancy in Garlic (*Allium sativum* L .). *International Journal of Agriculture & Biology*, 8(1), pp.63–65.
- Rolston, 1979. WATER IMPERMEABLE DORMANCY t. , 44(4754), pp.365–396.
- Sabir, S.M. & Rocha, J.B.T., 2008. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri*

- exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. *Food Chemistry*, 111(4), pp.845–851.
- Scalon, S.D.P.Q. et al., 2006. Germinação e crescimento inicial da muda de orelha-de-macaco (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong): efeito de tratamentos químicos e luminosidade. *Revista Árvore*, 30(4), pp.529–536.
- Smiderle, O.J. & Sousa, C.P. de, 2003. Dormência em sementes de Paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth - Fabaceae - Papilionidae). *Revista Brasileira de Sementes*, 25(2), pp.48–52.
- Tavili, A. et al., 2010. Treatment Induced Germination Improvement in Medicinal Species of *Foeniculum vulgare* Miller and *Cuscuta epithymum* (L.) L. *Modern Applied Science*, 4(7), pp.163–169.
- Tung, L.D. & Serrano, E.P., 2011. Effects of warm water in breaking dormancy of rice seed. *Omonrice*, 136, pp.129–136.
- Vasconcelos, J. et al., 2011. Dormancy break in seeds of “quina” (*Strychnos pseudoquina* A. St. -Hil.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(4), pp.507–511.
- Vaz Mondo, V.H. et al., 2010. EFEITOS DA LUZ E TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE. *Revista Brasileira de Sementes*, 32, pp.131–137.
- Venturi, S. & Randi, A.M., 1997. Influencia da coloracao das sementes na germinacao de *Phyllanthus tenellus* Roxb. E *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 11(1), pp.87–94.
- Vieira, A.R. et al., 2002. Action of Gibberellic Acid (Ga₃) on Dormancy and Activity of α -Amylase in Rice Seeds 1. *Revista Brasileira de Sementes*, 24, pp.43–48.
- Yamamura, K., 1999. Transformation using $(x + 0.5)$ to stabilize the variance of populations. *Population Ecology*, 41, pp.229–234.
- Yamasaki, H., 2000. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway : implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *phil. trans. Royal Society London*.
- Yan, D. et al., 2016. nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 7, pp.1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13179>.