

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *Aloysia*  
*gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso  
[VERBENACEAE] ASSOCIADOS À  
COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E SUA  
AÇÃO ANTIMICROBIANA**

**FÚLVIA MARIA DOS SANTOS**

**2007**

**FÚLVIA MARIA DOS SANTOS**

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook)  
Troncoso [VERBENACEAE] ASSOCIADOS À COMPOSIÇÃO DO  
ÓLEO ESSENCIAL E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia, área de  
concentração em Fisiologia Vegetal,  
para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Fúlvia Maria dos.

Aspectos ecofisiológicos de *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook)  
Troncoso [Verbenaceae] associados à composição do óleo essencial e sua  
ação antimicrobiana / Fúlvia Maria dos Santos. – Lavras: UFLA, 2007.  
116 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.  
Orientador: Amauri Alves de Alvarenga  
Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Malhas coloridas. 3. Fisiologia.  
4. Fitoquímica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.88041

**FÚLVIA MARIA DOS SANTOS**

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook)  
Troncoso [VERBENACEAE] ASSOCIADOS À COMPOSIÇÃO DO  
ÓLEO ESSENCIAL E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia, área de  
concentração em Fisiologia Vegetal,  
para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 05 de outubro de 2007.

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto UFLA

Prof. Dr. Marcos Nopper Alves CPQBA/ UNICAMP

Profa. Dra. Ana Cardoso Clemente Filha UNIFENAS

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga  
DBI/ UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

2007

Alguns buscam sua alma gêmea, eu tive o privilégio de nascer com a minha.

A minha irmã Fernanda, que me ensinou a dividir, somar e amar.

### ***Ofereço***

Aos meus avós, José Ferretti (*in memoriam*) e Maria Guilhermina Borges Ferretti, por ensinarem o valor do amor e respeito.

Ao meu avô Victorio Pagne (*in memoriam*), por inserir dentro de minha alma o amor pelos livros.

Aos meus pais, Alfredo e Maria Izabel e aos meus irmãos, Andrea e Marcus, pelo apoio, amor e amizade.

A minha mãe, Maria Izabel sem cujo apoio não seria possível realizar o que sonhei na minha infância.

### ***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Virgem da Conceição. ‘Daime’ Amor, Vida e Fé!

A minha família, que sempre incentivou o estudo. Aos meus irmãos, pelo apoio e convivência feliz. A minha avó Joana e aos meus tios e primos queridos.

Carla, Pedro Paulo, Piero, Eliane, Fernanda e Juliana que, apesar da distância, estiveram sempre ao meu lado, me apoiando nos momentos mais difíceis dessa jornada. Não sei o que seria de mim sem a amizade de vocês!

A Universidade Federal de Lavras, MG e ao CPQBA, Universidade Estadual de Campinas, SP.

À UFLA, à Capes e à Fapemig, pelo financiamento do projeto.

Ao professor Amauri Alves de Alvarenga, pela orientação e apoio.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela orientação, carinho e zelo por meu experimento e bons conselhos nos momentos de dúvidas.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pelo apoio de professor e amigo. Que nós nos balizemos pela sua conduta e incentivo sempre.

No Laboratório de Sementes, ao professor João Almir e a Dalva, Elza e Elenice; no Laboratório de Microscopia Eletrônica, ao professor Eduardo Alves e a Heloiza e, no Laboratório de Análise de Alimentos, a Tina. Obrigada a todos pelos momentos agradáveis no ambiente de trabalho e pelo espaço, pelo tempo e pelos conhecimentos dispensados.

A Leonardo Ferreira Dutra e Paulo César Magalhães, pelo apoio na busca de um co-orientador adequado a minha formação.

A Marcos Nopper Alves, Adilson Sartoratto e Marta Cristina Duarte, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional. À Unicamp/ CPQBA, pela estrutura e apoio a essa pesquisa.

Ao pessoal do Horto, Luiz, Geraldo, Leandro (Dico) e Paulo e ao Evaldo: vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

A Walter, Giordan e Bruna Baesa, muito obrigada pela força de trabalho e amizade.

Aos professores, colegas e funcionários da Fisiologia Vegetal, em especial: Fernanda Carlota, Cristina Justo, Carlo Vinícios e Gustavo Freitas.

Ao pessoal do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas, em especial ao prof. Luis Edson, Alessandro Mesquita e Dartagnan.

Aos amigos Fernando Cantão, Diogo, Tina, Lena, Raíres, Fran, Paulo Cairo, Carol, Vanessa Stein, Marcelo e Claudiane (por cuidar com amor do meu querido Guardiã). As “reuniões” foram de muita valia na minha formação.

A Álvaro A. Oliveira, por ajudar com o fardo pesado dos experimentos em campo e no laboratório, e por tornar esses momentos divertidos.

A minha irmã de alma, Milene e sua família, que sempre me acolheu com muito amor e carinho. Nem tenho como expressar o amor que sinto por você, muito obrigada. Uma amizade que me engrandecerá sempre!

E, na fase final deste trabalho, que acredito ter sido a mais difícil, poder contar com sua ajuda, apoio e carinho, foi essencial. Sua presença foi, um reforço emocional quando achei que não agüentaria. Ao meu companheiro, Leonardo Pilate, que diariamente me ensina a difícil arte do amor, respeito e amizade.

E aos meus amores, Luar e Guardiã (*na memória*). Com vocês aprendi o verdadeiro significado das palavras “entrega” e “amor incondicional”.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	i
GENERAL ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	1
2.1 O gênero .....	1
2.2 Propagação sexuada e assexuada .....	4
2.2.1 Propagação sexuada .....	4
2.2.2 Propagação assexuada .....	4
2.3 Influência do ambiente no padrão de desenvolvimento da espécie e na produção de óleo essencial, como sua ação antimicrobiana .....	5
2.4 Crescimento e adaptação .....	8
2.5 Quimiotaxonomia .....	10
2.6 Composição química da <i>A. gratissima</i> (Gilles et Hook) Troncoso .....	12
2.7 Atividade antimicrobiana .....	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16
PRODUÇÃO DE MUDAS DE <i>Aloysia gratissima</i> (GILLIES et HOOK.) TRONC. (Verbenaceae) POR MEIO DA PROPAGAÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA .....	23
RESUMO .....	23
ABSTRACT .....	24
1 INTRODUÇÃO .....	25
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
Material vegetal .....	27
Propagação sexuada .....	28
Germinação .....	28
Determinação da época de coleta de sementes .....	30
Determinação de substrato para germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas .....	30
Propagação assexuada (estaquia) .....	31

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
Característica física das sementes de alfazema-do-brasil .....	31
Propagação sexuada .....	32
Germinação .....	32
Armazenamento .....	34
Época de coleta de sementes de <i>A. gratissima</i> .....	36
Determinação de substrato para a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas .....	37
Propagação assexuada (estaquia) .....	42
4 CONCLUSÕES .....	43
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
6 ANEXOS .....	46

EFEITOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DECORRENTES DO CULTIVO DE <i>A. gratissima</i> SOBRE DIFERENTES TIPOS DE MALHAS COLORIDAS .....	49
RESUMO .....	49
ABSTRACT .....	50
1 INTRODUÇÃO .....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
Material vegetal e condição de cultivo .....	53
Análise de florescimento .....	55
Análise de crescimento .....	55
Características bioquímicas .....	56
3 RESULTADOS .....	58
Florescimento .....	58
Crescimento .....	59
Característica bioquímicas .....	61
Clorofilas e carotenóides .....	61
Proteína e açúcares .....	62
4 DISCUSSÃO .....	63
Florescimento .....	63

Crescimento .....	64
Característica bioquímicas .....	66
Clorofilas e carotenóides .....	66
Proteína e açúcares .....	68
5 CONCLUSÃO .....	68
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
7 ANEXOS .....	73

CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE <i>Aloysia gratissima</i> (Gillies et Hook) Troncoso SOB EFEITO DE DIFERENTES MALHAS COLORIDAS .....	75
RESUMO .....	75
ABSTRACT .....	76
1 INTRODUÇÃO .....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	78
Material vegetal e condições de cultivo .....	78
Análise de Crescimento .....	79
Características anatômicas .....	79
A. Microscopia óptica .....	80
B. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	80
C. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
4 CONCLUSÃO .....	89
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
6 ANEXOS .....	91

TEOR E QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAZEMA-DO-BRASIL CULTIVADA EM QUATRO AMBIENTES E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA .....	93
RESUMO .....	93
ABSTRACT .....	94
1 INTRODUÇÃO .....	95
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	97

Material vegetal e condições de cultivo .....	97
Extração do óleo essencial .....	97
Análise química .....	98
Atividade antimicrobiana .....	99
A. Microrganismos .....	99
B. Preparo dos óleos essenciais para os testes de atividade pelo método do microdiluição .....	100
C. Determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método da microdiluição (CLSI, 2005). Determinação da MIC (concentração mínima inibitória) .....	100
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	101
4 CONCLUSÃO .....	107
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	113
6 ANEXOS .....	115

## RESUMO GERAL

SANTOS, Fúlvia Maria dos. **Aspectos ecofisiológicos de *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso [Verbenaceae] associados à composição do óleo essencial e sua ação antimicrobiana.** 2007. 116 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A alfazema-do-brasil é uma planta de importância medicinal, como produtora de terpenos. Sua principal descrição etnofarmacobotânica aponta como sendo eficaz para infecções brônquicas, pulmonares e da bexiga. Os estudos sobre os fatores ambientais, como a radiação, que interferem nas condições de cultivo de espécies medicinais, são associados às alterações morfofisiológicas e, conseqüentemente, à síntese de compostos secundários. Este trabalho objetivou avaliar condições de produção de mudas a partir de sementes e estaquia, como os efeitos por malhas de diferentes cores sobre aspectos do desenvolvimento vegetativo, alterações anatômicas, características fitoquímicas e análise antimicrobiana. Os resultados indicaram que a semente é preferencialmente fotoblástica positiva em temperaturas constantes de 20 e 25°C. Os substratos, comercial e casca de arroz carbonizada, tiveram maiores percentuais de emergência. A melhor época de coleta de sementes foi em março. Para a propagação assexuada, as estacas herbáceas em substrato comercial e areia apresentaram 96 e 95% de enraizamento. Melhor desenvolvimento foi a pleno sol, com uma produção de inflorescência superior (270%). O crescimento das plantas mantidas a pleno sol e na malha vermelha foi maior. Para a altura da parte aérea e área foliar, a malha azul foi superior. Apenas para clorofila *b* obtiveram-se maiores resultados sob malha azul. A pleno sol, o carotenóide cis-fitoeno foi maior e na malha vermelha,  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno. A malha azul foi maior para a porcentagem de nitrogênio e para proteína bruta. A pleno sol foram observadas folhas mais espessas, maior número de tricomas glandulares na face abaxial e maior teor de óleo essencial. A fração do óleo essencial das inflorescências foi eficiente para *Streptococcus pneumonea* e a levedura *Candida albicans*.

---

\* Comitê Orientador: Dr. Amauri Alves de Alvarenga (Orientador), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Co-orientador).

## GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Fúlvia Maria dos. **Ecophysiological aspects of *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso [Verbenaceae] associated to the composition of essential oil and its ant-microbial action.** 2007. 116 p. Dissertation (Master in Vegetal Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

The brazilian-lavender is a plant with medicinal importance, as it produces terpenes. Its main ethinopharmacological description points it to be effective for bronchial, lungs and bladder infections. Studies about environmental factors like radiation that interfere on cropping conditions of medicinal species, are associated to morfophysiological alteration and consequently to the secondary compound synthesis. This work aimed to evaluate the production conditions of plantlet from seeds and cuttings, also the effect of light on vegetative development aspects, anatomical alterations, phytochemical characteristics and antimicrobial analysis under of different color nets. The results indicated that positive photoblastic seed under constant temperatures rating from 20°C and 25°C. The commercial and carbonize rice peal, had higher emergency percentage. The best time for harvest of seeds was in March. For asexual propagation the herbaceous cutting in commercial and sand substracts presented 96 and 95% of rooting. The best development was under full sunlight with a blossoming superior to 270%. The growth of plants kept under full sunlight conditions and under color net red were greater. For the aerial part height and foliar area, the color net blue was superior. Only for *b*-chlorophyll obtained higher results under the color net blue. Cis-phytoene carotene was higher under full sunlight and  $\alpha$  and  $\beta$ -carotene were higher under the color net red. The color net blue had higher percentage of nitrogen and crude protein. Thicker leaves were observed under full sunlight higher number glandular trichomas in abaxial face and a higher essential oil contents. The essential oil of blossoming was efficient for *Streptococcus pneumoniae* and yeast *Candida albicans*.

---

\* Guidance Committee: Dr. Amauri Alves de Alvarenga (Adviser), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Co-adviser).

## 1 INTRODUÇÃO

*Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso é um arbusto usado na medicina popular, no continente americano, desde os EUA, México, Brasil, Argentina e Uruguai. Sua principal descrição etnofarmacobotânica refere-se a ela como eficaz para infecções brônquicas, afecções pulmonares e da bexiga.

Trata-se de uma espécie medicinal ainda pouco estudada, no que se refere aos hábitos de crescimento e desenvolvimento. Existem algumas publicações que tratam do seu perfil químico e poucos referentes aos aspectos fisiológicos desta espécie, mas existe extensa literatura para o gênero *Aloysia* (Lippia).

Há, contudo, poucos estudos na literatura referentes aos aspectos fisiológicos da espécie, sobretudo referentes ao crescimento e ao desenvolvimento afetados por fatores ambientais.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o melhor meio de propagação para a produção de mudas, observar o efeito de malhas de transmissão de luz diferenciada (distribuição espectral) sobre o crescimento, o desenvolvimento vegetativo e a produção de flores de *A. gratissima*, bem como sua anatomia e composição química e ação antimicrobiológica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O gênero

A família Verbenaceae compreende 100 gêneros distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil, há 22 gêneros caracteristicamente aromáticos, como *Lippia*, *Aloysia*, *Vitex*, *Verbena* e *Lantana*

(Joly, 1991). O gênero *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de herbáceas, arbustos e pequenas árvores. As espécies estão distribuídas amplamente em países da América Central e da América do Sul e na África Tropical.

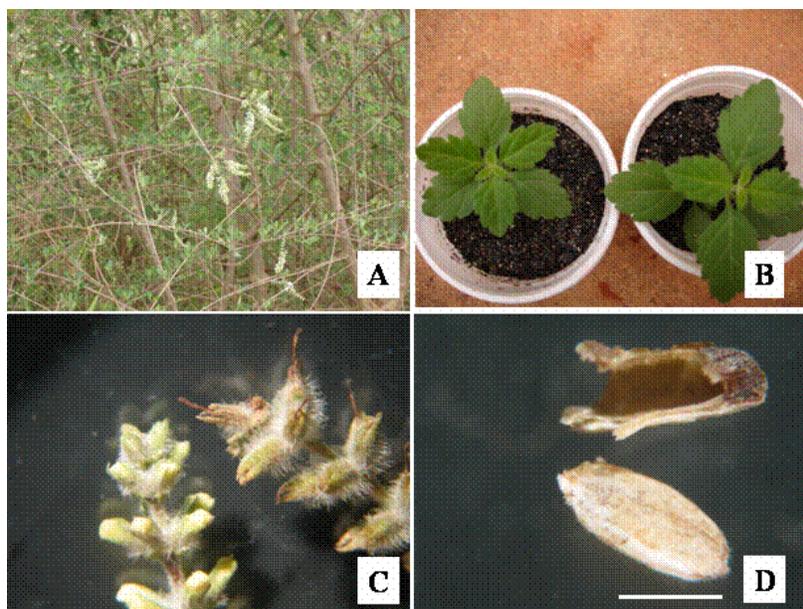
A espécie *Aloysia gratissima* está classificada no Reino: Plantae, Divisão: Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida, Ordem: Lamiales, Família: Verbenaceae Jaume Saint- Hilaire, Gênero: Aloysia, Sinonímia: *Lippia*, Espécie: *Aloysia gratissima* e Sinonímia: *Lippia lycioides* (Cham.). Seus nomes populares são: alfazema-do-brasil, erva-de-nossa-senhora, erva-da-graça e erva-santa (Lorenzi & Matos, 2002).

Tradicionalmente é utilizada no tratamento de problemas gastrintestinais e respiratórios. Algumas espécies de *Lippia* têm ação antimalarial e atividade citostática. Em muitos casos, são utilizadas as flores e a parte aérea, na forma de infusão ou decocção.

Moldenke comparou descrições do gênero realizadas por vários autores (1849-1969) e concluiu que tais autores incluíam *Acantholippia*, *Aloysia* e *Phyla* como *Lippia* (Pascual et al., 2001).

O gênero *Aloysia* inclui 30 espécies, distribuídas nas Américas, indo dos Estados Unidos até a Patagônia. A espécie *A. gratissima* é nativa do México ao Noroeste da Argentina, concentrando-se na região Sul do Brasil.

A espécie *A. gratissima* é um arbusto que pode alcançar 3 metros de altura, com padrão irregular de crescimento. As folhas são simples, opostas, às vezes alternadas, inteiras ou dentadas, lanceoladas, macias ou subcoriáceas, com brotos fortes e herbáceos. Suas flores são brancas, fragrantas, em agrupamentos axilares solitários ou geminados ou, ainda, em inflorescências paniculadas e terminais, com floração intensa (Figura 1). Com folhagem persistente, floresce na primavera e no verão. Planta considerada ornamental por sua floração intensa e aroma agradável, também medicinal e melífera (Cardoso, 2005).



**FIGURA 1:** Fotos de *A. gratissima*. **A.** arbusto no campo, **B.** detalhe das folhas seriadas em plantas jovens, **C.** formação de flores e **D.** semente e seu envoltório. B= 2mm

A propagação de *A. gratissima* pode ser por via sexuada (sementes) ou por via assexuada ou vegetativa, a partir de estacas.

Tradicionalmente, espécies de *Lippia* são utilizadas para tratamento de desordens respiratórias. Na América Central e no América do Sul, algumas espécies, como *L. Alba* N.E. Brown, *L.dulcis* Trevir. e *L. multiflora* Moldenke, entre outras (Abena et al., 2003), são consideradas remédios para gripe, resfriados, bronquites e asma.

No Brasil e na Guatemala, muitas espécies de *Lippia*, quando em preparados de uso externo, são utilizados no tratamento de desordens cutâneas, como feridas, queimaduras e úlceras (Pascual et al., 2001). *Lippia multiflora* Moldenke, conhecida como “chá-de-gâmbia” é utilizada na África, na medicina popular, em insuficiência hepática e febre (Abena et al., 2003).

## **2.2 Propagação sexuada e assexuada**

Para o uso racional de espécies, especialmente aquelas detentoras de propriedades medicinais, são de fundamental importância estudos sobre sua propagação e perpetuação.

### **2.2.1 Propagação sexuada**

A germinação é um estágio do desenvolvimento afetado por fatores intrínsecos e extrínsecos determinados por características genéticas que determinam longevidade. O período em que a semente mantém-se viva é determinado por fatores genéticos e ambientais, sendo denominado de viabilidade.

Para testes de germinação, o substrato exerce influência no processo germinativo, que deve preencher certos requisitos, como ser atóxico à semente, ser isento de microrganismos e manter uma proporção adequada entre a disponibilidade de água e aeração (Popinigis, 1985).

Conforme nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), a escolha do substrato ocorre em função das características da espécie a ser analisada, tais como o tamanho da semente, sua exigência com relação à quantidade de água e de incidência luminosa e a facilidade que o mesmo oferece para a realização da contagem e avaliação das plântulas.

### **2.2.2 Propagação assexuada**

A propagação vegetativa é considerada importante ferramenta para o melhoramento de espécies lenhosas e herbáceas e vem sendo amplamente utilizada, visando melhorar e manter variedades de importância econômica.

Estudos demonstraram que a utilização, no plantio, de estacas herbáceas, semilenhosas e lenhosas, com presença ou ausência de folhas, como também a época de coleta das estacas influenciam consideravelmente no enraizamento.

Estacas semilenhosas são mais espessas e possuem melhores condições de sobrevivência que as herbáceas, por apresentarem elevadas quantidades de assimilados e, por isso, podem produzir raízes sob condições de fraca luminosidade (Browse, 1979).

Outro fator que pode influenciar o enraizamento é o substrato, que pode ser determinante para o sucesso do enraizamento de estacas, embora, para algumas espécies, não haja efeito (Couvillon, 1988).

### **2.3 Influência do ambiente no padrão de desenvolvimento da espécie e na produção de óleo essencial, como sua ação antimicrobiana**

De acordo com Via et al. (1995), a plasticidade fenotípica retrata a habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e ou morfologia, em decorrência de sua interação com o ambiente. Espécies com grande potencial para plasticidade em caracteres ligados à sobrevivência apresentam vantagens adaptativas em ambientes instáveis, heterogêneos ou de transição, visto que as mudanças produzidas podem facilitar a exploração de novos nichos, resultando no aumento da tolerância ambiental.

Folhas de plantas crescidas em ambientes ensolarados apresentam-se menores, mais espessas e com maior massa foliar por unidade de área em relação às cultivadas à sombra (Piel et al., 2002; Wiebel et al., 1994). Este fato deve-se, provavelmente, a uma taxa fotossintética mais elevada a pleno sol, em comparação com as plantas crescidas à sombra (Bjorkman, 1981).

A maioria das espécies florestais apresenta habilidade de desenvolver diferentes estruturas anatômicas em suas folhas quando crescem à sombra ou a pleno sol. Folhas de sombra, comparadas às de sol de uma mesma árvore, apresentam-se mais delgadas, mais lobuladas, com maior superfície por unidade de peso, epiderme mais delgada e com mais espaços intercelulares (Spurr & Barnes, 1980).

Além dos efeitos no desenvolvimento das espécies, pesquisas têm mostrado a influência do ambiente na produção de metabólitos secundários vegetais, quanto a sua qualidade como a quantidade. Muitos deles se destacam pela sua importância como princípios ativos de plantas (Salmien et al., 1999; Castro et al., 2001; Leite et al., 2002; Alves, 2003, Souza, 2006, Martins, 2006, Pinto et al., 2007).

Os efeitos de diferentes regimes de luz e temperatura sobre o crescimento e rendimento de óleo essencial em plantas aromáticas foram demonstrados por vários autores (Fahlén et al., 1997; Melo, 2006; Martins, 2006; Souza, 2006; Pinto et al., 2007).

Castro et al. (2001) verificaram que o incremento do fotoperíodo promoveu um aumento no acúmulo de alantoína em raízes e uma diminuição nos seus teores em rizomas de *Symphytum officinale*.

Para a *A. gratissima*, Ricciardi et al. (2000) observaram que, de acordo com a época de colheita, no outono e na primavera, ocorriam alterações qualitativas no seu óleo essencial, obtendo resultados bem diversos de cetonas monoterpênicas e hidrocarbonetos sesquiterpenos. Nas espécies provenientes do Brasil, do Uruguai e da Argentina são encontrados nas folhas: 1,8 cineol, limoneno, sabineno,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -bisaboleno (Soler et al., 1986); porém, nas inflorescências, os componentes são pulegona, limoneno, tuiona e espatulenol (Zygadilo et al., 1995).

Segundo Pinto et al. (2007), os níveis de irradiância não afetaram o teor de óleo essencial, mas o maior rendimento de óleo essencial foi obtido em 40% de sombreamento e a pleno sol, devido à maior produção de biomassa seca das folhas de alfazema-do-brasil.

Além do desenvolvimento e do crescimento, a composição química do óleo essencial e sua ação farmacológica são de grande importância. Para a espécie, a composição química é bem investigada por cromatografia gasosa, em

que seus componentes mais freqüentes em seu óleo essencial são: limoneno,  $\beta$ -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalool,  $\alpha$ -pireno e timol (Ricciardi et al., 2000).

Algumas espécies de *Lippia* apresentam variabilidade na composição de óleo essencial, apresentando citral, carvona e o sesquiterpeno (+)-henandulcina (Pascual et al., 2001). Destaca-se ainda a presença de ácidos fenólicos, como uma grande variedade de derivados do ácido cafeico. Outros compostos fenólicos em espécies de *Aloysia* são derivados do ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico ou ácido sinápico. Os flavonóides encontrados na espécie são, freqüentemente, flavona 6-hidroxilado e metoxiflavonas, como flavona sulfatos.

De acordo com Terblanché & Kornelius (1996), o óleo essencial de *L. Lycoides* (Cham.) Steud. é composto por monoterpenos  $\alpha$ -pineno, cânfora, carvona, 1,8-cineole, citral, *p*-cimeno, geraniol, limoneno e mentono.

Nesse contexto, ensaios *in vitro* demonstraram que a espécie *Aloysia* tem atividade para muitas bactérias gram-positivas responsáveis por infecções do trato respiratório em humanos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*) (Cáceres et al., 1993). Espécies de *Lippia* estão sendo estudadas para microrganismos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Lemos et al., 1990).

Em estudos da ação fungitóxica do óleo essencial total das folhas de *A. gratissima*, Pinto et al. (2007) verificaram uma inibição no crescimento micelial em três concentrações (20, 100 e 500 ppm) para o fungo *C. gloeosporioides*; para o fungo *F. oxysporium* apenas a concentração de 500ppm foi significativa para tal inibição.

Outras ações de importância farmacêutica são descritas, como sua atividade citostática, atividade antimalarial para o *Plasmodium falciparum* e *P. berghei*, atividade para o *Schistosoma mansoni* e atividade larvívica ao *Aedes aegypti* (Craveiro et al., 1981). Além dessas atividades, o óleo essencial da

espécie de *Aloysia* é descrito apresentando atividade anestésica local (timol) e atividade analgésica (Abena et al., 2003; Souza Brito & Souza Brito, 1993).

#### **2.4 Crescimento e adaptação**

Attridge (1990) cita que a radiação solar (intensidade e qualidade) influencia processos fisiológicos, como o crescimento e o desenvolvimento vegetal, não apenas pela conversão em energia química pela fotossíntese, mas também por efeitos morfogênicos, como variações no tamanho de folhas, crescimento de caule e vigor, como controle fotoperiódico do florescimento, entre outros.

A análise de crescimento é um instrumento usado para avaliar a performance de um indivíduo ou de uma comunidade vegetal sob efeito de algum fator, seja biótico ou abiótico. Cerca de 90% da matéria seca acumulada pelas plantas ao longo do seu crescimento resulta da atividade fotossintética (Benincasa, 1988).

O aumento de área foliar é uma forma de a planta compensar sua capacidade fotossintética em condições de sombreamento, em que o aumento da superfície fotossintética assegura um aproveitamento mais eficiente das baixas intensidades luminosas, compensando, assim, as baixas taxas de fotossíntese por unidade da área foliar característica da folha de sombra (Jones & MacLeod, 1990).

Essa capacidade de adaptação está ainda relacionada a fatores externos e internos que afetam o metabolismo de clorofilas e carotenóides, variando consideravelmente seus conteúdos foliares. A luz é considerada, por vários autores, um dos principais fatores associados ao metabolismo clorofiliano (Brand, 1997). Além do seu papel protetor, os carotenóides aumentam a eficiência da fotossíntese por absorver a luz verde-azulada e transferir essa energia à clorofila (Telfer, 2002).

Mudanças na qualidade da luz nas regiões do vermelho e vermelho-distante do espectro são detectadas pelos fitocromos. Um parâmetro útil para descrever o ambiente de luz natural é a razão irradiância de fótons na região do vermelho/vermelho-distante (V/VD). Sob quase todas as condições de radiação, existirá uma mistura de equilíbrio das duas formas de fitocromo (Fv e Fvd) (Franklin & Whitelam, 2005).

As malhas coloridas representam um conceito agrotecnológico novo que objetiva combinar a proteção física, juntamente com a filtragem diferencial da radiação solar, para promover respostas fisiológicas desejáveis, reguladas pela luz (Shahak et al., 2004). De modo diferente das casas de vegetação, as malhas exercem menor interferência sobre o microclima da planta. Entretanto, são capazes de modificar tanto a quantidade como a qualidade da radiação solar transmitida, determinando modificações ópticas da dispersão e da reflectância da luz (Oren-Shamir et al., 2001).

Alguns estudos comparativos entre malhas coloridas e a malha preta têm demonstrado que a mudança na distribuição espectral da radiação provoca alterações no desenvolvimento vegetativo de plantas (Leite et al., 2002; Martins, 2006; Melo, 2006; Souza, 2006). Oren-Shamir (2001) e Shahak et al. (2004) verificaram maior comprimento de ramificações de plantas crescidas sob malhas vermelhas e menor tamanho de plantas sob malhas azuis, em relação à malha neutra (preta).

As malhas coloridas podem diferir na sua eficiência em transmitir a luz difusa ou dispersa e também em sua capacidade de espalhar a luz direta que por elas passam, de acordo com as suas propriedades físicas. A dispersão da luz é um importante fator que determina o quanto a luz penetra no dossel (Oren-Shamir et al., 2001).

A complexidade e a variabilidade da radiação natural, de um lado e as múltiplas reações de resposta da planta, de outro, tornam difícil prever como

uma dada manipulação da luz natural irá afetar respostas vegetativas particulares (Oren-Shamir et al., 2001; Shahak et al., 2004).

Na malha preta (neutra), apenas a luz que passa através dos furos na malha é transmitida, uma vez que as linhas de plástico preto que a compõem são essencialmente opacas. No entanto, nas malhas coloridas, unidas mais densamente para atingir o mesmo efeito de sombreamento, uma fração maior da luz solar realmente passa através das linhas, sendo seletivamente filtrada (Oren-Shamir et al., 2001). Segundo os mesmos autores, a malha azul transmite luz em uma banda larga em 470 nm, além de outros picos na região do vermelho-distante e infravermelho (acima de 750 nm).

De acordo com Larcher (2004), a absorção na faixa do visível para todas as plantas depende dos pigmentos presentes no cloroplasto. Dessa forma, a curva do espectro de absorção da folha para a banda do visível tem seu valor máximo coincidente com o valor da clorofila e dos carotenóides. Isso evidencia a importância da qualidade da luz na eficiência do processo fotossintético.

## **2.5 Quimiotaxonomia**

Os monoterpenos, devido ao seu baixo peso molecular, geralmente são substâncias voláteis, sendo, portanto, denominados óleos essenciais ou essências. Contudo, nem todos os óleos voláteis são terpenóides; alguns podem ser compostos fenólicos (fenilpropanóides).

Monoterpenos podem ocorrer em pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Podem estar estocados em flores (laranjeira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou nas cascas dos caules (canelas), madeiras (sândalo, pau-rosa) e frutos (erva-doce).

A função dos óleos essenciais nas plantas pode ser tanto a de atrair polinizadores (de hábito noturno) quanto a de repelir insetos (pragas).

No contexto da taxonomia, os gêneros *Lippia*, *Aloysia* e *Lantana* são morfológicamente muito semelhantes e apresentam diversos problemas taxonômicos para delimitação de suas espécies e dos próprios gêneros (Oliveira et al., 2005).

A família Verbenaceae é caracterizada pela produção de feniletanóides e iridóides glicosídicos (Rimpler & Sauerbier, 1986). Diterpenóides são raros; kauranos foram isolados somente na espécie *Callicarpa*, sendo descritos pela primeira vez no gênero Verbenaceae (Oliveira et al., 2005).

Conforme Oliveira et al. (2005), o isolamento dos compostos kaurano e iridóides de absenço em *A. virgata* são marcadores quimiotaxonômicos interessantes em Verbenaceae, em que a caracterização química pode ser usada como suporte para novas correlações com as Lamiaceae em estudos com extrato metanólico de folhas secas de *A. virgata*.

Dentro do gênero *Aloysia*, muitas espécies apresentam compostos glicosídeos iridóides e polifenólicos (Rimpler & Sauerbier, 1986). Compostos polifenólicos tipo verbacosido e luteolin 7-glucosido são encontrados em *A. triphylla* (Carnat et al., 1995). Esqueleto tipo diterpenóides kaurano, flavonóides e feniletanóides foram isolados de *A. virgata* (Oliveira et al., 2005). Mono- e sesquiterpenos foram bem identificados no óleo essencial de *A. triphylla* (Montes et al., 1973, *apud* Silva, et al., 2006) e *A. polystachya* (Cabanillas et al., 2003). O óleo essencial de *A. gratissima* foi estudado por Soler et al. (1986), Bailac et al. (1999), Ricciardi et al. (2000 e 2005) e Silva et al. (2006).

A significância química-taxonômica da família Verbenaceae tem como metabólitos secundários típicos parecidos com a família das Lamiaceae, que incluem muitos mono- e sesquiterpenos, iridóides e feniletanóides (Rimpler &

Sauerbier, 1986). Silva et al. (2006) relataram que há presença de kauranos, flavonóides e feniletanóides, mas não iridóides em *A. gratissima*.

A relevância dessas pesquisas é que o gênero *Aloysia* poderia ser incluído na família das Lamiaceae. Isso está de acordo com avaliações recentes das Lamiales, que sugerem a remoção dos gêneros *Clerodendrum*, *Caryopteris*, *Callicarpa*, *Cornutia*, *Cyanostegia*, *Pityrodia*, *Premna*, *Tectona* e *Vitex*, das Verbenaceae para as Lamiaceae (Cantino et al., 1992).

## **2.6 Composição química da *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso**

De acordo com Ricciardi et al. (2000), há diferenças entre as espécies de *Lippia* e *Aloysia*, em que a primeira tem sido amplamente estudada no nordeste argentino (Corrientes). A ampla utilização medicinal de *A. gratissima* pode ser explicada por sua diversidade química, como a espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., a qual é utilizada em tratamentos de estados gripais, afecções estomacais, disfunções digestivas, como tônico, anti-reumático e, ainda, com propriedades antiinflamatórias. Algumas dessas atividades decorrem da presença de terpenos, como 1,8-cineol, limoneno e  $\beta$ -mirceno, que aparecem em todas as acessos de *Lippia alba* de Corrientes.

As espécies de *Aloysia* também são muito utilizadas popularmente, com a característica de apresentar uma constância química de sua composição do óleo essencial, apresentando diferenças conforme o estágio fenológico da planta. Tal autor ainda diferencia *Lippia* de *Aloysia*, por seu maior teor de compostos sesquiterpenos, que está de acordo com seu uso como aromatizantes, estimulantes, estomacais e adstringentes (Ricciardi et al., 2000).

Garcia et al. (2002) observaram atividade virucida de *A. gratissima* para herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e Junin Vírus (JUNV).

Os resultados encontrados por Ricciardi et al. (2000) evidenciam que há dependência da composição dos óleos essenciais com a origem geográfica das

plantas da espécie *L. alba*. O contrário foi observado para a espécie *Aloysia*, que se mostrou estável quanto à composição do óleo essencial, independente do local de coleta, porém, com um incremento de cetonas  $\alpha$ - e  $\beta$ -tuionas em *A. gratissima*, sendo tóxicos, podendo causar convulsões.

Bailac et al. (1999), por cromatografia gasosa (CG-MS), identificaram, em *A. gratissima*, os compostos majoritários trans – verbenol (2,8%), beta – cariofileno (3,3%), óxido de cariofileno (11%) e cadinol (33%).

Sartoratto (2001), a partir da extração por SPME (microextração em fase sólida), identificou, entre muitos compostos, limoneno (1,80%), linalol (2,15%), trans- e cis-pinocanfona (10,86% e 4,02%) e trans-acetato de pinocarvoila (9,27%), entre os majoritários.

Ricciardi et al. (2005), por CG-MS, determinaram, em três acessos de *A. gratissima*, os constituintes majoritários  $\beta$ -elemeno (35,7%), viridiflorol (0,9%–33,6%),  $\beta$ -cariofileno (1,8%–28%),  $\alpha$ -tujono (6,8%–17,5%), 10-*epi*-cubebol (0,1%–13,4%), biciclogermacreno (3,8%–12,8%), (*E*)-nerolidol (11,6%) e germacreno D (1,9%–10,1%). Tal variação de porcentagem indica significativa variação associada com ontogenia da população e origem geográfica do material.

Há a necessidade de se buscar quimiotipos que reforcem a identificação botânica das *Aloysia*.

## 2.7 Atividade antimicrobiana

Os terpenos fornecem matéria prima para uma grande variedade de indústrias, isto é, produtos de resinas para papéis e textéis, aglutinantes usados no preparo de inseticidas, antissépticos, produtos farmacêuticos, perfumes e condimentos.

Do ponto de vista farmacêutico, esses compostos podem ser de grande valia no combate a infecções ocasionadas por microrganismos.

Mendes et al. (2002) relatam que cocos gram-positivos são importantes agentes de infecção e resistência a antimicrobianos, a qual tem aumentado principalmente no ambiente hospitalar. Estes patógenos incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), *Enterococcus* spp. e *Streptococcus pneumoniae*. Esses ambientes são ainda importantes reservatórios para uma grande variedade de microrganismos, como *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, que são importantes agentes bacterianos em humanos, sendo causadores de infecção hospitalar. Além disso, esses agentes têm a capacidade de adquirir resistência aos antibióticos utilizados no meio hospitalar, tornando as infecções secundárias mais difíceis de serem tratadas.

Os *Streptococcus pneumoniae* ou pneumococos são bactérias gram-positivas, com forma de cocos e uma das principais causas de pneumonia e meningite em adultos, além de outras doenças em humanos, como otite, endocardite, septicemia e artrite, entre outras.

O gênero *Staphylococcus* compreende bactérias na forma de cocos gram-positivos, incluindo diversas espécies, que podem estar associadas à microbiota normal ou a uma variedade de processos infecciosos em animais de sangue quente. Mais de vinte espécies já foram identificadas, dentre elas, pelo menos cinco são de importância veterinária (Mendes et al., 2002).

A bactéria *Staphylococcus aureus*, também conhecida como estafilococos dourados, é uma espécie de estafilococos coagulase-positivos, comum em diabéticos insulino dependentes, abscessos de pele, após epidemias por influenza e em pneumonias supurativas com múltiplas imagens com ou sem pneumatoceles. O *S.aureus* é a mais virulenta espécie do seu gênero. Os *S.aureus* são semelhantes a todos os outros *Staphylococcus*, na maioria dos detalhes.

A *Salmonella* é um gênero de bactérias, pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo conhecida há mais de um século. A espécie

*Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hutnae* e *indica*. A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, por sua vez, possui uma grande variedade de sorotipos, que são designados após a subespécie ou após o gênero, escritos com letra maiúscula, tais como: Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Agona, Infantis, Weltvreden, London, Javiana e outros.

Existem mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* descritos. Ocorre naturalmente nos porcos, onde é um invasor secundário em colera viral, mas não ocorre como patógeno natural em outros animais, causando, ocasionalmente, gastroenterite aguda e febre entérica nos seres humanos.

Bailac et al. (1999), estudando o óleo essencial de *A. gratissima* por cromatografia gasosa (CG-MS), observaram atividade antimicrobiana para *S. aureus*, *E. coli* e *B. Subtillis*.

Como conseqüência de alterações no perfil de sensibilidade de cocos gram-positivos e leveduras, novos antimicrobianos estão sendo pesquisados. Neste estudo, avaliou-se a atividade *in vitro* do óleo essencial da *A. gratissima*, o seu rendimento e o teor dos princípios ativos majoritários, encontrados nos diferentes tratamentos de qualidade de luz. Este trabalho objetivou-se ainda, avaliar condições de produção de mudas a partir de sementes e estaquia, como os efeitos da luz sobre aspectos do desenvolvimento vegetativo e alterações anatômicas de plantas desta espécie, sombreadas por malhas de diferentes cores (azul, vermelha e preta) e a pleno sol.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENA, A.A.; DIATEWA, M.; GAKOSSO, G.; GBEASSOR, M.; HONDI-ASSAH, TH; OUAMBA, J.M. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora* **Fitoterapia**, v. 74, p. 231–236, 2003.

ALVES, M.N. **Alcalóides tropânicos em Brugmansia suaveolens (Willd.) Sweet (Solanaceae)**. 2003. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

ATTRIDGE, T.H. **Light and plant responses**. London: E. Arnold, 1990. 147p.

BAILAC, P.N.; DELLACASA, A.D.; DUSCHATZKY, C.B.; FIRPO, N.; PONZI, M.I. Composition of the essential oil of *Aloysia gratissima* from San Luiz, Argentina. **Anales de La Asociacion Quimica Argentina**, v. 87, p. 149-153, 1999.

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1988. 42 p.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, E. H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology new series**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v. 12A, p. 57-107.

BRAND, M.H. Shade influences plant growth, leaf color and chlorophyll content of *Kalmia latifolia* L. cultivars. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, n.2, p. 206-208, Apr. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. **Normas climatológicas**. Brasília: 1992, 84p.

BROWSE, P.M. **A propagação das plantas**. Lisboa: Europa - América, 1979, 228 p.

CABANILLAS, C.M.; LOPEZ, M. L.; DANIELE, G.; ZYGADLO, J. A. Essential oil composition of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke under rust disease. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 5, p. 446-448, 2003.

CACERES, A.; FLETES, L.; AGUILAR, L.; RAMÍREZ, O.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A.M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 31–38, 1993.

CANTINO, P.D.; HARLEY, R.M.; WAGSTA, S.J. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (Ed.) **Advances in Labiate Science**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1992. p. 511e 522.

CARDOSO, J.C.W. **Níveis de luz e homeopatia sobre caracteres morfofisiológicos e óleo essencial e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc.** 2005. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARNAT, A.; CARNAT, A.P.; CHAVIGNON, O. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. **Planta Medica**, v. 61, n. 5, p. 490-491, 1995.

CASTRO, A.H.F.; YOUNG, M.C.M.; ALVARENGA, A.A.; ALVES, J.D. Influence of photoperiod on the accumulation of allantoin in comfrey plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 49-54, 2001.

COUVILLON, G.A. Rooting response to different treatments. **Acta Horticulturae**, v.227, p.187-196, 1988.

CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 598–601, 1981.

FAHLÉN, A.; WELANDER, M.; WENNERSTEN, R. Effects of light-temperature regimes on plant growth and essential oil yield of selected aromatic plants. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v. 73, n. 1, p. 111-119, 1997.

FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 2, p. 169-175, 2005.

GARCIA, C.C.; TALARICO, L.; ALMEIDA, N.; COLOMBRES, S.; DUSCHATZKY, C.; DAMONTE, E.B. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants os San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1073-1075, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 10.ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, 1991.

JONES, R.H.; MACLEOD, K.W. Growth and photosynthetic responses to a range of light environments in chinese tallow tree and carolina ash seedlings. **Forest Science**, Washington, v.36, n.4, p.851-862, 1990.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMA Artes e Textos, 2004. 531 p.

LEITE, C. A.; ITO, R. M.; GERALD, L. T. C.; FAGNANI, M. A. **Manejo do espectro de luz através de malhas coloridas visando o controle do crescimento e florescimento de *Phalaenopsis sp.*** 2002. Disponível em: <<http://www.polysack.com/index.php>>. Acesso em: 10 nov. 2006.

LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; MCCHESENEY, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, p.82-84, 1990.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MARTINS, J.R. **Aspectos da germinação de sementes e influência da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum L.*** 2006. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MELO, A. A. M. **Germinação de sementes e ação da qualidade da luz sobre o desenvolvimento vegetativo e aspectos fitoquímicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.** 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENDES, C.; SINTO, S.I.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; TEIXEIRA, L.; SEGURA, A.; SOUZA, D.; BARTH, A.; NICODEMO, A.C. Atividade antimicrobiana *in vitro* de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, 2002.

OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, C.C.; FERREIRA, H.D., LEMES, G.F.; SCHMITT, E. Kauranes, phenylethanoids and flavone from *Aloysia virgata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1191-1193, 2005.

OREN-SHAMIR M.; GUSSAKOVSKY, E.E.; SHPIEGEL, E.; NISSIM-LEVI, A.; RATNER, K.; OVADIA R.; GILLER Y.E.; SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n.3, p. 353-361, 2001.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PIEL, C.; FRAK, E.; ROUX, X L.; GENTY, B. Effete of local irradiance on CO<sub>2</sub> transfer in wainut. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 379, p. 2423-2430, 2002.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MELO, L.A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

POPININGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGRIPLAN, 1985. 285p.

RICCIARDI, G.A.L.; van BAREN, C.M.; DI LEO LIRA, P.; RICCIARDI, A.I.A.; LORENZO, D.; DELLACASA, E.; BANDONI, A.L. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 4, p. 698-703, 2005.

RICCIARDI, G.A.L.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A.I.A.; BANDONI, A.L. Examen de los Aceites esenciales de especies de *Aloysia* (Verbenaceae) del Nordeste. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional Del Nordeste**, San Lourenzo, v. 8, p. 100-102, 2000.

RIMPLER, H., SAUERBIER, H. Iridoid Glucosides as Taxonomic Markers in the Genera *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* and *Phyla*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 14, n. 3, 307-310, 1986.

SALMIEN, J.P.; OSSIPOV, V.; LOPONEM, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 864, p. 283-291, 1999.

SARTORATTO, A. **Análise de constituintes voláteis de plantas aromáticas por micro-extração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME/ CG)**. 2001. 86p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E.E.; GAL, E.; GANELEVIN, R. Colornets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, v. 659, p. 143-151, 2004.

SILVA, C.C.; VANDRESEN, F.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; TANAKA, C.M.A.; FERREIRA, H.D. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 593-595, 2006.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Compossition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 1343-1345, 1986.

SOUZA BRITO, A.R.M.; SOUZA BRITO, A.A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53–67, 1993.

SOUZA, G.S. **Desenvolvimento vegetativo, características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de duas espécies de guaco, submetidos a diferentes condições de qualidade de radiação.** 2006. 118 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SPURR, S. J.; BARNES, B. V. **Ecologia florestal.** New York: Ronald, 1980. 571 p.

TELFER, A. What is  $\beta$ -carotene doing in the photosystem II reaction centre? **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**, v. 357, p. 1431–1440, 2002.

VIA, S.; GOMULKIEWICZ, R.; JONG, G.; SCHEINER, S.M.; SCHLICHTING, C.; VAN TIENDEREN, P.H. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 5, p. 212-217, 1995.

WIEBEL, J.; CHACKO, E. K.; DOWNTON, S. J. S.; LUDDERS, P. Influence of irradiance on photosynthesis, morphology and growth of mangoesteen (*Garcinia mangostana* L.) seedlings. **Tree Physiology**, Victoria, v. 14, n. 3, p. 263-674, 1994.

ZYGADILLO, J. A.; LAMARQUE, A. L.; GUZMAN, C. A.; GROSSO, N. R. Composition of flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 7, n. 6, p. 593-595, 1995.



## ARTIGO 1:

### PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook.) TRONC. (VERBENACEAE) POR MEIO DA PROPAGAÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA

(Preparado de acordo com normas da revista *Ciência Rural*)

**RESUMO** – O objetivo do trabalho foi estudar a propagação de *Aloysia gratissima*, visando à obtenção de mudas. Na propagação sexuada, estudou-se a influência da temperatura (constantes e alternada) na presença e ausência de luz, diferentes tipos de armazenamentos e épocas de coleta das sementes. Também foram testados diferentes substratos na germinação das sementes (cascas de arroz carbonizadas, areia esterilizada e comercial (Plantmax®)) em casa de vegetação com nebulização intermitente. Na propagação vegetativa, foram testados dois tipos de estacas (herbáceas e semilenhosas) e de substratos (areia e comercial). Os resultados indicaram que a semente é preferencialmente fotoblástica positiva em temperaturas constantes de 20° e 25°C. O armazenamento não é possível. O substrato comercial foi maior, com 93,25% de emergência e 100% de sobrevivência. A melhor época de coleta de sementes foi em março. Para a propagação assexuada, as estacas herbáceas em substrato comercial e areia apresentaram 96% e 95% de enraizamento. Para a variável comprimento da raiz, o maior resultado foi para substrato comercial e estaca herbácea. Foi verificado maior número de raízes obtidas utilizando-se estacas herbáceas.

**Palavras-chave:** Verbenaceae, armazenamento, substrato, germinação, estaquia, enraizamento.

## ARTICLE 1

### **SEEDLING PRODUCTION OF *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook.) Tronc. (VERBENACEAE) BY MEANS OF SEXUAL AND ASEXUAL PROPAGATION.**

**ABSTRACT** – The objective of this work was to study the propagation of *Aloysia gratissima*, aiming to obtain seedlings. In the sexual propagation the influence of temperature (constant and alternate) with and without light, different kinds of storage and harvest times of seeds were studied. Different substrates for seed germination were also tested (carbonized rice peel, sterilized sand and commercial (Plantmax®)) in vegetation houses with intermittent water sprinkling. Two types of cutting (herbaceous and semiwooden) and substrates (sand and commercial) were tested in the vegetative propagation. The results indicated that the seed is mostly photoblastic positive under constant temperatures (20 and 25°C). The storage isn't possible. The commercial substrate was higher (93.25% - emergency and 100% survival). The best time for harvest of seeds was March. For asexual propagation the herbaceous cutting in commercial substrate and sand presented 96% and 95 % of rooting. For a variable root length the highest result was for commercial substrate and herbaceous cutting. With herbaceous cutting a greater number of roots was obtained.

**Key words:** Verbenaceae, storage, substrate, germination, cutting, rooting.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Aloysia gratissima*, popularmente denominada de alfazema-do-brasil, é um arbusto de até 3 metros de altura, muito ramificado e espinescente nos ápices. Suas folhas e ramos são usados para o preparo de expectorantes e digestivos, bem como contra resfriados febris, como antiespasmódicos, carminativos e, ainda, no combate de doenças relacionadas à bexiga (Alice et al., 1995).

Entre os fatores que podem influenciar a propagação sexuada e assexuada, o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, bem como a época e duração da floração e frutificação, é irregular, variando muito entre as espécies de uma mesma comunidade, entre indivíduos de uma mesma espécie e dentro de um mesmo indivíduo (Hartmann et al., 1990).

Dentro deste contexto, a disponibilidade de água e a temperatura apropriada são fatores extrínsecos fundamentais para o início do processo germinativo. A intensidade com que esses fatores são requeridos varia com a espécie (Baskin & Baskin, 2001). As sementes podem também necessitar de luz e nutrientes, havendo a exigência de um conjunto específico de condições para a germinação, que está relacionado às características particulares de cada espécie (SILVA, 2005).

Outro fator que leva a problemas que dificultam os programas de produção é a determinação das condições ideais de armazenamento. Essas condições referem-se às condições adversas de clima, como altas temperaturas e umidade do ar (Hartmann et al., 1990). O que influencia o vigor de sementes são as formas e o ambiente adequado para o armazenamento, que possibilitam a conservação destas com alta qualidade para finalidades diversas, como a regulação do comércio e a manutenção de recursos genéticos em bancos de

germoplasma, bem como o suprimento anual de sementes para espécies com produção irregular de frutos ao longo dos anos (Silva 2005). Assim, o armazenamento de sementes tem como função básica a preservação da sua qualidade fisiológica, a qual, sendo realizada de forma adequada, contribui para a diminuição da velocidade de deterioração, que se caracteriza por ser um processo irreversível (Melo et al., 1998).

É necessário conhecer as condições ambientais e as embalagens mais adequadas para o armazenamento de cada espécie, a fim de garantir elevados níveis de germinação e, portanto, vigor satisfatório (Silva, 2005). Características genéticas, o teor de água e a porcentagem de germinação das sementes, a permeabilidade da embalagem, a temperatura e a umidade relativa do ambiente também são importantes fatores que afetam a conservação da qualidade das sementes durante o armazenamento (Carneiro & Aguiar, 1993).

Outro parâmetro de importância na produção de plantas, tanto por métodos utilizando sementes como por métodos de estaquia, é o tipo de substrato a ser utilizado. Nas últimas décadas, o cultivo em substratos vem ganhando destaque no cenário mundial, devido a problemas originados pelos cultivos tradicionais em solo. Entre esses, podemos destacar a proliferação de patógenos, a salinização dos solos, a necessidade de maximização do uso efetivo da água e nutrientes e a grande exigência do consumidor quanto a sistemas de produção menos agressivos ao meio ambiente (Bezerra & Lederman, 1995).

Além da propagação sexuada, é fundamental o conhecimento do comportamento da espécie em relação à elaboração de mudas via estacas. Pesquisas demonstraram que a utilização, no plantio, de estacas herbáceas, semilenhosas e lenhosas, com folha presente ou ausente, assim como a época de coleta delas, influencia consideravelmente no seu enraizamento. Estacas semilenhosas são mais espessas e possuem melhores condições de sobrevivência que as herbáceas, por apresentarem elevadas quantidades de assimilados e,

assim, podem produzir raízes sob condições de baixa luminosidade (Bezerra & Lederman, 1995; Hartmann et al., 1990).

Devido a suas propriedades medicinais, esta espécie tem sido muito difundida na medicina popular sul-americana (Souza et al., 2007). O interesse pela propagação dessa espécie vem do fato de que as suas populações naturais vêm diminuindo em consequência do desmatamento.

O objetivo da realização do presente trabalho foi desenvolver protocolos que permitam maximizar a germinação de sementes e a rizogênese de estacas de *A. Gratissima*, visando à produção de mudas, no sentido de melhorar sua produção.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de 2006 a 2007, no município de Lavras, região Sul do estado de Minas Gerais.

### **Material vegetal**

Para propagação sexuada, as sementes foram coletadas na época de dispersão (de março a novembro) e, para propagação assexuada, foram selecionadas a partir de plantas matrizes, no Horto Medicinal, Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A exsicata está depositada no herbário da Universidade Federal de Lavras, sob o registro ESAL 19810 e 20953.

Foi determinado o grau de umidade conforme as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), utilizando-se cinco repetições, com um

grama de sementes cada. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade.

De acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 1992), o peso de mil sementes (PMS) é usado para estimar o número de sementes por grama. O peso médio de mil sementes foi determinado utilizando-se oito subamostras com 100 unidades, pesadas em balança analítica e, para a determinação do tamanho médio entre 1.000 sementes, foram realizadas 5 amostras com 100 sementes, medidas com paquímetro mediante auxílio de lupa (Brasil, 1992).

### **Propagação sexuada**

#### **Germinação**

Para o teste de germinação, as sementes foram submetidas a diferentes regimes térmicos com temperaturas constantes de 20°C, 25°C e 30°C e temperatura alternada 20°C-30°C  $\pm$  2°C, com tempo de alternância de 12 horas; na presença e ausência de luz, fotoperíodo de 12 horas em câmara de germinação do tipo BOD com UR de 100%. A condição de escuro foi alcançada pelo envolvimento das placas com dupla folha de papel alumínio. Como substrato, foram utilizadas duas folhas de papel mata-borrão, com umidade de 2,5 vezes o peso do papel seco, utilizando quatro repetições de 100 sementes para cada tratamento. Em estudos prévios, foi determinado não ser necessário retirar a casca das sementes.

Para a verificação da possibilidade de armazenamento foram utilizadas amostras de sementes recém-coletadas, com umidade inicial de 12%, submetidas à estufa com circulação forçada de ar a 35°C  $\pm$  2°C, até alcançar aproximadamente 10% de umidade. Elas foram acondicionadas em dois tipos de embalagem: de papel kraft bifoliado e aluminizada padrão comercial. A primeira permite trocas gasosas com o meio e a segunda obedece ao padrão de

comercialização de sementes, não permitindo trocas gasosas. Foram dois tipos de ambientes, câmara fria (10°C e UR 50%) e ambiente de laboratório, com controle de temperatura (mínima de 11°C e máxima de 23°C).

Constituíram-se assim, quatro condições de armazenamento. Para cada tratamento, as embalagens continham um grama de sementes beneficiadas. Foram avaliados quatro períodos de armazenamento (90, 120, 150 e 180 dias). O teste de armazenamento de sementes foi avaliado de acordo com o melhor resultado obtido no teste de germinação (25°C). Foi realizada a germinação sem armazenamento, como controle. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes em câmara de germinação do tipo BOD, com temperatura de 25°C.

O critério de avaliação foi a protrusão radicular para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (Maguire, 1962; Popinigis, 1977). As avaliações foram efetuadas diariamente e, para os tratamentos sem luz, em ambiente reservado sob luz verde. Para todos os testes foram realizados testes de tetrazólio a 1% para avaliar a viabilidade das sementes não germinadas (Brasil, 1992).

Para o estudo de armazenamento, as análises para as variáveis germinação, índice de velocidade de germinação, tempo médio e velocidade média de germinação foram feitas segundo um delineamento inteiramente casualizado, em que os tratamentos estavam arranjados segundo um esquema fatorial 2x2x4 (2 temperaturas, 2 tipos de embalagem, 4 tempos de armazenamento) mais um tratamento adicional (controle), caracterizado como o tempo zero. Os dados obtidos foram analisados pelo software estatístico Sisvar 4.3, sendo as médias entre os tratamentos comparadas pelos teste F (Tukey), a 5% de significância (Ferreira, 1999).

### **Determinação da época de coleta de sementes**

Foram avaliadas três épocas de coletas de sementes (março, junho e setembro de 2006), caracterizando o início, o meio e o fim da época de dispersão de suas sementes. Cada lote foi composto de quatro repetições de 100 sementes cada. As condições de germinação foram a 25°C em câmara de germinação do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas. O delineamento estatístico foi o mesmo para os testes de germinação descritos anteriormente.

### **Determinação de substrato para germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com controle de umidade, sendo a semeadura realizada em sementeira com sementes recém-coletadas, após beneficiamento, com a ajuda de pinça e lupa. Os substratos foram: areia lavada e esterilizada, casca de arroz carbonizada e substrato comercial (Plantmax Hortaliças®). As avaliações de germinação (emergência) foram realizadas diariamente, utilizando-se como parâmetro de emergência a protrusão da plântula, até a estabilização de emergência. Foram analisados o percentual de emergência e o índice de velocidade de emergência (IVE) (Popinigis, 1977).

Após 35 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao crescimento (número de par de folhas e tamanho do ramo e do caule) e 100 delas transferidas de cada substrato para copo descartável de 200ml, tendo como substrato o comercial. Com trinta dias após transplante, foi verificado o número de mortalidade das plantas para cada tratamento.

Para a determinação do melhor substrato para germinação, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em sementeira com 128 células para cada substrato, com quatro repetições de 32 células para a emergência e cinco repetições de 10 plântulas para análise de crescimento. Para

a análise de sobrevivência, foram utilizadas quatro repetições de 25 plântulas cada.

### **Propagação assexuada (estaquia)**

Ramos herbáceos e semilenhosos foram retirados das plantas matrizes com 15 cm de comprimento. Como substratos foram utilizados areia lavada e substrato comercial (Plantmax Hortaliças®), num fatorial 2 x 2, dois tipos de estacas com dois substratos e avaliados após 35 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de enraizamento, tamanho, número, comprimento e biomassa seca da raiz. Com seis repetições de 10 plantas cada. Os dados obtidos foram analisados no software estatístico Sisvar 4.3 pelo teste F (Scott-Knott) a 5% de significância (Ferreira, 1999).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Característica física das sementes de alfazema-do-brasil**

As sementes de *A. gratissima* são pequenas com, aproximadamente, 0,2mm de comprimento e 0,29mg/ semente, biloculadas, envoltas por casca pilosa, com embrião protegido por uma casca dura. Conforme descrito por Rosa & Ferreira (2001), as sementes de *A. gratissima* são muito pequenas (0,3 mg/ semente), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo (0,29 mg/ semente).

Um PMS igual a 0,29 g permite estimar que um grama de sementes de *A. gratissima* possui cerca de 3.448 unidades. Esse dado é fundamental para calcular a densidade de semeadura, principalmente, em se tratando de sementes

pequenas, dificultando a contagem. Segundo Brasil (1992), o peso da amostra de trabalho para fins de análise de pureza do lote respectivo deve basear-se sobre uma amostra contendo, no máximo, 2.000 sementes e, no mínimo, de 0,1 g para sementes pequenas, como as de *A. gratissima*.

Para se obter um padrão de sementes de *A. gratissima* para futura comercialização, não é necessário a retirada da casca, já que estas não interferiram na germinação da espécie. Assim, teriam-se, cerca de 3.448 sementes/g do lote estudado.

Conforme Baskin & Baskin (2001), a produção de grande número de sementes por algumas espécies, como a *A. gratissima*, é uma estratégia biológica que visa aumentar a probabilidade de algumas destas alcançarem os sítios favoráveis à germinação ou permanecerem dormentes no solo, aguardando o momento propício para germinação e estabelecimento.

## **Propagação sexuada**

### **Germinação**

Os resultados mostraram que, na presença de luz, os tratamentos a 20°C e 25°C tiveram uma germinação de 91,5% e 94,75%, respectivamente (Tabela 1), enquanto na ausência da luz, nas temperaturas de 20°C e 25°C, tiveram uma germinação de 5% e 29,5%. Temperaturas mais altas ou alternadas na presença de luz apresentaram 37,25% e 54,5%, respectivamente, mostrando que as sementes de *A. gratissima* necessitam de temperaturas mais baixas e mostram predomínio de fotoblastismo positivo para germinar. A germinação rápida é desejável para as espécies cultivadas, mostrando seu vigor ante as condições. Assim, as sementes permanecem menos tempo sujeitas às condições adversas para o estabelecimento no campo.

Para todas as sementes não germinadas, foi efetuado o teste de tetrazólio 1%, em que foi observado que as sementes estavam viáveis; provavelmente há, para a espécie, algum grau de dormência.

**TABELA 1.** Valores médios de início de germinação (I), porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação de sementes de *A. gratissima* submetidos a quatro temperaturas e na presença (L) e ausência de luz (E), colhidas em março de 2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

T (°C)	I (dias)		% germinação		IVG		Tempo médio (dias)	
	L	E	L	E	L	E	L	E
20	5	9	91,50 Aa	5,00 Ba	11,12 Ab	0,25 Bb	9,28 Ba	24,63 Aa
25	5	8	94,75 Aa	29,50 Ba	13,22 Aa	2,53 Ba	8,01 Ba	12,65 Ab
30	4	0	37,25 Ac	0,00 Bb	4,10 Ad	0,00 Bb	10,41 Aa	0,00 Bc
20-30	4	0	54,50 Ab	0,00 Bb	6,50 Ac	0,00 Bb	10,20 Aa	0,00 Bc

\*Médias seguidas de letras distintas maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Teste de Tetrazólio > 90%.

Rosa & Ferreira (2001), trabalhando com *A. gratissima*, nas temperaturas constantes de 20°C, 25°C, 30°C e 35°C, na presença e ausência de luz, além de 10°C e 15°C somente na ausência de luz e temperaturas alternantes de 10°-20°C; 15°-25°C, 20°-30°C e 25°-35°C, encontraram melhores resultados em temperaturas alternantes (20°-30°C), com 44% de germinação. No trabalho desses autores, a presença de luz ou ausência de luz foi indiferente (fotoblásticas neutras), o que discorda dos resultados obtidos no presente estudo. Nos resultados encontrados em temperatura alternada de 20°-30°C, a germinabilidade foi de 54,50%, aproximando-se dos resultados encontrados pelos pesquisadores supracitados. Porém, quando se observa a germinabilidade

em temperaturas constantes de 20°C ou 25°C, tais resultados discordam significativamente dos de Rosa & Ferreira (2001).

### Armazenamento

Conforme observado no teste de armazenamento (Tabela 2), o tempo zero (testemunha), que representa o lote estudado logo após a coleta das sementes (junho de 2006), foi maior em relação às sementes armazenadas para as variáveis porcentagem de germinação, IVG e velocidade média de germinação.

**TABELA 2.** Valores médios de porcentagem de germinação, Índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio e velocidade média de germinação de sementes de *A. gratissima* não armazenadas (testemunha) e armazenadas por 180 dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamento	Germinação (%)	IVG	Tempo médio (dias)	Velocidade média (dias)
Testemunha	49,75 A	12,25 A	4,70 B	0,21 A
Armazenadas	43,59 B	6,04 B	9,25 A	0,12 B

\* Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem entre si, pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).

Para as sementes de *A. gratissima* armazenadas nas condições de estudo, foi observado perda de viabilidade.

Os resultados obtidos para temperaturas, ambiente e câmara-fria, de armazenamento, não foram significativos entre os tempos de armazenamento estudados. Porém, para as temperaturas aos 90 e 180 dias, houve diferenças para as variáveis IVG, tempo médio e velocidade média de germinação (Tabela 3). Aos 90 dias de armazenamento para o tempo médio de germinação, as sementes

mantidas em câmara-fria tiveram menor resultado que as mantidas em temperatura ambiente, observando-se o contrário para velocidade média de germinação. Aos 180 dias de armazenamento, as sementes mantidas em câmara fria tiveram menores resultados para IVG e velocidade média de germinação.

**TABELA 3.** Valores médios de índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação e velocidade média de germinação, em função das temperaturas, ambiente (Amb) e câmara fria (CF) e tempo de armazenagem, em dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

TA	Temperatura					
	IVG		Tempo médio		Velocidade média	
	Amb	CF	Amb	CF	Amb	CF
<b>90</b>	5,51 a	7,28 a	12,53 a	7,66 b	0,08 b	0,14 a
<b>120</b>	3,60 a	3,28 a	11,08 a	10,99 a	0,09 a	0,09 a
<b>150</b>	7,16 a	7,88 a	7,47 a	7,73 a	0,13 a	0,13 a
<b>180</b>	8,25 a	5,39 b	7,68 a	8,82 a	0,15 a	0,13 b
<b>M (EP)</b>	6,13 a	5,95 a	9,69 a	8,80 a	0,11 a	0,12 a

\*\* Médias seguidas de letras distintas na horizontal diferem entre si, pelo teste t de Student ( $p \leq 0,05$ ). TA = tempo de armazenagem.

Quando se observam os dados sobre armazenamento com os tipos de embalagem, de papel e aluminizada, constata-se que o tempo de armazenamento para percentagem de germinação não foi significativo. Aos 90 dias de armazenamento, o tempo médio de germinação das sementes da embalagem aluminizada foi menor que o da embalagem de papel, sendo melhores os menores valores de tempo médio. A velocidade média de germinação, aos 180 dias, as sementes mantidas na embalagem aluminizada foi menor que na de papel (Tabela 4).

**TABELA 4.** Valores médios de tempo médio de germinação e velocidade média de germinação, em função dos tipos de embalagem, de papel e aluminizada e tempo de armazenagem em dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

TA	Embalagem			
	Tempo médio		Velocidade média	
	Papel	Aluminizada	Papel	Aluminizada
<b>90</b>	10,69 a	9,50 b	0,10 a	0,12 a
<b>120</b>	11,66 a	10,42 a	0,09 a	0,10 a
<b>150</b>	8,13 a	7,08 a	0,12 a	0,14 a
<b>180</b>	6,58 a	9,93 a	0,16 a	0,11 b
<b>M (EP)</b>	9,69 a	8,80 a	0,12 a	0,12 a

\* Médias seguidas de letras distintas na horizontal diferem entre si, pelo teste t de Student ( $p \leq 0,05$ ). TA = tempo de armazenamento.

#### Época de coleta de sementes de *A. gratissima*

A época de coleta de sementes de *A. gratissima* interfere significativamente na sua germinabilidade (Tabela 5). No início da coleta, em março, constatou-se 95% de germinação e, na última coleta, em setembro, 5% de germinação. A coleta intermediária, feita em junho, resultou em 50% de germinação, sendo a que mais se aproxima do encontrado por ROSA & FERREIRA (2001), com 44% de germinação, porém, em temperatura alternada de 20°-30°C.

**TABELA 5.** Valores médios de início de germinação (I), porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TM) e teste de tetrazólio (TZ) de sementes de *A. gratissima*, de três épocas de coleta, germinadas a 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Época de coleta	I (dias)	Germinação (%)	IVG	TM (dias)	TZ (%)
I (março)	5	95 a	13 a	5,82 a	100
II (junho)	3	50 b	12 a	4,70 a	90
III (setembro)	3	5 c	0,5 b	14,4 b	88

\* Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Observou-se, com o teste de tetrazólio a 1%, que as sementes não germinadas estavam viáveis, o que pode ser devido a uma provável dormência das mesmas, em consequência da época de coleta.

#### **Determinação de substrato para a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas**

A porcentagem de germinação de sementes e o IVG foram influenciados pelo tipo de substrato utilizado (Tabela 6). Os substratos diferem quanto às características de umidade, capacidade de retenção de água, interferindo na germinação de sementes de *A. gratissima*.

Os melhores substratos para propagação sexuada de *A. gratissima* foram a casca de arroz carbonizada (95,50%) e comercial (93,25%) e menores resultados para areia (87%).

Rosa & Ferreira (2001) relataram que a porcentagem de germinação de *A. gratissima* em areia foi de 34%, em BOD, com temperatura alternada de 20°-30°C, contrariando os 87% de emergência em casa de vegetação com média de temperatura mínima de 15° e máxima de 29°C.

**TABELA 6.** Valores médios de início de germinação (I), porcentagem de germinação, índice de velocidade (IVE) e tempo médio de germinação de sementes de *A. gratissima* submetidas a três substratos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

<b>Substratos</b>	<b>I (dias)</b>	<b>Germinação (%)</b>	<b>IVE</b>	<b>Tempo médio (dias)</b>
<b>Substrato comercial</b>	5	93,25 ab	13,92 b	9,28 b
<b>Casca de arroz carbonizada</b>	3	95,50 a	17,30 a	8,57 b
<b>Areia</b>	5	87,00 b	10,11 c	12,72 a

\* Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O tipo de substrato utilizado para a produção de mudas de alfazema-do-brasil não foi tão crítico, porém, quando se aprofundam os estudos sobre os efeitos do substrato no desenvolvimento inicial da espécie, se observa uma situação crítica nesse aspecto, indicando uma dependência nutricional das sementes no início de seu crescimento (Tabela 7).

Na análise de crescimento para a planta de *A. gratissima*, o melhor substrato de germinação foi o comercial e o pior a areia, para número de folhas e comprimento da raiz principal. Para comprimento médio da par de folhas do segundo nó, comprimento do ramo e taxa de sobrevivência, não houve diferença entre casca de arroz e areia, tendo maior resultado para o substrato comercial (Tabela 7).

Observa-se que as plântulas obtidas por meio de sementes de *A. gratissima* semeadas em substrato que proporcione nutrientes para seu estabelecimento, ganham em massa, número de folhas, tamanho do ramo, tamanho de raiz, como em tamanho médio do par de folhas do segundo nó (Tabela 7). Isso se dá, provavelmente, por ser uma semente minúscula, com pouca reserva para crescimento. Após 35 dias, as plântulas provenientes do

substrato comercial são mais vistosas e com maiores garantias de sobrevivência que as dos outros dois substratos (Figura 1A).

Caron et al. (2004) encontraram resultados semelhantes, em alface (*Lactuca sativa*), para valores de fitomassa, quando comparados o substrato casca de arroz carbonizada e o substrato comercial, o qual mostrou melhor resultado. Esse resultado corrobora com a constatação de que o tipo de material orgânico influencia na produção final das plantas a partir de sementes.

Para a obtenção de plântulas de *A. gratissima*, a escolha do substrato poderia ser feita apenas pelo mais barato e acessível, como é o caso da areia, que é facilmente encontrada e de menor custo para o produtor. Porém, quando se observa o estabelecimento dessas plântulas em relação aos substratos, observa-se que um substrato mais rico nutricionalmente proporciona plântulas maiores, com condições de atingirem status de mudas (Figura 3A).

A granulometria e o arranjo das partículas que formam o substrato são características importantes para definir a capacidade de retenção de água. A composição química do substrato é outra característica que pode influenciar na disponibilidade de nutrientes, influenciando, assim, no acúmulo de fitomassa da cultura (Caron et al., 2004).

Conforme Andrade et al. (2004), sementes de lichia (*Litchi chinensis*, Sonn) necessitam de um substrato que permita melhores combinações de água e disponibilidade de oxigênio, como areia lavada e casca de arroz carbonizada, pois é uma semente grande, com reserva de nutrientes para o desenvolvimento inicial, contrariamente à de *A. gratissima*. Para as sementes de lichia, germinadas em temperatura constante de 25°C em caixas plásticas, o percentual de germinação não diferiu significativamente para areia lavada e casca de arroz carbonizada, 73,81% e 85,71%, com 28 dias de observação.

Quando as plântulas germinadas em sementeiras foram transferidas para copo plástico de 200 ml com substrato comercial, nas mesmas condições, as

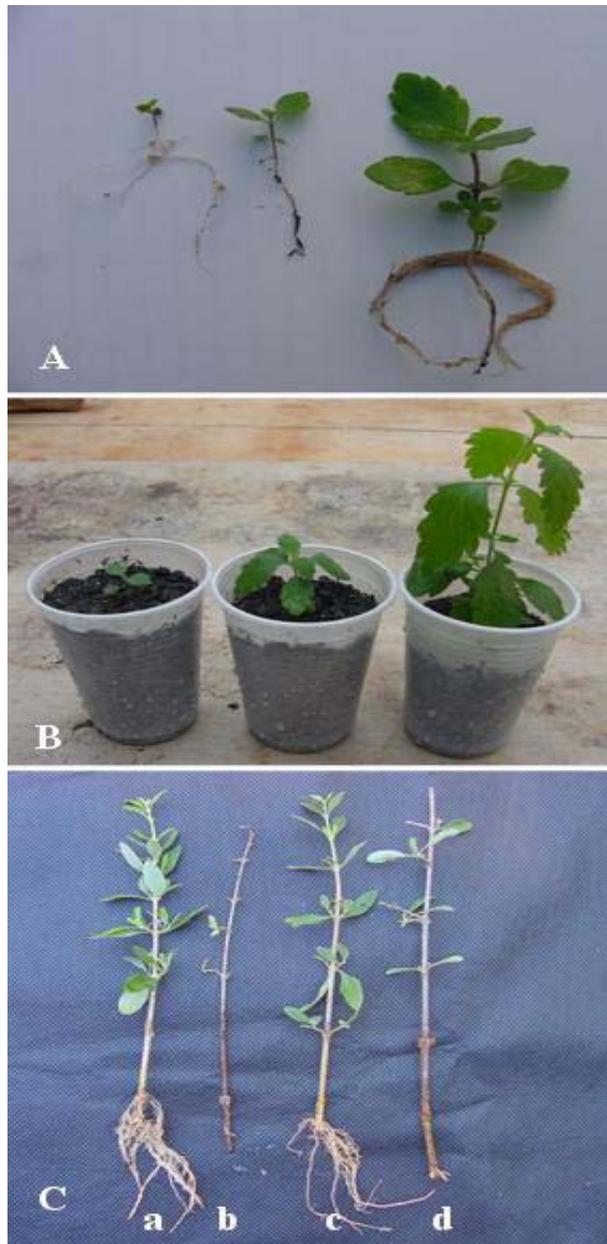
plântulas provenientes do substrato comercial tiveram uma taxa de sobrevivência de 100%, mas, para as provenientes da sementeira com casca de arroz carbonizada e areia esterilizada, as taxas de sobrevivência foram de 38% e 26%, respectivamente (Tabela 7) (Figura 1B). Isso corrobora com a hipótese de que um substrato com incremento nutricional para sementes de *A. gratissima* interfere positivamente no estabelecimento de mudas. Confirma-se, ainda, a suspeita de que as sementes, por serem pequenas, não têm reservas nutricionais suficientes para garantir um desenvolvimento adequado e que esse desenvolvimento inicial é de fundamental importância para o estabelecimento da planta.

Embora a casca de arroz carbonizada seja comercialmente a mais utilizada como substrato, devido a sua estabilidade física e química, sendo mais resistente à decomposição e apresentando alta porosidade, como a areia, estes substratos não são indicados para a obtenção de mudas de *A. gratissima*.

**TABELA 7.** Análise de crescimento para a planta de *A. gratissima* em número de folhas (NF) (par), comprimento médio do par de folha do segundo nó (CF), comprimento do ramo (Cro), comprimento da raiz principal (CR), após 35 dias e taxa de sobrevivência (TS) de plântulas provenientes dos três substratos estudados, transferidas para copo plástico com substrato comercial, após 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

<b>Substrato</b>	<b>NF</b>	<b>CF (cm)</b>	<b>Cro (cm)</b>	<b>CR (cm)</b>	<b>TS (%)</b>
<b>Substrato comercial</b>	7,40 a	1,80 a	2,00 a	10,00 a	100,00 a
<b>Casca de arroz</b>	4,20 b	1,00 b	1,00 b	6,40 b	38,00 b
<b>Areia</b>	2,80 c	0,40 b	0,80 b	4,80 c	25,50 b

\* Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem entre si, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**FIGURA 1.** Plântulas de *A. gratissima* germinadas em três substratos (da esquerda para a direita, areia, casca de arroz e substrato comercial): após 35 dias da sementeira (A) e com 20 dias de transplante para substrato comercial (B). Estaca herbácea e semilenhosa em areia (a e b) e substrato comercial (c e d) (C).

Após 90 dias, 120 plantas dos copos plásticos foram transferidas para vasos de 10 litros, com preparado de solo, esterco e areia, na proporção 2:1,5:1, respectivamente. Para os transplantes, foram escolhidas as melhores plantas dos três ensaios, que, devido à condição inicial de germinação, não estavam uniformes. Assim, as mudas foram preferencialmente formadas pelas plântulas provenientes do substrato comercial, pois as diferenças em tamanho são bem acentuadas. Tais mudas foram enviadas à Fazenda Gota da Esperança, para tratamento de qualidade de luz, onde não foi observada mortalidade.

Diante dos resultados apresentados, ficou evidente que, para se obter mudas de *A. gratissima* com maior capacidade de sobrevivência, é necessário que a germinação ocorra em substrato mais rico em nutrientes, para proporcionar melhor desenvolvimento das plântulas.

#### Propagação assexuada (estaquia)

A estaca herbácea foi superior em todos os parâmetros avaliados, tendo apresentado enraizamento de 96% e 95% nos substrato comercial e na areia, respectivamente. Estacas semilenhosas mostraram porcentagem de enraizamento de 26% no substrato areia, não apresentando raiz para o substrato comercial (Tabela 8).

**TABELA 8.** Análise de crescimento para mudas de dois tipos de estacas, herbácea (H) e semilenhosa (SL) de *A. gratissima* versus substrato comercial e areia, referente à porcentagem de enraizamento, comprimento da raiz (cm), número de raiz e fitomassa seca da raiz (FSR) (g). Lavras, MG, 2007

	% de enraizamento		Comprimento da raiz		Número de raiz		FSR	
	H	SL	H	SL	H	SL	H	SL
<b>Comercial</b>	96 Ab	0 Bb	6,11Aa	0,00Bb	8,01Aa	0,00Bb	0,05 Aa	0,00Bb
<b>Areia</b>	95 Aa	26 Ba	3,99Ab	1,15 Ba	7,40Aa	3,70 Ba	0,05 Aa	0,03Bb

\*Médias seguidas de letras distintas maiúscula na horizontal, minúscula na vertical diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Houve um dreno dos metabólitos para o desenvolvimento da parte aérea em relação ao crescimento e ao enraizamento do sistema radicular; na fitomassa seca da raiz, a estaca herbácea teve maior resultado (Tabela 8, Figura 1C).

*Lippia alba* apresentou comportamento semelhante na estaquia em diferentes substratos, em que não houve diferença significativa quanto à porcentagem de enraizamento, de brotação e número de brotos por estaca. Ocorreu diferença quanto ao comprimento dos brotos, cujo maior valor foi observado no substrato comercial (Plantmax®), que foi superior à vermiculita. Os substratos inorgânicos, como a vermiculita, possuem pouca reserva de nutrientes, o que pode ter causado esta resposta, segundo Loach (1988) *apud* Biasi & Costa (2003).

#### 4. CONCLUSÕES

As sementes de *A. gratissima* são pequenas, com aproximadamente 0,2mm de comprimento, biloculadas, envoltas por casca pilosa e embrião protegido por uma casca dura.

O peso de mil sementes de *A. gratissima* foi, em média, de 0,29g, permitindo estimar que um grama de sementes possui cerca de 3.448 unidades.

A germinação das sementes de *A. gratissima* é, preferencialmente, fotoblástica positiva e ocorre melhor nas temperaturas constantes de 20 e 25°C.

O armazenamento não é possível.

A melhor época de coleta de sementes é no mês de março.

O substrato é fundamental para o crescimento e o desenvolvimento inicial das plântulas.

Estacas herbáceas têm maior porcentagem de enraizamento.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, I.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 1995.
- ANDRADE, R.A.; MARTINS, A.B.G.; OLIVEIRA, I.V.M. Influence of the Substrate in Germination of Lychee Seeds. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 2. p. 375-376, 2004.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. London: Academic, 2001. 666p.
- BEZERRA, J.E.F.; LEDDERMAN, I.E. Propagação vegetativa por estaquia da aceroleira. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. **Acerola no Brasil, produção e mercado**. Vitória da Conquista, BA: UESB, 1995. p.32-40.
- BIASI, L.A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 455-459, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- CARON, B.O.; POMMER, S.F.; SCMIDT, D.; MANFRON, P.A., MEDEIROS, S.L.P. Crescimento da alfaca em diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.3, n.2, p. 97-104, 2004.
- CARNEIRO, J. G. A.; AGUIAR, I. B. Armazenamento de sementes florestais. In: AGUIAR, I. B.; PINA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Ed.). **Sementes de espécies florestais tropicais**. Brasília: ABRATES/ CTSF, 1993. 350p.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3-Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA/DEX, 1999.
- HARTMANN, N. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. Englewood Cliffs: Regents/ Prentice-Hall, 1990. 647p.

MAGUIRRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, Mar./Apr, p. 176-177, 1962.

MELO, J. T.; SILVA, J. A.; TORRES, R. A. A.; SILVEIRA, C. E. S.; CALDAS, L. S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF, 1998. p. 196-243.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília, DF: AGIPLAN, 1977. 289 p.

ROSA, S. G. T.; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta botânica brasileira**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 2001.

SILVA, M. C. C. **Fenologia, maturação fisiológica e aspectos da germinação de sementes de *Platymiscium floribundum* Vog. no Parque Estadual Alberto Löfgren, Instituto Florestal, São Paulo – SP**. 2005. 126 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

SOUZA, A.A.; GIROLOMETTO, G.; WIEST, L.M. *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva santa): uso popular e perspectivas na pecuária ecológica. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, 725-728, fev. 2007.

## 6. ANEXOS

### Resumo da análise de variância

**TABELA 1A.** Germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (dias) de sementes de *A. gratissima* submetidas a quatro temperaturas e sob luminosidade e escuro. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	QM		
		Germinação (%)	IVG	Tempo médio (dias)
Ambiente (A)	1	29646,125*	519,064*	0,226
Temperatura (T)	3	3129,375*	53,533*	250,985*
A x T	3	849,708*	21,836*	312,556*
Resíduo	24	40,854	0,890	4,036
CV (%)		16,36	19,98	21,36

\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

**TABELA 2A.** Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *A. gratissima* armazenadas sob dois tipos de embalagens (papel e aluminizada) e dois tipos de temperatura de armazenamento (câmara fria e ambiente) por 180 dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p-valor)	
		Germinação	IVG
Tratamentos	(16)	197,2886	23,8589
Temperatura (T)	1	18,0625 <sup>ns</sup>	0,4761 <sup>ns</sup>
Embalagem (E)	1	0,5625 <sup>ns</sup>	0,5184 <sup>ns</sup>
<b>Dia (D)</b>	<b>3</b>	<b>821,6042 *</b>	<b>51,6746 *</b>
T x E	1	68,0625 <sup>ns</sup>	0,5625 <sup>ns</sup>
T x D	3	73,1042 <sup>ns</sup>	<b>15,8156*</b>
E x D	3	13,1042 <sup>ns</sup>	6,7109 <sup>ns</sup>
T x E x D	3	67,9375 <sup>ns</sup>	4,1912 <sup>ns</sup>
Controle vs armazenadas	1	<b>142,6802*</b>	<b>145,0073 *</b>
Resíduo	51	27,2598	3,4339
CV (%)		11,88	28,91

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 3A.** Tempo médio e velocidade média de germinação de sementes de *A. gratissima* armazenadas em dois tipos de embalagens (papel e aluminizada) e dois tipos de temperatura de armazenamento (câmara fria e ambiente), por 180 dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p-valor)	
		Tempo médio	Velocidade média
Tratamentos	(16)	23,5038	0,0054
Temperatura (T)	1	12,6469 <sup>ns</sup>	0,0009 <sup>ns</sup>
Embalagem (E)	1	0,0166 <sup>ns</sup>	0,00001 <sup>ns</sup>
Dia (D)	3	40,6062*	0,0073 *
T x E	1	0,8487*	0,0009 <sup>ns</sup>
T x D	3	<b>29,2709 *</b>	<b>0,0044 *</b>
E x D	3	<b>20,3908 *</b>	<b>0,0043 *</b>
T x E x D	3	4,6784 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>
Controle vs armazenadas	1	<b>77,7088 *</b>	<b>0,0338 *</b>
Resíduo	51	3,1701	0,0004
CV (%)		19,83	16,96

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo (p>0,05).

**TABELA 4A.** Valores médios de porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio (dias) de sementes de *A. gratissima*, de três épocas de coleta, germinadas em BOD à temperatura constante de 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	QM		
		Germinação (%)	IVG	Tempo médio (dias)
Época	2	8010,333*	200,338*	112,993*
Resíduo	9	6,028	0,415	1,781
CV (%)		4,92	7,44	16,05

\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

**TABELA 5A.** Valores médios de porcentagem, índice de velocidade e tempo médio de emergência de sementes de *A. gratissima* submetidas a três substratos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	QM		
		Emergência (%)	IVE	Tempo médio (dias)
Substratos	2	77,583*	3,186*	19,700*
Resíduo	9	13,750	0,017	0,668
CV (%)		4,03	3,77	8,02

\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

**TABELA 6A.** Análise de crescimento para sementes de *A. gratissima* submetidas a três substratos, após 35 dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de Variação	GL	QM				
		NF	CF	CRo	CR	% de sobrevivência
Substratos	2	27,800*	2,467*	2,067*	35,467*	2 6276,333*
Resíduo	12	0,400	0,167	0,066	0,333	9 4,222
CV (%)		13,18	38,27	20,38	8,17	3,78

\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

**TABELA 7A.** Análise de crescimento para mudas de dois tipos estacas, herbácea e semilenhosa de *A. gratissima* versus substrato comercial e areia, referentes a taxa de enraizamento (TE) (%), comprimento da raiz (cm), número de raiz (NR), fitomassa seca da raiz (FSR) (g). Lavras, MG, 2007

Fonte de Variação	GL	QM			
		TE	CR	NR	FSR
Estaca (E)	1	44400,89*	140,07*	239,97*	0,003*
Substrato (S)	1	2780,03	1,65 <sup>ns</sup>	16,75*	0,00 <sup>ns</sup>
S vs E	1	234,32 <sup>ns</sup>	18,79*	32,45*	0,00 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	387,03	0,78	2,27	0,00
CV (%)		37,35	31,35	31,58	78,87

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo (p>0,05). SE = substrato x estaca

## ARTIGO 2:

### EFEITOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DECORRENTES DO CULTIVO DE *A. gratissima* SOBRE DIFERENTES TIPOS DE MALHAS COLORIDAS

(Preparado de acordo com a revista *Brazilian Journal Plant Physiology*)

**RESUMO** – O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e o desenvolvimento vegetativo de *A. gratissima*, cultivada sob malhas (preta, vermelha e azul). Foi avaliada mensalmente, durante cinco meses, a quantidade de inflorescência. A caracterização fitotécnica foi feita no tempo zero e por três meses consecutivos, sendo avaliados a altura da parte aérea e o diâmetro caulinar na base da planta; na última medição (tempo quatro). Foram avaliados também, área foliar, fitomassa seca de folhas, ramos, raízes e relação raiz/parte aérea por planta, razão de área foliar específica (RAF), razão de peso foliar (RPF) e área foliar específica (AFE). Após 180 dias, foram realizadas análises de clorofilas *a*, *b* e total, carotenóides e açúcares solúveis totais (AST) e redutores (AR), bem como valores de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA). Melhor desenvolvimento foi a pleno sol, com produção de inflorescência superior (270%), seguida pela malha vermelha (30%). O crescimento das plantas mantidas a pleno sol e na malha vermelha foi maior. Para a altura da parte aérea e área foliar, a malha azul foi superior. Apenas para clorofila *b* obtiveram-se melhores resultados sob malha azul. A pleno sol foi positivo para o carotenóide cis-fitoeno, a malha vermelha para  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno. A malha azul foi positiva para a porcentagem de nitrogênio e proteína bruta, mas apresentou o menor resultado para fibra em fração neutra, juntamente com a malha preta, sendo maior a pleno sol.

**Palavras-chave:** alfazema-do-brasil, Verbenaceae, qualidade de luz, desenvolvimento vegetativo.

## ARTICLE 2

### PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS DUE TO CULTIVATION OF *A. gratissima* UNDER DIFFERENT TYPES OF COLORED NETS

**ABSTRACT** – This work had the objective to evaluate the growth and vegetative development of *A. gratissima*, raised under nets (black, red and blue). The amount of blossoming was monthly evaluated for a period of five months. The phytotechnical characterization was done at time zero and for three months consecutively, the height of the aerial part and the stalk diameter at the plant base were evaluated. At the last measurement (time four) the foliar area, dry leaf phytomass, branches, roots and the relation root/ aerial part of the plant, specific foliar area rate, foliar weight rate and specific foliar area were also evaluated. After 180 days chlorophyll a, b, and total, carotenoids and total soluble sugars and reducers analyses were carried out. Crude protein, fibers in neutral detergent and fibers in acid detergent were also analyzed. The best developing was under full sunlight, with an blossoming production superior to 270%, followed by the red net with 30%. The growth of plants kept in full sunlight and under red net was higher. The blue net was superior for the height of aerial part and foliar area. Only for chlorophyll b, best results were obtained under blue net. Under full sunlight it was positive for cis-phytoene carotenoid, the red net for  $\alpha$  and  $\beta$ -carotene. The blue net was positive for the nitrogen and crude protein, but presented the lowest result for fibers in neutral fraction, and also the black net, and higher under full sunlight.

**Key words:** brazilian-lavander, Verbenaceae, light quality, vegetative development.

## 1. INTRODUÇÃO

*Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso é um arbusto usado na medicina popular, no continente americano, no tratamento de infecções brônquicas, afecções pulmonares e da bexiga (Alice et al., 1995).

As radiações solares influenciam os processos fisiológicos, sendo a intensidade e a qualidade da luz, fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Isso não apenas pela conversão em energia química pela fotossíntese, mas também pelos efeitos morfogênicos, como variações no tamanho de folhas, crescimento de caule e vigor, bem como controle fotoperiódico do florescimento, entre outros. Ainda, a plasticidade adaptativa das espécies, associada ao acúmulo diferencial de biomassa, depende do ajuste de seu aparelho fotossintético e está sujeita às diferentes condições de radiação solar (Attridge, 1990).

A adaptação ambiental pode alterar a fração de fitomassa investida em folhas, caules e raízes, modular a área foliar por unidade de fitomassa, alterando sua anatomia e o investimento de nitrogênio entre componentes fotossintéticos. Assim, a maximização da assimilação de carbono pelas plantas está associada à área foliar e ao particionamento de nitrogênio. Essas características estão sujeitas a mudanças no ambiente de crescimento, como a irradiância, sendo, ainda, verificado maior conteúdo de nitrogênio foliar por massa em plantas crescidas sob baixa irradiância (Evans & Poorter, 2001).

O aumento da irradiância no comprimento de onda vermelho-distante reduz a relação  $V/VD$ , promovendo a fotoconversão do  $Fvd$  a  $Fv$  e, conseqüentemente, os níveis de  $Fvd/Ftotal$  são reduzidos. Baixas relações  $V/VD$  são detectadas pelos fitocromos como indicadores de alta densidade ou competição pela luz e são considerados sinais chave da luz refletida ou

transmitida pela vegetação vizinha (Franklin & Whitelam, 2005). Essa percepção inicia uma resposta que consiste num alongamento do hipocótilo ou dos entrenós e pecíolos (estiolamento), um florescimento precoce e em uma baixa síntese de clorofila, constituindo uma estratégia para alcançar maiores extensões no corpo da planta (Ballaré et al., 1992; Carvalho & Peres, 2003).

Alguns estudos comparativos entre malhas coloridas e a malha preta têm demonstrado que a mudança na distribuição espectral da radiação provoca alterações no desenvolvimento vegetativo de plantas (Leite et al., 2002; Martins, 2006; Melo, 2006; Souza, 2006). Shahak et al. (2004) verificaram maior comprimento de ramificações de plantas crescidas sob malhas vermelhas e menor tamanho de plantas sob malhas azuis, em relação à malha neutra (preta).

Durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas, os açúcares participam de uma gama de processos vitais, como germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas, diferenciação radicular e foliar, transição foliar, amadurecimento de frutos, embriogênese, senescência, assim como respondem às variações de luz, estresse e patógenos (Leon & Sheen, 2003).

A irradiância influencia também o perfil de compostos de parede celular, quando, para se proteger, a planta torna sua folha mais espessa. Assim, a fibra em detergente ácido (FDA) representa majoritariamente a lignina e a celulose, e a fibra em detergente neutro (FDN) compreende toda a parede celular, sendo representada pela FDA acrescida da hemicelulose. Os carboidratos estruturais são aqueles responsáveis pela manutenção da estrutura das plantas, dos quais os principais são a celulose, a hemicelulose e a pectina.

No entanto, a alfazema-do-brasil é uma espécie medicinal pouco estudada, no que se refere aos hábitos de crescimento e desenvolvimento. Apenas são encontradas algumas publicações abordando seu perfil químico e aspectos fisiológicos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de malhas de transmissão de qualidade de luz diferenciada sobre o crescimento e o desenvolvimento vegetativo de *A. gratissima*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### **Material vegetal e condição de cultivo**

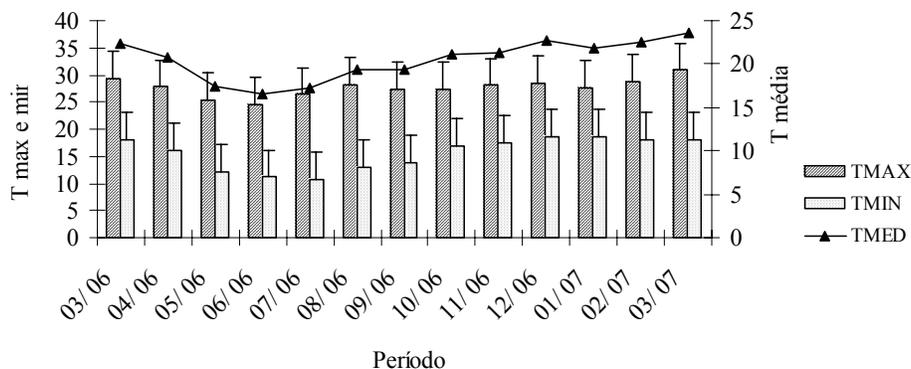
O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. As mudas eram provenientes de sementes recém-coletadas. Após seu estabelecimento, foram transferidas para vasos de 10 litros com preparado de solo (Latosolo Vermelho-Escuro), areia e esterco bovino, na proporção 2:1:1,5, na Fazenda Gota da Esperança, na UFLA.

Os vasos foram cultivados em pleno sol e sob as malhas denominadas ChromatiNet Preta® 50, ChromatiNet Vermelha® 50 e a ChromatiNet Azul® 50.

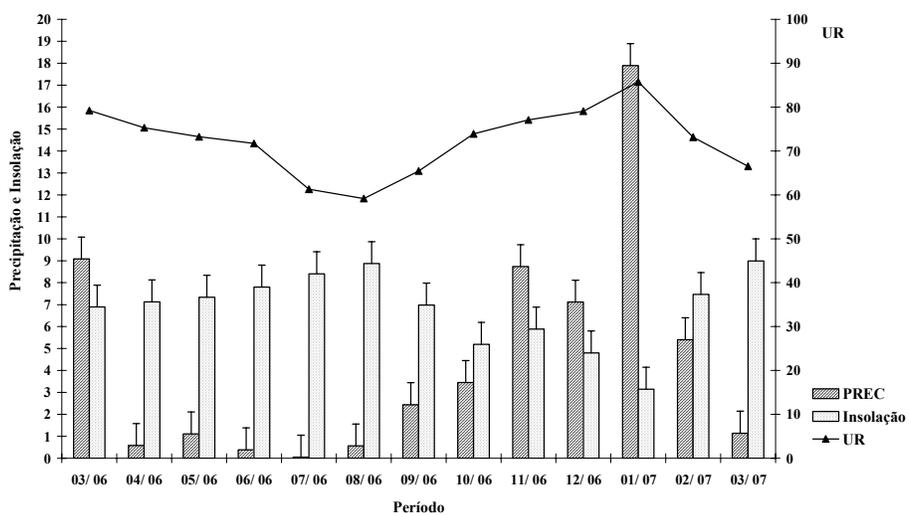
Os cultivos foram realizados em quatro ambientes, caracterizados pela qualidade de radiação solar incidente a pleno sol, ChromatiNet Vermelha® 50, ChromatiNet Preta® 50 e ChromatiNet Azul® 50. Tratam-se de malhas de polietileno de alta densidade monorientado que, conforme o fabricante, alteram o espectro de luz solar, quanto à luz transmitida, porém, com o mesmo índice de sombreamento (50%).

Para o período de avaliação, foram observadas as condições climáticas conforme análise meteorológica, no período de março de 2006 a março de 2007 (Gráfico 1 e 2).

**GRÁFICO 1.** Temperaturas máxima, mínima e média no período de março de 2006 a março de 2007.



**GRÁFICO 2.** Precipitação, umidade relativa e insolação no período de março de 2006 a março de 2007.



### **Análise de florescimento**

Plantas de *A. gratissima* submetidas a ambiente de crescimento utilizando três tipos de qualidade de luz malha preta, vermelha e azul e a pleno sol, foram analisadas quanto à produção de inflorescência. Foi avaliada mensalmente, durante cinco meses (150 dias), a quantidade de inflorescências, contando-as manualmente por vaso. Os ensaios foram compostos por seis repetições de cinco vasos cada. As inflorescências foram desbastadas imediatamente após a contagem.

### **Análise de crescimento**

Após o transplante para vasos, foi realizada a primeira caracterização fitotécnica (tempo zero), seguida por caracterizações mensais durante três meses consecutivos. Um quarto tempo foi avaliado com seis meses (180 dias) de tratamento. Foram avaliados a altura da parte aérea e o diâmetro caulinar na base da planta, por meio de fita métrica e paquímetro digital com duas casas decimais. Para a última medição (tempo quatro) foram avaliados a altura e o diâmetro caulinar e a área foliar com integrador de área foliar Model LiCor 3100 (Area Meter marca Licor). Os resultados foram expressos como fitomassa seca de folhas, ramos, raízes e relação raiz/parte aérea por planta. Todas as massas foram medidas em balança eletrônica de precisão. A medição da área foliar foi avaliada em seis plantas de cada tratamento, tendo sido medidas 100% das folhas completamente expandidas.

A razão de área foliar específica (RAF), a razão de peso foliar (RPF) e a área foliar específica (AFE) foram determinadas a partir dos valores de área foliar (AF) expressas em  $\text{dm}^2$ , da fitomassa seca da planta (P) e da fitomassa seca das folhas (Pt), ambos expressos em g, de acordo com Benincasa (1998).

### **Características bioquímicas**

Após 180 dias sob tratamento com malhas coloridas, foram realizadas análises de clorofilas *a*, *b* e total, carotenóides e açúcares solúveis totais (AST) e redutores (AR). Também foram determinados os valores de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA). A leitura da absorbância (A) foi realizada num espectrofotômetro v/uv Beckman, modelo 640 B, calibrado no respectivo comprimento de onda para cada componente.

- Umidade: secagem em estufa a 105°C/8h (AOAC, 1990).
- Clorofila: extração com acetona (Arnon, 1949).
- Carotenóides: metodologia de Duke & Kenyon (1986).
- Açúcares solúveis totais: método da antrona (Yemm & Willis, 1954).
- Açúcares redutores: método do DNS (Miller, 1959)
- Proteína: determinação do teor de nitrogênio utilizando micro-Kjeldahl (AOAC, 1990) e 6,25 como fator de conversão.
- Teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA): técnicas descritas por Goering & Van Soest (1970).

As amostras consistiram de 30g de folhas adultas completamente expandidas, coletadas ao acaso com três repetições de cada tratamento. As folhas foram secas em estufa de ventilação forçada, com temperatura de 50°C ± 5°C, por 72 horas. Em seguida, foram moídas em moinho tipo Willey, com peneira de 20 “mesh”, sendo, posteriormente, armazenadas em recipientes de vidro.

As análises de clorofila e carotenóides foram realizadas em folhas frescas, coletadas às 8 horas em dia ensolarado, utilizando-se dez folhas simples

completamente expandidas abaixo do ápice das plantas, retiradas de seis plantas por tratamento, tomadas ao acaso. Essas folhas foram acondicionadas em papel alumínio e em caixa de isopor com gelo e imediatamente transferidas ao laboratório.

A extração e a quantificação dos carotenóides foram realizadas segundo a metodologia descrita por Duke & Kenyon (1986). Os teores de carotenóides foram quantificados utilizando-se os coeficientes de absorvidade molar (A) de Sandmann & Borger (1983), realizando-se a leitura espectrofotométrica 287 nm (*cis*-fitoeno), 444 nm ( $\alpha$ - caroteno) e 445 nm ( $\beta$ -caroteno). Os pigmentos foram calculados em base de concentração de peso fresco (FW), utilizando-se os coeficientes de extinção (E) de 1108 para *cis*-fitoeno, 2500 para  $\beta$ -caroteno e 2905 para  $\alpha$ - caroteno (Sandmann & Böger, 1983; Sprecher et al., 1998).

Os teores de proteína bruta (PB) foram determinados conforme métodos recomendados pela AOAC (1990). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo as técnicas descritas por Goering & Van Soest (1970), todos a partir de folhas frescas.

Para as análises fitotécnicas de crescimento, foram utilizadas seis repetições de cinco plantas cada por tratamento. Nas análises fisiológicas foram utilizadas seis repetições para cada tratamento. Como método estatístico, foi utilizado teste F (Scott-Knott) a 5% de significância no software Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999).

### 3. RESULTADOS

#### Florescimento

Com base nos resultados registrados na Tabela 1, observa-se que, a pleno sol, houve produção de inflorescência muito superior (270%) do que a malha vermelha (30%), após 150 dias de tratamento. Observou-se ainda que, para todos os meses anteriores, a produção de inflorescência foi sempre superior a pleno sol e os demais tratamentos não diferiram estatisticamente entre si.

A maior quantidade de inflorescência foi obtida aos 150 dias, tendo o maior tempo de exposição à luz resultado em maior quantidade de inflorescência. A alfazema-do-brasil é uma planta que necessita de luz para uma maior emissão de flores.

As inflorescências foram pedunculares, com flores brancas e muito aromáticas, com média de 60 flores por pedúnculo.

**TABELA 1.** Número de inflorescência de *A. gratissima* durante 150 dias sob diferentes malhas coloridas com 50% de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamento	Inflorescência				
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Preto	0,00 b	0,67 b	0,00 b	0,50 b	0,00 c
Azul	0,50 b	0,00 b	0,50 b	0,50 b	0,00 c
Vermelho	1,83 b	9,83 b	5,67 b	15,67 b	30,16 b
Pleno sol	68,00 a	93,67 a	116,33 a	267,50 a	301,67 a

\* Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

## Crescimento

Os dados sobre crescimento de plantas de *A. gratissima* em quatro tempos diferentes, em relação ao diâmetro e à altura da parte aérea, podem ser observados na Tabela 2. Observa-se que, nos 30 dias iniciais, não houve diferença na altura da planta e no diâmetro entre os diferentes tratamentos. A partir dos 60 dias, houve um crescimento linear, maior para as plantas sob a malha azul, até os 180 dias.

O diâmetro das plantas entre os tratamentos não teve um incremento acentuado. No entanto, a altura da planta começou a ter um incremento maior nas malhas azul e vermelha e, aos 180 dias de cultivo, a malha azul foi superior aos demais tratamentos. A malha azul teve um incremento de 7,52 vezes em relação aos 30 dias até 180 dias e, ao pleno sol, foi de 3,75 vezes. Isso mostra que, na malha azul, a planta teve um crescimento duas vezes maior do que o cultivo a pleno sol.

**TABELA 2.** Estádios de crescimento de *A. gratissima*, expressos em altura da parte aérea (APA) (cm) e diâmetro do ramo principal (D) (cm), cultivada sob diferentes malhas coloridas, com 50% de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

T	30 dias		60 dias		90 dias		180 dias	
	APA	D	APA	D	APA	D	APA	D
P	18,16 Da	1,30 Da	45,81 Cb	3,16 Cb	85,93 Bc	7,64 Ba	122,78 Ab	9,88 Ab
A	21,68 Da	1,27 Da	59,30 Ca	3,76 Cb	110,50 Ba	7,75 Ba	162,97 Aa	10,47 Ab
V	18,69 Da	1,31 Da	53,62 Ca	3,98 Cb	97,90 Bb	7,98 Ba	129,53 Ab	11,07 Aa
PS	19,76 Da	1,31 Da	40,87 Cb	4,60 Ca	58,07 Bd	7,35 Ba	74,22 Ac	10,25 Ab

\* Médias seguidas da mesma letra na maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). P= preta, A= azul, V= vermelha e PS= pleno sol.

Aos 180 dias, a condição de cultivo de alfazema-do-brasil não foi estatisticamente diferente em relação à fitomassa seca de folhas; porém, para a

fitomassa seca dos ramos e total, a malha vermelha e a azul caracterizaram resultados mais elevados (Tabela 3). Para a fitomassa seca das raízes, os melhores resultados foram observados para a malha vermelha e a pleno sol. Porém, tanto na fitomassa seca de ramos como na total, a malha azul teve um comportamento semelhante ao da malha vermelha. Já para a relação raiz/parte aérea, a pleno sol apresentou o maior resultado e as malhas coloridas não apresentaram diferença estatística.

Na Tabela 3 estão representados também os índices fisiológicos, nos quais observa-se que a área foliar foi maior para os tratamentos com as malhas azul e vermelha, seguidos pelo de malha preta. Para razão de área foliar, a malha vermelha apresentou menor resultado. O tratamento a pleno sol foi superior para a razão de peso de folha e inferior para área foliar e área foliar específica, com melhores resultados nas malhas azul e preta, que não diferiram estatisticamente entre si. Razão de peso de folha teve maior resultado para as plantas a pleno sol, as das malhas coloridas com os menores resultados não diferiram estatisticamente entre si.

**TABELA 3.** Fitomassa seca das folhas, ramos, raízes, total e relação raiz/parte aérea (RRPA), área foliar (AF) (dm<sup>2</sup>), razão de área foliar (RAF) (dm<sup>2</sup>/g), razão de peso de folha (RPF) (g/g) e área foliar específica (AFE) (dm<sup>2</sup>/g) de *A. gratissima* cultivada em diferentes malhas coloridas com 50% de sombreamento por 180 dias. UFLA, Lavras, MG, 2007.

T	Fitomassa seca (g)					Índices fisiológicos			
	Folhas	Ramos	Raízes	Total	RRPA	AF	RAF	RPF	AFE
P	17.78 a	105.52 b	33.45 b	156,75 b	0,28 b	19,05 ab	0,12 a	0,11 b	1,08a
A	21.93 a	125.93 ab	33.76 b	181,63 ab	0,23 b	24,18 a	0,13 a	0,12 b	1,11a
V	25.42 a	180.57 a	45.78 a	251,77 a	0,24 b	21,43 ab	0,08 b	0,10 b	0,85 b
PS	23.52 a	82.10 b	44.63 a	150,25 b	0,43 a	16,23 b	0,11 ab	0,16 a	0,69 c

\* Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey (p≤0,05). P= preta, A= azul, V= vermelha e PS= pleno sol.

## Características bioquímicas

### Clorofilas e carotenóides

Para a análise de clorofila em plantas de *A. gratissima*, observou-se (Tabela 4) que as diferentes malhas coloridas utilizadas não interferiram na produção de clorofila *a*, total e na razão clorofila *a/b*, porém, com incremento na produção de clorofila *b* na malha azul, exceto na razão *a/b*, que teve um incremento para a malha vermelha. Para teor de clorofila *a* e total, os menores resultados foram observados nas plantas cultivadas a pleno sol. O teor de clorofila *b* apresentou maior resultado para a malha azul, seguida dos demais tratamentos que não diferiram estatisticamente entre si.

Com relação aos resultados para carotenóides (Tabela 4), o cis-fitoeno apresentou maior resultado a pleno sol, seguido dos demais tratamentos, que não diferiram estatisticamente entre si. A malha vermelha proporcionou maior produção para os pigmentos  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, não ocorrendo diferença significativa para os demais tratamentos. Quando se observa a produção total desses pigmentos, constata-se que não há diferença significativa entre as malhas azul, vermelha e a pleno sol, exceto para a malha preta, que foi inferior aos demais.

**TABELA 4:** Análise de clorofila *a*, *b* e total e razão clorofila *a/b* e análise de carotenóides cis-fitoeno,  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), em plantas de *A. gratissima* cultivadas em diferentes malhas coloridas com 50% de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

T	Clorofila (mg/ g)				Carotenóides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
	<i>a</i>	<i>b</i>	Total	Razão <i>a/b</i>	cis-fitoeno	$\alpha$	$\beta$	Total
P	7,25 a	2,56 b	9,81 a	2,83 a	10,75 b	6,80 b	7,95 b	25,50 b
A	8,57 a	3,42 a	11,99 a	2,51 a	11,91 b	7,73 b	9,04 b	28,68 a
V	7,83 a	2,64 b	10,47 a	2,96 a	12,12 b	9,28 a	10,87 a	32,27 a
PS	5,75 b	2,11 b	7,86 b	2,78 a	13,72 a	7,34 b	8,62 b	29,69 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). P= preta, A= azul, V= vermelha e PS= pleno sol.

### Proteína e açúcares

De acordo com os dados da Tabela 5, observa-se que houve um menor teor de água nas plantas sob pleno sol, seguidas das sob malhas vermelha e preta, e um maior conteúdo no tratamento com malha azul. Para a porcentagem de nitrogênio e proteína bruta, maiores valores foram verificados para as plantas cultivadas sob malha azul, seguidas por malha preta e a pleno sol, as quais não diferiram estatisticamente, com menor produção sob a malha vermelha. Para a fibra em detergente neutro, maiores resultados foram observados a pleno sol, seguido pela malha vermelha e com menores resultados para as malhas preta e azul. A fibra em detergente ácido não apresentou diferença estatística entre as malhas coloridas, porém, foi observada, a pleno sol, maior quantidade de fibras. A malha preta proporcionou o maior acúmulo de açúcares solúveis totais. Os outros tratamentos não diferiram estatisticamente. Os açúcares redutores apresentaram maiores valores para a malha vermelha, seguida do pleno sol, malha azul e malha preta, consecutivamente.

**TABELA 5.** Valores de porcentagem de umidade (U), nitrogênio (N), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA); açúcar solúvel total (AST) e açúcares redutores (AR) de folhas de *A. gratissima*, cultivadas em diferentes malhas coloridas, com 50% de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

T	Proteína					Açúcares	
	U (%)	N (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)	AST ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	AR ( $\mu\text{mol}$ )
P	69,21 c	2,72 b	16,98 b	13,24 c	10,37 b	63554,00 a	776,77 d
A	71,31 d	3,40 a	21,23 a	11,94 d	10,05 b	53701,55 b	874,18 c
V	66,15 b	2,33 c	14,54 c	16,17 b	10,79 b	51519,17 b	1080,14 a
PS	65,58 a	2,54 b	15,87 b	17,96 a	13,04 a	53579,62 b	958,95 b

\* Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott, ( $p \leq 0,05$ ). P= preta, A= azul, V= vermelha e PS= pleno sol. (AST:  $r^2 = 0,9567$ ; AR:  $r^2 = 0,9992$ ).

## 4. DISCUSSÃO

### **Florescimento**

De acordo com os resultados obtidos, para a obtenção de melhor produção de flores e sementes, o cultivo de *A. gratissima* deve ser realizado a pleno sol.

Leite et al. (2002), estudando o comportamento do florescimento em *Phalaenopsis* sp. sob malhas coloridas, verificaram que o número de flores sempre maior sob malha vermelha indica que as propriedades da luz transmitida por esta malha têm efeito significativo na fotomorfogênese, o que está de acordo com os resultados obtidos. Isso porque os autores não usaram como controle a condição a pleno sol e, no presente trabalho, a malha vermelha (30%) proporcionou maior florescimento do que as malhas azul e preta. Ainda de acordo com Leite et al. (2002), os resultados indicam que o florescimento precoce encontrado em quase todas as variedades testadas parece ser devido à mudança de espectro promovido pela malha vermelha, incrementando tanto vermelho, como vermelho-distante em proporção aos outros tipos de radiação. Pinto et al.(2007), trabalhando com níveis de sombreamento em *A. gratissima*, observaram maior florescimento a pleno sol, corroborando com os resultados deste trabalho.

A luz vermelha provoca grande aumento na expressão de um gene que codifica uma enzima-chave na síntese de giberelina que, por sua vez, pode promover o alongamento de internódios ou o florescimento (Taiz & Zeiger, 2004).

## **Crescimento**

Alguns estudos comparativos entre malhas coloridas e a malha preta têm demonstrado que a mudança na distribuição espectral da radiação provoca alterações no desenvolvimento vegetativo de plantas.

A maior área foliar encontrada em plantas cultivadas sob a malha azul pode ter relação com o fenômeno fisiológico conhecido como mobilização de nutrientes, induzida por citocinina. As citocininas influenciam o movimento de nutrientes de outras partes da planta para a folha (Taiz & Zeiger, 2004).

Leite et al. (2002) observaram diferenças entre as concentrações de matéria seca e fresca em diferentes órgãos de plantas de *A. gratissima*, utilizando diferentes tipos de malhas; maior matéria seca e fresca foi encontrada nas folhas das plantas oriundas da malha azul, o que concorda com o que reporta Rajapakse & Kelly (1992) que, trabalhando com filtros de sulfato de cobre, encontraram alterações na morfologia da planta e na distribuição de fotossintetizados.

Mesmo que as malhas azul e vermelha favoreçam a altura das plantas em relação ao controle (Tabela 2), aos 180 dias de cultivo, quando se analisa o conteúdo de fitomassa seca de folhas (Tabela 3), constata-se que não há diferença estatística. Pôde-se observar, para a área foliar, que o menor resultado foi a pleno sol, seguido pela malha preta, sendo as folhas das malhas maiores em relação ao pleno sol, mas, em contrapartida, mais delgadas (Capítulo 4, Tabela 2).

As plantas de *A. gratissima* apresentaram maior acúmulo de fitomassa seca para raízes a pleno sol. Alocando maior quantidade de fotoassimilados para esses tecidos. Área foliar menor para as plantas em pleno sol, como foi descrito por Martins (2006), trabalhando com *O. gratissimum*.

Em Martins (2006), para *O. gratissimum*, a radiação transmitida pela malha azul proporcionou incremento na altura, maior acúmulo de matéria seca e maior área foliar, o que indica ter ocorrido maior atividade fotossintética nesta

condição luminosa em comparação com as plantas sob malha vermelha e preta. A malha preta proporcionou menor altura para as plantas até 60 dias de tratamento, mas maior que as do controle aos 60 dias e, quando aumentou o tempo de exposição (180 dias) aos tratamentos, as de pleno sol foram as menores; para *O. gratissimum* sob malha preta foram observadas reduções na altura em relação aos demais tratamentos com 90 dias (Martins, 2006).

A ocorrência de uma maior RPF e RAF, bem como uma maior relação raiz/parte aérea nas plantas a pleno sol, comparativamente àquelas sombreadas, pode estar relacionada a uma plasticidade anatômica induzida por intensidade solar, o que poderia resultar na inadaptabilidade dessas plantas à modificação do regime luminoso. O maior investimento de fotoassimilados em raízes, em detrimento de folhas nestas plantas, é condizente com a estratégia adaptativa de aumentar a capacidade de absorção de água e nutrientes e sobreviver a ambientes com maior incidência de ventos e alta irradiância e, conseqüentemente, maior exigência hídrica.

Souza (2006), estudando *M. glomerata* e *M. laevigata*, observou maiores valores de RAF para as plantas sombreadas do que a pleno sol, indicando que seria viável diminuir eventuais danos causados por excesso de luz, porém em *A. gratissima*, o índice só foi menor na malha vermelha. Isso indica que, para a espécie estudada, a qualidade de luz não interfere nesses índices fisiológicos tão significativamente, indicando uma adaptabilidade no excesso de irradiação.

De acordo com Souza (2006), a AFE, que é um indicativo da espessura da folha e estima a proporção relativa da superfície assimilatória e os tecidos de sustentação e condutores da folha, foi mais reduzida na condição de pleno sol. Isso indica que as folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata* tornam-se mais espessas quando as plantas são mantidas em local sem nenhum tipo de sombreamento. Esse resultado concorda com os obtidos com *A. gratissima*, já que também obteve-se uma AFE menor na condição a pleno sol, sendo maior

para as malhas azul e preta, sendo folhas um pouco mais delgadas. Foi observado polimorfismo foliar no decorrer do crescimento para as plantas mantidas sob as malhas coloridas, demorando mais para torná-las pequenas e estreitas. Sob pleno sol, elas adquiriram morfismo característico da espécie após um mês.

Sabe-se que a RPF representa a razão entre a fitomassa seca retida nas folhas e aquela exportada para as demais partes da planta. Observa-se que as malhas proporcionaram menor valor de RPF, o que sugere que as malhas alocam menos fotoassimilados para as folhas em relação àquelas a pleno sol. Sendo as folhas o centro produtivo de fitomassa seca, a partir da fotossíntese, e os demais órgãos dependem da exportação da folha, verifica-se que as malhas não interferiram na produção de fitomassa seca de folhas e nem na exportação para os demais órgãos. Além disso, os caules e raízes não interferiram na produção de fitomassa seca de folhas, sendo drenos importantes para a planta, indicando, assim, que a espécie tem ótima adaptabilidade às condições de irradiância.

### **Características bioquímicas**

#### **Clorofilas e carotenóides**

A luz azul influencia a biossíntese de clorofila e outros pigmentos por meio da regulação da expressão de determinados genes (Tsunoyama et al., 2002). Isso pode explicar o maior vigor foliar encontrado para todas as plantas tratadas com malha azul. Embora não tenha sido avaliado formalmente, as folhas das plantas tratadas com luz azul apresentavam-se mais verdes e brilhantes, resultados observados para *A. gratissima* também. Porém, a qualidade de luz não foi estatisticamente diferente para as clorofilas *a* e total, indicando que, para a espécie, a qualidade de luz não interferiu no sistema fotossintético, apenas a pleno sol teve um menor resultado.

Geralmente, a clorofila e os carotenóides tendem a aumentar com a redução da intensidade luminosa. Martins (2006), estudando *O. gratissimum*, observou que a pleno sol há maior conteúdo de carotenóides, mas, para *A. gratissima*, a quantidade de carotenóide total foi inferior apenas para a malha preta, não tendo diferença estatística para os demais tratamentos; porém, para o pigmento cis-fitoeno foi maior a pleno sol e tanto  $\alpha$  como  $\beta$ -caroteno foram maiores para a malha vermelha.

Tais resultados indicam que o aparato fotossintético foi capaz de se ajustar à alteração espectral da radiação, mas não às diferentes irradiâncias impostas às plantas. Os baixos valores observados para clorofila total nas plantas cultivadas a pleno sol podem indicar ocorrência de fotoinibição leve nas plantas sob esse regime de radiação. Neste trabalho, parece ter havido um incremento no mecanismo fotoprotetor dos carotenóides, devido ao seu alto conteúdo observado nas plantas a pleno sol, sendo iguais aos demais tratamentos, exceto para a malha preta.

Como se observa menor valor de clorofila *a* a pleno sol, isso indica a viabilidade nos tratamentos submetidos a diferentes condições luminosas, havendo maior valor de clorofila *b* para a malha azul, não diferindo nos demais tratamentos. Esse aumento da clorofila *b* para a malha azul está associado à sua degradação, que é mais lenta em relação à clorofila *a* (Engel & Poggiani, 1991).

Como se observaram menores valores de clorofila *a* e clorofila *total* em plantas a pleno sol em relação a plantas sombreadas, confirmam-se os resultados obtidos por Souza (2006), evidenciando que a quantidade de irradiação influencia os teores de clorofilas.

Mendes et al. (2002), estudando algumas espécies como *Myrtus communis* L., não encontraram diferença significativa na relação clorofila *a/b* em plantas cultivadas a pleno sol ou sob 30% de irradiância, como Souza (2006) para *Mikania glomerata* Sprengel, corroborando com os resultados obtidos.

### **Proteína e açúcares**

O uso de malhas coloridas propiciou diferenças nos conteúdos de nitrogênio foliar, em favor da malha azul, comparativamente às demais, com a malha vermelha proporcionando menor resultado. Esses resultados concordam com o observado por Pons & Van Berkel (2004) que verificaram que o tratamento de seis espécies de plantas com luz vermelho-distante suplementar reduziu o conteúdo de nitrogênio por área foliar em cinco dessas plantas.

Açúcares exercem funções estruturais relevantes ao processo bioquímico, durante a expansão celular, na formação de novos tecidos e iniciação de raízes adventícias (Silva, 1998).

As plantas sob cultivo a pleno sol apresentaram maior porcentagem de FDN e FDA, evidenciando um estímulo solar para o espessamento da parede celular para proteção do aparato fotossintético.

## **5. CONCLUSÃO**

Melhor desenvolvimento para as plantas de *A. gratissima* foi a pleno sol, com produção de inflorescência superior (270%), seguida pela malha vermelha (30%), mas não diferiu estatisticamente dos tratamentos com as demais malhas, após 150 dias de tratamento.

O crescimento das plantas mantidas a pleno sol e na malha vermelha apresentou maiores valores de fitomassa seca da raiz, parte aérea (folhas e ramos), ramo e total. Verificou-se que a malha vermelha e o controle a pleno sol permitem um desenvolvimento, em relação à fitomassa seca, maior que o das malhas azul e preta. Mas, quanto à altura da parte aérea, na malha azul ela foi superior, mas, aos 180 dias, foi similar à da malha vermelha.

Quanto a área foliar, plantas mantidas sob malha azul tiveram maiores resultados.

A qualidade de luz não interferiu nos teores de clorofila *a*, total e na razão clorofila *a/b*. Para a clorofila *b*, os resultados foram superiores sob a malha azul. A pleno sol foi positivo para o carotenóide cis-fitoeno; na malha vermelha, para os pigmentos  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, não ocorrendo diferença significativa para os demais tratamentos.

A malha azul foi positiva para a porcentagem de nitrogênio e proteína bruta, mas apresentou o menor resultado para fibra em fração neutra, juntamente com a malha preta, sendo maior a pleno sol.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, I.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 1995.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolates choroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. 15.ed. Washington, 1990. v. 2.

ATTRIDGE, T.H. **Light and plant responses**. London: E. Arnold, 1990. 147p.

BALLARÉ, C. L.; SCOPEL, A. L.; SÁNCHEZ, R. A.; RADOSEVICH, S. R. Photomorphogenic processes in the agricultural environment. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 56, n. 5, p. 777-788, 1992.

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas**. Jaboticabal: Funep/UNESP, 1988. 42p.

- CARVALHO, R.F.; PERES, L.E.P. **Fotomorfogênese**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003. 21p. Disponível em: <[http://orion.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/grad01/17\\_crescimento\\_e\\_de\\_senvolvimento\\_fotomorfogenese/Fotomorfo.pdf](http://orion.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/grad01/17_crescimento_e_de_senvolvimento_fotomorfogenese/Fotomorfo.pdf)>. Acesso em: 01 maio 2007.
- DUKE, S. O.; KENYON, W. H. Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development II. Pigment synthesis and photosynthetic function in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) primary leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 25, n. 1, p. 11-18, 1986.
- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.
- EVANS, J.R.; POORTER, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative important of specific area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.24, n.8, p.755-767, 2001.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**-Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA/DEX, 1999.
- FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, London, v.96, n.2, p.169-175, 2005.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage ber analyses**: apparatus, reagents, procedures and some applications. Washington: USDA/ARS, 1970. (Agricultural Handbook, 379).
- LEITE, C.A.; ITO, R.M.; GERALD, L.T.C.; FAGNANI, M.A. **Manejo do espectro de luz através de malhas coloridas visando o controle do crescimento e florescimento de *Phalaenopsis* sp.** 2002. Disponível em: <<http://www.polysack.com/index.php>>. Acesso em: 10 nov. 2006.
- LEÓN, P.; SHEEN, J. Sugar and hormone connections. **Trends in Plant Science**, v.8, n.3, p.110-116, 2003.
- MARTINS, J.R. **Aspectos da germinação de sementes e influência da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.** 2006. 176 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MELO, A. A. M. **Germinação de sementes e ação da qualidade da luz sobre o desenvolvimento vegetativo e aspectos fitoquímicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.** 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENDES, C.; SINTO, S.I.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; TEIXEIRA, L.; SEGURA, A.; SOUZA, D.; BARTH, A.; NICODEMO, A.C. Atividade antimicrobiana *in vitro* de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 191-197, 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MELO, L.A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

PONS, T.L.; VAN BERKEL, Y.E.M. de J. Species-specific variation in the importance of the spectral quality gradient in canopies as a signal for photosynthetic resource partitioning. **Annals of Botany**, London, v.94, n.5, p.725-732, Nov. 2004.

RAJAPAKSE, N.C.; KELLY, J.C. Regulation of chrysanthemum growth by spectral filters. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.3, p.481-485, 1992.

SANDMANN, G.; BÖGER, P. Comparison of the Bleaching Activity of Norflurazon and Oxyfluorfen. **Weed Science**, v. 31, n. 3, p. 338-341, 1983.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E.; COHEN, Y.; LAURIE, S.; STERN, R. KFIR, S.; NAOR, A.; ATZMON, I.; DORON, I.; GREENBLAT -AVRON, Y. ColorNets: a new approach for lightmanipulation in fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 636, p. 609-616, 2004.

SILVA, O.R. **Enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis* via sistema hidropônico.** 1998. 142p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SOUZA, G.S. **Desenvolvimento vegetativo, características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de duas espécies de guaco, submetidos a diferentes condições de qualidade de radiação.** 2006. 118 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SPRECHER, S.L.; NETHERLAND, M.D.; STEWART, A.B. Phytoene and Carotene Response of Aquatic Plants to Fluridone Under Laboratory Conditions. **Journal Aquat. Plant Manage.**, v. 36, p. 111 – 120, 1998.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TSUNOYAMA, Y.; MORIKAWA, K.; SHIINA, T.; TOYOSHIMA, Y. Blue light specific and differential expression of plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*, **Febs Letters**, Amsterdam, v. 516, n. 1/3, p. 225-228, 2002.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by Antrone. **Biochemistry Journal**, London, v.57, p.508-514, 1954.

## 7. ANEXOS

Resumo da análise de variância

**TABELA 1A.** Quantidade de inflorescência de *A. gratissima* durante cinco meses sob os tratamentos de qualidade de luz com 50% de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	QM
Tratamento	3	171211,22*
Época	5	24841,28*
Tratam x época	15	19911,23*
Resíduo	120	150,50
CV (%)	32,27	

\* Significativo a 5%, pelo teste F.

**TABELA 2A.** Estágios de crescimento de *A. gratissima*, expressos em altura da parte aérea (APA) (cm) e diâmetro do ramo principal (D) (cm), cultivada em diferentes níveis de irradiância. UFLA, Lavras, MG. 2007.

FV	GL	QM	
		Altura da parte aérea	Diâmetro
T	3	6783,94*	1,45*
E	3	48140,95*	390,64*
TxE	9	1558,50*	0,86*
R	80	62,78	0,39
CV (%)		11,32	10,80

\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

**TABELA 3A.** Fitomassa seca das folhas, ramos, raízes, total e relação raiz/ parte aérea (RRPA), área foliar (dm<sup>2</sup>), razão de área foliar (RAF) (dm<sup>2</sup>/g), razão de peso de folha (RPF) (g/g) e área foliar específica (AFE) (dm<sup>2</sup>/g) de *A. gratissima* cultivada em diferentes malhas coloridas com 50% de sombreamento, por 180 dias. UFLA, Lavras, MG. 2007.

FV	GL	QM									
		Folhas	Ramos	Raízes	Total	RRPA	AF	RAF	RPF	AFE	
T	3	63,31 <sup>ns</sup>	10599,76*	270,54*	12949,41*	0,05*	68,91*	0,00*	0,00*	0,23*	
R	20	36,86	1332,79	32,28	1917,67	0,00	20,42	0,00	0,00	0,00	
CV		27,39	29,55	14,42	23,66	22,99	22,35	13,67	16,77	7,32	

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo (p>0,05).

**TABELA 4A.** Análise de clorofila *a*, *b* e total e razão clorofila *a/b* e análise de carotenóides cis-fitoeno,  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em plantas de *A. gratissima* cultivadas em diferentes tratamentos de qualidade de luz, com 50% de sombreamento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

FV	GL	QM								
		Clorofila				GL	Carotenóides			
		<i>a</i>	<i>b</i>	Total	Razão <i>a/b</i>		Cis-fitoeno	$\alpha$	$\beta$	Total
T	3	8,588 *	1,784 *	17,61 *	0,218 <sup>ns</sup>	3	12,01*	9,11*	12,46*	9,11*
R	30	2,044	0,272	3,624	0,072	28	2,13	1,38	1,92	1,38
CV (%)		19,46	19,42	18,98	9,72		12,03	15,09	15,20	15,09

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo (p>0,05).

**TABELA 5A.** Valores de porcentagem de umidade (U), nitrogênio (N), proteína bruta (PB), fibra em fração neutra (FDN) e ácida (FDA), açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR) de folhas de *A. gratissima* cultivada em diferentes níveis de irradiância. UFLA, Lavras, MG. 2007.

FV	GL	QM								
		Proteína					Açúcar			
		U	N	PB	FDN	FDA	GL	AST	AR	
T	3	21,63*	0,64*	25,10*	22,48*	5,49*	3	350419683,65*	198999,22*	
R	8	0,08	0,01	0,62	0,34	0,49	44	82690853,78	10530,77	
CV (%)		0,42	4,59	4,59	3,95	6,35		16,36	11,12	

\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

### ARTIGO 3:

#### **CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso SOB EFEITO DE DIFERENTES MALHAS COLORIDAS**

**(Preparado de acordo com a revista *Bragantia*)**

**RESUMO** – O trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer relação quanto ao crescimento de plantas de *A. gratissima* e sua anatomia foliar, sob o efeito de três condições de qualidade de luz proporcionada por malhas coloridas. O material vegetal era oriundo de plantas propagadas por estaquia. As plantas, cultivadas em vasos de 10 litros com preparado de solo (Latosolo Vermelho-Escuro), areia e esterco bovino, na Fazenda Gota da Esperança, UFLA, nos quatro ambientes, caracterizados pela qualidade de radiação solar incidente: a pleno sol, ChromatiNet Vermelha® 50, ChromatiNet Preta® 50 e ChromatiNet Azul® 50, com o mesmo índice de sombreamento (50%). Após cinco meses, foram avaliadas as características: fitomassa seca de folhas, ramos, raízes e razão raiz/parte aérea por planta. Para estudo de anatomia, foram coletadas folhas na posição do sexto nó do ramo principal, abaixo do ápice das plantas, em dez plantas coletadas ao acaso, para cada tratamento. Estudo de crescimento quanto à fitomassa seca total foi superior com malha vermelha e a pleno sol. Folhas mais espessas foram observadas a pleno sol, tendo a espessura da cutícula adaxial, o parênquima paliçádico e a espessura total da folha sido superiores. Maior número de tricomas glandulares foi observado na face abaxial das folhas mantidas a pleno sol (33,67), seguidas pelas mantidas sob malha vermelha (26,75) e nas malhas preta (15,67) e azul (12,92).

**Palavras-chave:** Verbenaceae, microscopia eletrônica, planta medicinal, qualidade de luz.

### ARTICLE 3

#### **GROWTH AND ANATOMICAL CHARACTERIZATION OF *Aloysia gratissima* (Gilles et Hook) Troncoso UNDER EFFECT OF DIFFERENT COLORED NETS**

**ABSTRACT** – This work had the objective to establish the relation between the growth of *A. gratissima* and its foliar anatomy under effect of three quality conditions of light provided by color nets. The vegetal material was derived from cutting propagation. The plants were raised in 10-liter vases with soil mixture (dark-red Latosol) sand and bovine manure at Gota da Esperança farm, UFLA, in four environments, characterized by the quality of solar radiation: full sunlight, ChromatiNet red® 50, ChromatiNet black® 50 e ChromatiNet blue® 50, with the same shading rate (50%). The dry leaf phytomass, branches, roots and the relation root/ aerial part of the plant were evaluated. For an anatomy study leaves were collected at the sixth node position from the main branch beneath the apex of the plants, from ten samples collected at random, for each treatment. The study of growth concerning the total dry phytomass was superior with red mesh and under full sun light. Thicker leaves were observed under full sunlight with a superior adaxial cuticle thickness, palisade parenchyma and the total leaf thickness. A greater number of glandular trichomes was observed at the abaxial face of leaves kept under full sunlight (33.67) followed by the ones kept under red net (26.75) and black net (15.67) and blue net (12.92).

**Key words:** Verbenaceae, electronic microscopy, medicinal plant, light quality

## 1. INTRODUÇÃO

A família Verbenaceae, particularmente os gêneros *Lippia* e *Aloysia*, é encontrada em regiões tropicais e subtropicais. A espécie *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso é um arbusto com propriedades aromáticas, sendo originário, provavelmente, do sul da América do Sul. É usada na medicina popular, no continente americano, desde o EUA, passando pelo México, Brasil, Argentina e Uruguai (Alice et al., 1995). Seu óleo essencial vem sendo bem estudado no Brasil e na Argentina, existindo um interesse especial na sua composição química, uma vez que ocorre uma diversidade destes compostos. A espécie apresenta diferenças no teor e na qualidade do óleo essencial, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e das condições climáticas e geográficas (Silva et al., 2006).

De acordo com Via et al. (1995), a plasticidade fenotípica retrata a habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e ou morfologia, em decorrência de sua interação com o ambiente. Espécies com grande potencial para plasticidade em caracteres ligados à sobrevivência apresentam vantagens adaptativas em ambientes instáveis, heterogêneos ou de transição, visto que as mudanças produzidas podem facilitar a exploração de novos nichos, resultando no aumento da tolerância ambiental.

A variação fenotípica em relação a diferentes níveis de irradiância, revelada pela anatomia foliar, é, geralmente, um forte indicador da disponibilidade e qualidade de luz entre os diversos ambientes que uma planta pode habitar. Folhas de plantas crescidas a pleno sol apresentam-se menores, mais espessas e com maior massa foliar por unidade de área em relação às cultivadas à sombra. O aumento na espessura da folha, especialmente quando

pela alongação ou adição de células paliçádicas, tem sido ligado a uma redução na resistência do mesofilo ao dióxido de carbono (Piel et al., 2002).

A qualidade de luz, como um fator de possível estímulo à plasticidade fenotípica, pode ser observada em alterações quanto à anatomia foliar, à altura de plantas e, no caso de plantas aromáticas, presença de estruturas secretoras de óleos essenciais. Assim, um novo conceito de cobertura agrícola, como as malhas coloridas (cromatinetes), interfere no espectro de luz emitido, que objetiva combinar a proteção física, juntamente com a filtragem diferencial da radiação solar, promovendo respostas fisiológicas desejáveis, reguladas pela luz (Shahak et al., 2004).

De modo diferente das casas de vegetação, as malhas exercem menor interferência sobre o microclima da planta, entretanto, são capazes de modificar tanto a quantidade como a qualidade da radiação solar transmitida, determinando modificações ópticas da dispersão e reflectância da luz (Oren-Shamir et al., 2001).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer relação entre o crescimento de plantas de *A. gratissima* e sua anatomia foliar sob o efeito de três condições de qualidade de luz proporcionada pelos cromatinetes, com 50% de sombreamento, e a pleno sol, como condição de controle.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e condições de cultivo**

O material vegetal utilizado foi obtido a partir de estacas retiradas de uma mesma planta coletadas no Horto Medicinal do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no intuito de se

evitar a variabilidade genética no ensaio. As exsiccatas estão depositadas no herbário da UFLA, sob os registros ESAL 19810 e 20953.

As plantas foram cultivadas na Fazenda Gota da Esperança, UFLA, em vasos de 10 L, com preparado de solo (Latossolo Vermelho-Escuro), areia e esterco bovino, na proporção 2:1:1,5, por cinco meses. Os cultivos foram realizados em quatro ambientes, caracterizados pela qualidade de radiação solar incidente, a pleno sol, ChromatiNet Vermelha® 50, ChromatiNet Preta® 50 e ChromatiNet Azul® 50. Malhas de polietileno de alta densidade monorientado que, conforme o fabricante, alteram o espectro de luz solar, quanto à luz transmitida, porém, com o mesmo índice de sombreamento (50%).

#### **Análise de crescimento**

Após cinco meses de cultivo sob malhas coloridas, foram avaliadas as características: fitomassa seca de folhas, ramos, raízes e razão raiz/parte aérea por planta. Todas as massas foram determinadas em balança eletrônica com precisão de duas casas decimais.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições com dez plantas por tratamento para análises fitotécnicas, analisados pelo teste F, no método estatístico Scott-Knott, a 5% de significância, no software estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999).

#### **Características anatômicas**

Foram coletadas folhas na posição do sexto nó do ramo principal, abaixo do ápice das plantas, em dez plantas coletadas ao acaso, para cada tratamento. Os dados obtidos foram analisados pelo método estatístico Scott-Knott, a 5% de significância, no software estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999).

### **A- Microscopia óptica**

As folhas foram fixadas em álcool etílico 70%, imediatamente após a coleta, até a realização das análises (40 dias). Para os cortes transversais, utilizou-se um micrótomo de mesa, sendo os cortes retirados da porção do terço médio foliar. As seções transversais foram clarificadas em hipoclorito de sódio 1% por um minuto, sendo enxaguados em água destilada, três vezes, por três minutos e neutralizados com solução acética a 1%. A seguir, as seções foram coradas com azul de astra e safranina, seguindo a metodologia descrita por Bukatsch (1972) e Kraus & Arduin (1997). As lâminas foram montadas em glicerina 50% e seladas com esmalte.

Para cada tratamento foram avaliadas cinco folhas de plantas diferentes, sendo, para cada folha, efetuadas cinco avaliações em três posições no corte a partir da nervura central. Utilizou-se uma ocular micrometrada acoplada a um microscópio de luz. As variáveis analisadas para as seções transversais foram: espessura das epidermes nas faces abaxial e adaxial, espessura do mesofilo e limbo foliar. As fotomicrografias foram feitas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se um microscópio Olympus, modelo CBB, acoplado a uma máquina fotográfica. Para os cortes transdérmicos não foi possível a elaboração de laminas, pelo fato de a planta ser rica em tricomas glandulares e tectores.

### **B- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

No Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFLA, as amostras foram cortadas em pedaços de 2 x 5 mm, e, em seguida, foram imersas em solução fixadora (Karnovisk's modificado), pH 7,2, pelo período de 24 horas. Eram, então, lavadas em tampão cacodilato por três vezes, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora, lavadas por duas vezes, durante 15 minutos, em água

destilada. Depois de fixado, o material selecionado para microscopia de varredura foi desidratado em gradientes de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) por três vezes de 10 minutos.

Em seguida, esse material foi levado para o aparelho de Ponto Crítico CPD 030 para secagem, montado em *stubs* para, então, receber cobertura de ouro. As análises foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo40 XVP. As variáveis observadas foram: presença, forma e quantidade de tricomas e glândulas de óleo.

### **C- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

No LME, DFP/UFLA, as folhas foram cortadas em pedaços de 2 x 2 mm e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,05M por 1-2 horas. Sofreram série de desidratação com gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90% por 10 minutos e três vezes com 100% por 10 minutos).

Logo após, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona e resina Spurr 30% por 8 horas, a 70% por 12 horas e duas vezes a 100%, em intervalos de 24 horas. Os tecidos emblocados em resina pura foram colocados em estufa a 70°C, por 48 horas, para a polimerização. Os blocos obtidos foram submetidos ao desbaste com lâminas de barbear para a retirada da resina excedente. Em seguida, foram realizados os cortes em seções semifinas (1µm) e ultrafinas (<100 nm), utilizando-se um ultramicrotomo Reichert-Jung (ultracut), com o auxílio de navalha de diamante.

Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro, colocados em lâminas de vidro e coloridos com azul de toluidina (1 g azul de toluidina, 1 g borato de sódio e 100 mL de água purificados por meio de filtro Millipore 0,2µm) e montados permanentemente em meio Permalt. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro (golden slot grids), secos em raques de alumínio e cobertos com formvar (Rowley & Moran, 1975).

As seções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 minutos cada e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 902 a 80 Kv.

As variáveis observadas nas análises ultra-estruturais foram as posições de estruturas internas, número, área, perímetro e o comprimento dos cloroplastos, em células do parênquima paliçádico, em 10 cortes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a fitomassa de *A. gratissima* acumulou maior valor nos diferentes órgãos (raízes, ramos e total) quando cultivadas a pleno sol e em malha vermelha; esta última devido, sobretudo, à maior incidência de fótons na região do vermelho e vermelho-distante, o que favorece o processo fotossintético (Tabela 1).

A fitomassa seca de folhas foi superior para plantas cultivadas sob malha vermelha. Verificou-se que a malha vermelha e a pleno sol permitem um desenvolvimento em relação fitomassa seca maior que os das malhas azul e preta. Esse resultado, provavelmente, está relacionado ao fato de que a malha azul diminui raios na faixa do vermelho e vermelho-distante e a malha preta não muda a qualidade da irradiação. A razão raiz/parte aérea foi estatisticamente maior a pleno sol. Os demais tratamentos não tiveram diferenças significativas, indicando que as plantas sob a luz direta alocam preferencialmente fotossintetizados para o sistema radicular.

Gonçalves et al. (2001) observou, para a espécie *Ocimum selloi*, maior produção de fitomassa seca sob radiação solar plena. Diferentemente, Souza (2006) verificou diferença na produção de biomassa em todos os tratamentos,

com maior produção de folhas e caule sob malha azul, indicando que as respostas dessas malhas coloridas são particulares para cada espécie.

**TABELA 1.** Fitomassa seca das raízes, folhas e ramos e relação raiz/parte aérea de plantas de *A. gratissima* cultivadas em diferentes malhas coloridas. UFLA, Lavras, MG. 2007.

T	Fitomassa seca (g)				
	Raízes	Folhas	Ramos	Total	RRPA
<b>Preto</b>	14,63 b	10,40 b	24,72 b	49,75 b	0,41 b
<b>Azul</b>	10,46 b	9,82 b	19,77 b	40,05 b	0,35 b
<b>Vermelho</b>	19,14 a	13,99 a	33,38 a	66,51 a	0,40 b
<b>Pleno Sol</b>	24,63 a	11,36 b	30,38 a	66,83 a	0,58 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). RRPA = relação raiz/parte aérea.

Observações anatômicas de folhas de *A. gratissima* por meio de microscopia óptica mostram que as malhas coloridas e a pleno sol interferem na morfologia desse órgão. A espessura total da folha, a cutícula adaxial e o parênquima paliçádico foram superiores a pleno sol e inferiores no parênquima lacunoso (Tabela 2). A cutícula adaxial e o parênquima paliçádico são mais espessos a pleno sol, provavelmente para conferir proteção ao aparato fotossintético, devido à intensidade luminosa. Observou-se também maior espessura total da folha a pleno sol, corroborando com os dados de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) que correspondem à composição de açúcar de parede, com maiores valores a pelo sol.

Esses resultados indicam que a intensidade luminosa estimula a produção de tais açúcares, conferindo maior espessura da cutícula e epiderme adaxial (Capítulo 3, Tabela 5). FDA representa lignina e celulose e FDN representa toda a parede, sendo FDA acrescida de hemicelulose. Tais resultados

indicam que, a pleno sol, as folhas de *A. gratissima* incrementam compostos de parede que lhe conferem proteção à incidência solar.

Observou-se que a espessura total da folha e do parênquima paliçádico foi superior a pleno sol, seguido pelas malhas vermelha, preta e azul. Para a epiderme adaxial, pleno sol e malha vermelha foram superiores as malhas pretas e azuis, respectivamente. Para a epiderme abaxial e a cutícula abaxial, os tratamentos não interferiram significativamente. E quanto à nervura central, tanto para a espessura da nervura central como para a espessura total do limbo, apenas a malha preta foi menor que os demais tratamentos (Tabela 2).

Conforme Lee et al. (2000), folhas de plantas mantidas sob maior irradiância apresentam a epiderme de uma ou de ambas as faces mais espessas, o que está de acordo com os resultados obtidos. Segundo Gonçalves et al. (2001), as células do parênquima paliçádico a pleno sol apresentam-se mais justapostas e alongadas, o que corrobora com os resultados deste trabalho.

**TABELA 2.** Espessura da cutícula adaxial (CA<sub>d</sub>), epiderme adaxial (EA<sub>d</sub>), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL), epiderme abaxial (EA<sub>b</sub>), cutícula abaxial (CA<sub>b</sub>), espessura total da folha (ETF) e espessura do feixe central (FC) e espessura total do limbo (ETL) de corte transversal de folhas de *A. gratissima* cultivada em diferentes malhas coloridas, observadas em micrografia de luz. UFLA, Lavras, MG. 2007.

T	Espessura (µm)								
	Lamina foliar							Limbo	
	CA <sub>d</sub>	EA <sub>d</sub>	PP	PL	EA <sub>b</sub> <sup>ns</sup>	CA <sub>b</sub> <sup>ns</sup>	ETF	FC	ETL
P	2,86 b	29,69 b	104,90 c	58,16 a	9,97 a	2,58 a	208,18 c	191,54 b	388,60 b
A	2,83 b	18,05 c	61,62 d	53,36 a	11,89 a	1,98 a	149,74 d	215,07 a	430,76 a
V	3,45 b	37,02 a	124,25 b	65,24 a	9,38 a	3,01 a	242,35 b	216,91 a	461,31 a
PS	4,89 a	33,85 a	164,35 a	41,40 b	11,27 a	2,46 a	258,24 a	213,85 a	472,92 a

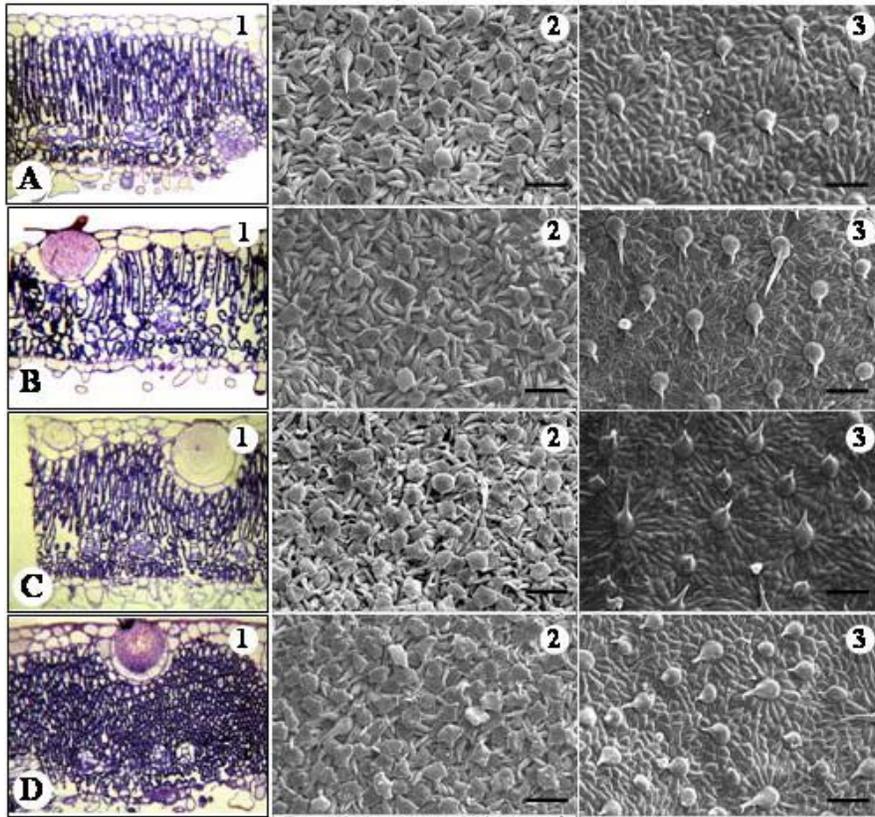
\* Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

A qualidade de luz proporcionada pelas malhas coloridas interferiu na quantidade de tricomas glandulares localizados na epiderme abaxial de folhas de *A. gratissima* que, a pleno sol, apresentaram maior número desses tipos de tricomas (33,67) (Tabela 3; Figura 1, Coluna 2). Tal resultado determinou a ausência de informações sobre a presença de estômatos, sendo verificados, mas impossibilitando sua contagem e determinação de formato devido à quantidade de tricomas na face abaxial para os cortes paradérmicos. Para a face adaxial, foram realizados os cortes paradérmicos, mas sem a presença de estômatos nessa face foliar.

**TABELA 3.** Número (N), área (A), perímetro (P), largura (L) e comprimento (Comp) de cloroplastos da célula do parênquima paliçádico observadas em fotomicrografia de transmissão (MET) e número de tricomas glandulares (G) e tricomas tectores (T) observados em fotomicrografia de varredura (MEV) de folhas de *A. gratissima* cultivada em diferentes malhas coloridas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

T	MET					MEV	
	Cloroplastos					Tricomas	
	Nº	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	P ( $\mu\text{m}$ )	L ( $\mu\text{m}$ )	Comp ( $\mu\text{m}$ )	G <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>
<b>P</b>	2,09 a	5,81 b	12,57 a	1,59 b	4,73 a	15,67 c	3,44 b
<b>A</b>	2,73 a	8,38 a	13,57 a	2,06 a	4,85 a	12,92 c	3,81 b
<b>V</b>	2,27 a	4,16 c	10,38 b	1,48 b	4,06 a	26,75 b	3,63 b
<b>PS</b>	2,36 a	6,48 b	12,43 a	1,67 b	4,68 a	33,67 a	6,37 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott, ( $p \leq 0,05$ ). 1.Epiderme abaxial, 2.Epiderme adaxial.



**FIGURA 1.** Micrografia de luz de cortes transversais de folhas (Coluna 1); eletromicrografia de varredura (MEV) da epiderme abaxial (Coluna 2) e adaxial (Coluna 3) de folhas de *A. gratissima* cultivada em quatro ambientes: (A) malha preta, (B) malha azul, (C) malha vermelha e (D) pleno sol. B=100 $\mu$ m. UFLA, Lavras, MG, 2007.

A eletromicrografia de varredura da epiderme adaxial viabilizou a contagem dos tricomas tectores (Tabela 3; Figura 1, Coluna 3). A pleno sol, os tricomas tectores foram superiores aos demais tratamentos.

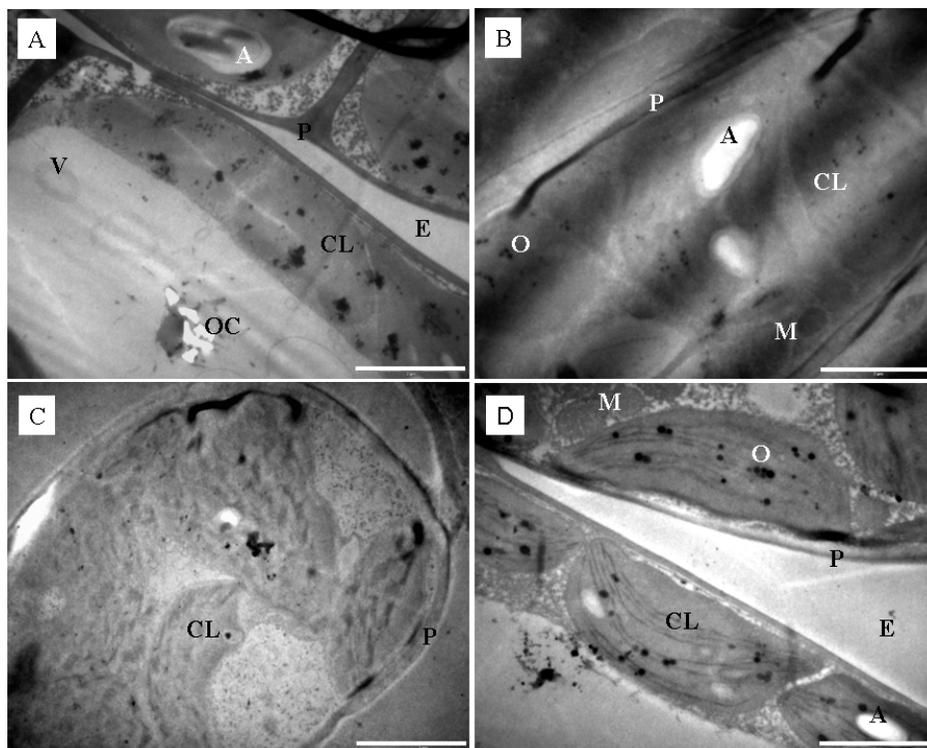
As características da espessura foliar total podem ser evidenciadas pela fotomicrografia de luz, observando-se claramente que folhas submetidas a pleno

sol (Figura 1, coluna 1D) e à malha vermelha (Figura 1, coluna 1C) são mais espessas que as malhas preta (Figura 1, coluna 1A) e azul (Figura 1, coluna 1B).

Nas folhas de *A. gratissima* são ainda observadas estruturas secretoras de carbonato de cálcio (cistólitos), na epiderme adaxial (Figura 1, coluna 1, B, C, D), denominadas cistólitos Cardoso (2005), estudando a mesma espécie sob influência de diferentes níveis de sombreamento, também observaram a presença de cistólitos e grande número de tricomas.

Corroborando com os resultados já apresentados pela espessura total da folha, como o teor de óleo essencial produzido em maior quantidade a pleno sol (0,94) e sob a malha vermelha (0,69) (Capítulo 4, Tabela 1), a eletromicrografia de transmissão (MET) (Figura 2) evidencia ainda mais esses resultados, havendo pontualmente gotas de óleo essencial nos cloroplastos de tais tratamentos. Para o tratamento com malha preta (Figura 2A), os cloroplastos estavam distribuídos na periferia das células e são bem desenvolvidos, podendo se verificar os granas. Ainda havia muitos grãos de amido, vacúolos e cristais de oxalato de cálcio, encontrados apenas nesse tratamento. A MET das plantas a pleno sol (Figura 2D) ainda apresentou cloroplastos e mitocôndrias bem desenvolvidos na periferia das células; para a malha vermelha (Figura 2C), também foram encontrados cloroplastos com gotas de óleo essencial, mas não tão bem formados como a pleno sol e dispersos pela célula. Como na malha vermelha, a malha azul (Figura 2B) apresentou cloroplastos dispersos pela célula, muitos vacúolos e poucos grãos de amido.

Há, ainda, a presença de substância não identificada nos espaços do mesofilo das folhas sob malha preta e vermelha e, em menor proporção, a pleno sol. Quanto à presença de grãos de amido, a malha preta foi a que evidenciou maior número, como também grande número de vacúolos (Figura 2).



**FIGURA 2:** Eletromicrografia de transmissão eletrônica (MET) de folhas de *A. gratissima*, mostrando cloroplastos e grãos de amido nas células do parênquima paliádico, submetidas a diferentes qualidades de luz com malhas coloridas. (A) Malha preta, (B) malha vermelha, (C) malha azul e (D) pleno sol. V: vacúolo, CL: cloroplasto, A: grão de amido, E: espaço intercelular, OC: cristais de oxalato de cálcio, P: parede celular, M: mitocôndria, O: gotas de óleo. Barra =2 $\mu$ m. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Quanto à observação das estruturas internas de folhas, o número e o comprimento de cloroplastos não variaram significativamente para nenhuma das condições observadas. Para o tamanho dos cloroplastos, apenas no tratamento sob malha vermelha é que foram evidenciados menores área e perímetro e, para a largura, o melhor resultado foi para a malha azul, sendo os outros similares. Para a área, a malha azul foi melhor, sendo seguida pelas malha preta e a pleno sol e a malha vermelha (Tabela 3).

#### 4. CONCLUSÃO

A fitomassa seca total foi superior com malha vermelha e a pleno sol.

Folhas mais espessas foram observadas a pleno sol, em que a espessura da cutícula adaxial, o parênquima paliçádico e a espessura total da folha foram superiores.

Maior número de tricomas glandulares foi observado na face abaxial das folhas mantidas a pleno sol (33,67), seguidas por aquelas submetidas à malha vermelha (26,75) e semelhantes nas malhas preta (15,67) e azul (12,92).

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, I.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 1995.

BUKATSCH, F. Benerkrugen zur doppelfarbung astrablausafranina. **Microkosmos**, Stuttgart, v. 61, p. 255, 1972.

CARDOSO, J.C.W. **Níveis de luz e homeopatia sobre caracteres morfofisiológicos e óleo essencial e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc.** 2005. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3-Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

GONÇALVES, J.F.C.; MARENCO, R.A.; VIEIRA, G. Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of Mahogany and Tonka Bear under two light environments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 149-157, 2001.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198 p.

LEE, D.W.; OBERBAUER, S.F.; JOHNSON, P.; KHIRNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. Effects of irradiance e espectrs quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast aian *Hopea* (Diptenocarpeceae) species. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

OREN-SHAMIR M.; GUSSAKOVSKY E.E.; SHPIEGEL E.; NISSIM-LEVI A.; RATNER K.; OVADIA R.; GILLER Y.E.; SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n.3, p. 353-361, 2001.

PIEL, C.; FRAK, E.; LE ROUX, X.; GENTY, B. Effetc of local irradiance on CO<sub>2</sub> transfer in wainut. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 379, p.2423-2430, 2002.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MELO, L.A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wrinkle free section on formvar-coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 151-155, 1975.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E.; GAL, E.; GANELEVIN, R. Colornets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Hort.** v. 659, p. 143-151, 2004.

SILVA, C.C.; VANDRESEN, F.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; TANAKA, C.M.A.; FERREIRA, H.D. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 593-595, 2006.

SOUZA, G.S. **Desenvolvimento vegetativo, características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de duas espécies de guaco, submetidos a diferentes condições de qualidade de radiação**. 118 p. 2006. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIA, S.; GOMULKIEWICZ, R.; JONG, G.; SCHEINER, S.M.; SCHLICHTING, C.; VAN TIENDEREN, P.H. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 5, p. 212-217, 1995.

## 6. ANEXOS

Resumo da análise de variância para os estudos realizados.

**TABELA 1A.** Fitomassa seca das raízes, folhas e ramos e relação raiz/parte aérea de plantas de *A. gratissima* cultivada em diferentes malhas coloridas. UFLA, Lavras, MG. 2007.

Fonte de Variação	GL	QM				
		Raízes	Folha	Ramo	Total	RRPA
Tratamento	3	148,00*	13,59*	150,35*	694,67*	0,04*
Resíduo	12	18,70	1,24	17,58	78,53	0,01
CV (%)		25,11	9,76	15,43	15,89	13,18

\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

**TABELA 2A.** Espessura da cutícula adaxial (CAd), epiderme adaxial (EAd), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL), epiderme abaxial (EAb), cutícula abaxial (CAb) e espessura total da folha (ETF) do corte transversal de folhas de *A. gratissima* cultivadas em diferentes malhas coloridas, observadas em micrografia de luz. UFLA, Lavras, MG. 2007.

FV	GL	QM						
		CAd	EAd	PP	PL	EAb	CAb	ETF
T	3	14.02 *	1032.12*	27331.24*	1508.47*	20.01 <sup>NS</sup>	2.68 <sup>NS</sup>	34613,17*
R	56	0.92	26.74	304.01	189.41	9.40	1.16	211,17
CV		27,39	17.44	15.32	25.23	28.84	42.95	6,77

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo (p>0,05).

**TABELA 3A.** Espessura do feixe central (FC) e espessura total do limbo (ETL) do corte transversal de folhas de *A. gratissima* cultivadas em diferentes malhas coloridas, observadas em micrografia de luz. UFLA, Lavras, MG. 2007.

FV	GL	QM	
		FC	ETL
T	3	2080,73*	21274,36*
R	56	682,95	3411,61
CV		12,48	13,32

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo (p>0,05).

**TABELA 4A.** Número (N), área (A), perímetro (P), largura (L) e comprimento (Comp) de cloroplastos da célula do parênquima paliçádico observados em fotomicrografia de transmissão (MET) e número de tricomas glandulares (G) e tricomas tectores (T) observados em fotomicrografia de varredura (MEV) de folhas de *A. gratissima* cultivada em diferentes malhas coloridas. UFLA, Lavras, MG. 2007.

FV	GL	QM							
		MET					MEV		
		Nº	Área (µm <sup>2</sup> )	P (µm)	L (µm)	Comp (µm)	GL	G	T
T	3	0,79 <sup>ns</sup>	30,51*	14,37 <sup>ns</sup>	0,64*	1,28 <sup>ns</sup>	3	374,73*	7,66*
R	36	1,69	3,06	5,68	0,12	1,13	12	6,65	1,18
CV		55,09	28,17	19,66	20,06	23,17		11,60	25,24

\*Significativo, a 5%, pelo teste F. ns: não significativo (p>0,05).

#### ARTIGO 4:

### TEOR E QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALFAZEMA-DO-BRASIL CULTIVADA EM QUATRO AMBIENTES E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA

(Preparado de acordo com Journal Essential Oil Research)

**RESUMO** – O objetivo foi avaliar o efeito de malhas coloridas sobre o teor, a composição química e a ação antimicrobiológica do óleo essencial de *A. gratissima*. O material vegetal foi propagado por estaquia. As plantas foram cultivadas por cinco meses, em quatro tipos de ambiente, a pleno sol e sob três malhas coloridas ChromatiNet® 50 (preta, vermelha e azul). Amostras, no mês de novembro de 2006, foram submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger graduado. Foi mensurado o teor percentual de óleo a partir do volume e peso. As análises químicas foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP-6890 acoplado a detector seletivo de massa HP-5975 (CG-MS). Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados para: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*. O inóculo foi padronizado de acordo com a escala de McFarland (0,5), com concentração final de células de  $10^5$ /mL. A determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi feita pelo método de concentração mínima inibitória (MIC). O maior teor de óleo essencial é a pleno sol. O óleo essencial das inflorescências é mais eficiente no controle dos microrganismos. A fração do óleo essencial das inflorescências foi eficiente para *Streptococcus pneumoniae* e a levedura *Candida albicans*.

**Palavras-chave:** Verbenaceae, *Aloysia gratissima*, planta medicinal, qualidade de luz, farmacognosia, fitoquímica.

## ARTICLE 4

### CONTENTS AND QUALITY OF THE ESSENTIAL OIL OF BRAZILIAN-LAVANDER RAISED IN FOUR DIFFERENT ENVIRONMENTS AND ITS ANTI-MICROBIAL ACTION

**ABSTRACT** – The objective of this work was to evaluate the effect of colored nets on the essential oil contents, the chemical composition and the anti-microbial action of the essential oil of *A. gratissima*. The vegetable material was propagated through tree props. The plants were raised for five months in four types of environment, under full sun light and three colored nets – ChromatiNet®50 (black, red and blue). In November 2006, samples were submitted to hydrodistillation in gauged Clevenger equipment. The percentage of oil according to volume and weight were measured. The chemical analyses were done in a gas chromatographer HP-6890 attached to a selective detector of mass HP-5975 (CG-MS). The anti-microbial activity tests were carried out for: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*. The inoculum was standardized according to the McFarland scale (0.5), with final concentration of cells at  $10^5$ /mL. The determination of anti-microbial activity of essential oils was done by the minimal inhibitory concentration (MIC). The higher content of essential oil is under full sun light. The blossoming essential oil is more efficient in controlling microorganisms. The essential oil of blossoming was efficient for *Streptococcus pneumonea* and yeast *Candida albicans*.

**Key words:** Verbenaceae. *Aloysia gratissima*, medicinal plant, light quality, pharmacognosy, phytochemistry.

## 1. INTRODUÇÃO

Os gêneros *Lippia* e *Aloysia*, pertencentes à família Verbenaceae, são encontrados em regiões tropicais e subtropicais e originários, provavelmente, do sul da América do Sul. A espécie *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso é um arbusto com propriedades aromáticas, usada na medicina popular como expectorante, digestivo e antiespasmódico (Soler et al., 1985).

A disponibilidade, a duração e a qualidade da luz constituem fatores do ambiente físico que interferem diretamente no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de plantas, podendo levar a alterações bioquímicas e anatômicas. Malhas coloridas representam um conceito agrotecnológico novo, que objetiva combinar a proteção física, juntamente com a filtragem diferencial da radiação solar, para promover respostas fisiológicas desejáveis, reguladas pela luz (Shahak et al., 2004).

De modo diferente das casas de vegetação, as malhas exercem menor interferência sobre o microclima da planta. Entretanto, são capazes de modificar tanto em quantidade como em qualidade a radiação solar transmitida, determinando modificações ópticas da dispersão e da reflectância da luz (Oren-Shamir et al., 2001).

Os resultados encontrados por Ricciardi et al. (2000, 2005) evidenciam que há dependência da composição dos óleos essenciais com a origem geográfica das plantas da espécie *Lippia alba*. Ao contrário do observado no gênero *Aloysia*, suas plantas se mostraram estáveis quanto à composição do óleo essencial, independente do local de coleta, porém, com um incremento de cetonas  $\alpha$ - e  $\beta$ -tuionas em *A. gratissima*, sendo tóxicos e podendo causar convulsões (Ricciardi et al., 2000).

Óleos essenciais vêm sendo estudados intensivamente para serem utilizados como agentes antimicrobianos e com ação farmacológica anticancerígena e antiinflamatória.

Nesse sentido, é de grande importância, para a indústria farmacêutica, um medicamento com especificidade, principalmente contra infecções hospitalares, sendo os óleos essenciais uma fonte para novos protótipos de antimicrobianos. Sartoratto (2001) identificou, entre muitos compostos presentes no óleo de *Aloysia gratissima*, limoneno (1,80%), linalol (2,15%), trans- e cis-pinocanfona (10,86% e 4,02%) e trans-acetato de pinocarvoíla (9,27%) entre os majoritários. Esses compostos já foram descritos como tendo propriedades terapêuticas.

Cocos gram-positivos são importantes agentes de infecção e a resistência destes patógenos a antimicrobianos tem aumentado, principalmente no ambiente hospitalar. Estes patógenos incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), *Enterococcus* spp. (Mendes et al., 2002) e *Streptococcus pneumoniae*; como gram-negativos pode-se citar a *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, esses agentes têm a capacidade de adquirir resistência aos antibióticos utilizados no meio hospitalar, tornando as infecções secundárias mais difíceis de serem tratadas. Ainda no ambiente hospitalar a incidência de infecções oportunistas é significativa, sendo *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella choleraesuis* importantes agentes desse tipo de infecção.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de malhas coloridas sobre a produção de óleo essencial em *A. gratissima*, bem como determinar sua composição química e ação antimicrobiana.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e condições de cultivo**

Os ensaios foram realizados na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais e no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), na Universidade de Campinas, São Paulo, no período de 2005 a 2007.

O material vegetal utilizado era oriundo de plantas coletadas no Horto Medicinal/ Departamento de Agricultura (DAG) da UFLA, propagadas por estaquia, no intuito de eliminar o fator variabilidade genética no ensaio. As exsiccatas estão depositadas no herbário da Universidade Federal de Lavras, sob os registros ESAL 19810 e 20953. As estacas enraizadas foram transplantadas para vasos de 10 litros, com preparado de solo (Latosolo Vermelho-Escuro), esterco de curral e areia na proporção de 2:1,5:1, para compor o experimento de qualidade de luz, com 20 plantas por tratamento.

As plantas foram cultivadas por cinco meses, em quatro tipos de ambientes, caracterizados pela qualidade de radiação solar incidente, sendo a pleno sol como controle e sob três malhas coloridas ChromatiNet® 50 (preta, vermelha e azul). Estas, de acordo com o fabricante, alteram o espectro de luz solar transmitido, porém, com o mesmo índice de sombreamento, de 50%.

As características das frações de óleo essencial foram analisadas em quatro repetições e os dados submetidos ao teste F (Scott-Knott, a 5%) no software Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999).

### **Extração do óleo essencial**

Amostras compostas de 120 g de massa fresca de folhas e 60g de flores foram coletadas no mês de novembro de 2006 e submetidas a hidrodestilação em

700 mL de água destilada, em balão volumétrico de 2 litros, em aparelho de Clevenger graduado, por duas horas. Foram realizadas quatro repetições para cada tratamento. O teor percentual de óleo foi determinado a partir do volume apresentado na bureta do aparelho de Clevenger, como também pela diferença de peso (Clevenger modificado). Após a extração, o hidrolato coletado foi extraído com 15 mL de diclorometano (Quimex®, Lote 27849), em partição líquido-líquido, em funil de separação de 100 mL, com descanso de 20 minutos, por três vezes. Recolhida a porção orgânica, foi adicionado, como dessecante, sulfato de magnésio anidro em excesso durante 24 horas. Após esse período, o extrato foi filtrado e deixado em capela de exaustão para evaporar o solvente orgânico até peso constante, determinando-se o teor percentual de óleo essencial pelo peso. Após a evaporação do solvente, o material foi transferido para vidro com tampa e acondicionado em geladeira.

### **Análise química**

As análises químicas foram realizadas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/Unicamp, em um cromatógrafo a gás HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas HP-5975, nas seguintes condições operacionais: coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), com fluxo de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> de hélio como gás de arraste e aquecimento com temperatura programada (60°C com um gradiente de 3°C $\cdot$ min<sup>-1</sup> até 240°C). O volume de injeção da amostra de concentração de 10mg/mL diluída em acetato de etila (Synth, Lote 81022), a razão de split foi de 30:1. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 250°C, respectivamente. A porcentagem relativa dos analitos foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação, dos espectros de massas com os das bibliotecas NIST 275 (GC/ MSD), por comparação entre os espectros de massas e índices de Kovatz (IK) com os da

literatura (Adams, 1995). Os tempos de retenção foram calculados por meio da co-injeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C<sub>9</sub>–C<sub>20</sub> (Sigma, EUA).

## **Atividade antimicrobiana**

### **A. Microrganismos**

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados para os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis* CCT 2576, *Staphylococcus aureus* CCT 2740, *Salmonella choleraesuis* CCT 4296, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os microrganismos estão registrados nas seguintes coleções: American Type Culture Collection (ATCC) e Coleção de Cultura Tropical (CCT), Fundação André Tosello, Campinas, SP e foram gentilmente cedidos pela Divisão de Microbiologia do CPQBA–Unicamp.

O meio de cultura para manutenção e testes de atividade com as bactérias foi o meio Muller-Hinton, contendo (g/L): infusão de carne, 2,0; hidrolisado de caseína, 17,5; amido, 1,5, ágar-ágar, 15,0.

O meio para manutenção e testes de atividade com levedura *C. albicans* foi o meio RPMI – 1640.

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizados os meios citados acima, sem ágar-ágar (meio líquido).

Para padronização do número de células do inóculo foi utilizada a escala de McFarland (0,5), em espectrofotômetro, para uma ABS entre 0,08 e 0,100, a 600 nm, sendo os concentrados diluídos com solução salina para uma concentração final de células de 10<sup>5</sup>/mL.

## **B. Preparo dos óleos essenciais para os testes de atividade pelo método da microdiluição**

Foram determinadas a massa da amostra de óleo essencial e respectivas frações. A seguir, foi preparada solução estoque do óleo essencial em água e Tween 80 na concentração de 5 mg/mL (solução de Tween 80 = 0,1% em água esterilizada). Uma alíquota de 240 µL da solução acima foi retirada e foram adicionados 60 µL de água destilada esterilizada (solução = 4.000 µg/mL). Para os testes, foram utilizados 100 µL no primeiro poço de diluição.

## **C. Determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método da microdiluição (CLSI, 2005). Determinação da MIC (concentração mínima inibitória).**

Os testes microbiológicos foram realizados em capela de fluxo laminar horizontal, classe 100. Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços (placa de ELISA) foram depositados 100 µL de caldo Muller-Hinton para testes com bactérias e meio RPMI - 1640 para levedura. Para cada fração de óleo essencial foram realizadas três repetições, sendo analisadas cinco frações, a saber: fração preta, azul, vermelha, folhas e flores a pleno sol.

Na linha A foram acrescentados 50 µL da solução do material a ser testado (frações do óleo), de concentração conhecida (uma fração diferente a cada três colunas) e, ainda, 100 µL do meio de cultura, sendo esta linha A referente ao controle de esterilidade dos óleos e meios de cultura.

Em seguida, 100 µL dos mesmos materiais foram adicionados na linha B, o conteúdo dos orifícios homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (C), repetindo-se esse procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material, entre 1,0 e 0,016 mg/mL. Os 100 µL finais foram desprezados.

Na coluna 12 (linha B), 100 µL de uma solução de cloranfenicol (bactérias) ou nistatina (*C. albicans*) foram adicionados (controles antibióticos), seguindo-se diluição até a linha H, conforme procedimento anterior utilizado para os óleos essenciais.

Em seguida, 100 µL de uma suspensão dos microrganismos, de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland nº 0,5 e diluída para concentração final de 10<sup>5</sup> células/mL foram adicionados em todos os poços, referentes a cada tratamento e microrganismo.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, após esse período, foram adicionados 50 µL de uma solução reveladora de cloreto de trifetil tetrazolium (CTT), seguindo-se reincubação por 3 horas.

A MIC foi definida como a menor concentração do material capaz de impedir o crescimento dos microrganismos. O revelador permite observar os poços onde houve crescimento, pois células com atividade respiratória coram-se de vermelho. Do mesmo modo, permitiu avaliar se houve inibição do crescimento em locais correspondentes a uma determinada fração do óleo essencial onde não houve reação com o revelador.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicam que há um maior teor de óleo essencial de *A. gratissima* quando esta é cultivada a pleno sol. Para os cromatogramas não houve diferença entre os tratamentos, não havendo dados para a extração das inflorescências (Tabela 1).

**TABELA 1.** Volume de óleo essencial (mL), teor do óleo essencial por Clevenger graduado (volume) (%) e Clevenger modificado (massa) (%) de óleo essencial de massa seca de *A. gratissima*. UFLA, Lavras, MG. 2007.

<b>Cromatinetes</b>	<b>Vol (mL)</b>	<b>Teor (Volume)</b>	<b>Teor (Massa)</b>
<b>Preto</b>	0,82 b	0,61 b	0,12 c
<b>Azul</b>	0,90 b	0,68 b	0,23 c
<b>Vermelho</b>	1,00 b	0,69 b	0,36 b
<b>Pleno sol</b>	1,27 a	0,94 a	0,35 b
<b>Inflorescência</b>	-	-	0,56 a

\* Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott, ( $p \leq 0,05$ ).

Pinto et al. (2007), avaliando a influência de níveis de luz (Aluminet®) sobre a produção de óleo essencial de *A. gratissima*, observaram um teor de 2,22% a pleno sol para massa seca, não sendo influenciado pela intensidade de luz. Uma possível explicação para essa diferença tão significativa é o fato do material ter sido submetido à secagem antes da extração, o que não ocorreu com este estudo.

Nas mesmas condições de radiação, Souza (2006), estudando duas espécies de guaco, observou que, para *Mikania laevigata* e *M. glomerata*, houve um decréscimo na produção de óleo essencial na condição a pleno sol e um incremento para os tratamentos com sombreamento de 50%. Para *M. laevigata*, os maiores teores de óleo essencial foram encontrados com a malha preta (266% a mais que a pleno sol) e, para *M. glomerata*, maiores teores foram observados no tratamento sob malha azul.

Tais resultados indicam que a cor da malha influenciou o desenvolvimento de estruturas anatômicas que secretam óleo, como células oleíferas, canais secretores e tricomas glandulares (Gonçalves, 2001) para as

espécies de Mikania. Quando se observam as mesmas condições para *A. gratissima*, os maiores resultados são a pleno sol, o que corrobora com Pinto et al. (2007). Gonçalves (2001), trabalhando com *Ocimum seloi*, observou que o teor de óleo não diferiu com alteração da intensidade de luz.

Os resultados também mostraram que o sombreamento de 50% interferiu na produção do óleo essencial, de *A. gratissima*. Folhas a pleno sol tiveram maior teor de óleo essencial, porém, com um decréscimo no tamanho das mesmas, mas sem alterar a fitomassa seca das folhas (Tabela 3, Cap 3).

Foram identificados, nas amostras, de maneira geral, um monoterpeno, 16 monoterpenos oxigenados, nove sesquiterpenos e seis sesquiterpenos oxigenados, totalizando 32 compostos, sendo 22 oxigenados e 10 não oxigenados (Tabela 2).

Ao observar a quantidade de mono e sesquiterpenos presentes em folhas, verifica-se um equilíbrio nos tratamentos a pleno sol e nas malhas coloridas, porém, para as inflorescências, há uma produção muito superior de sesquiterpenos. Observa-se também, nas malhas coloridas, um leve aumento de sesquiterpenos nas folhas da malha azul, não observado para as demais malhas (Tabela 3). Houve, também a interconversão de alguns compostos. como entre os sesquiterpenos  $\alpha$ -humuleno e cariofileno (E) trans (Tabela 2).

O óleo de *A. gratissima* é composto de monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados ou não, com a composição das folhas e flores a pleno sol caracterizando a produção de alguns componentes para as flores com uma média superior de 50% de produção de  $\beta$ -elemeno, trans-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno, biciclogermacreno,  $\alpha$ -bulneseno, cubebol, germacreno B, espatulenol, óxido de cariofileno, guaiol, 10- epi  $\gamma$  eudesmol e bulnesol.

O monoterpeno Verbeno foi identificado apenas para a fração do cromatínete vermelho. Para os monoterpenos oxigenados pinocanfona trans e cis, há uma produção muito inferior nas inflorescências, sendo superior para o

cromatínete vermelho e folhas a pleno sol. Entre os sesquiterpenos, o  $\gamma$ -elemeno foi encontrado nas inflorescências a pleno sol e no cromatínete azul e o sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno foi encontrado apenas nas inflorescências a pleno sol.

Ricciardi et al. (2000) relatam que, para *A. gratissima*, há pouco conteúdo de terpenos oxigenados, sendo descritos  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -tuiona,  $\beta$ -cariofileno, germacreno D, acetato de terpenilo,  $\alpha$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno, óxido de cariofileno, nerolidol, com destaque para a  $\alpha$ -tuiona, que não havia sido descrita até então para a espécie. O mesmo autor ainda indica que a época em que há maiores concentrações de tais compostos é na primavera e as mínimas no verão argentino, o que corrobora com os resultados por nós encontrados, pois a extração foi realizada no verão.

Soler et al. (1985), estudando folhas de *A. gratissima* coletadas por dois anos consecutivos no período de outubro, não sendo incluídas as flores, observaram poucas variações químicas no óleo essencial dos quais 70% consistiam de hidrocarbonetos sesquiterpenos. Esses autores observaram que o maior componente foi o sabineno (30%) e o que apareceu menor em quantidade foi o  $\beta$ -pineno (8%). Os componentes oxigenados foram os sesquiterpenos álcoois ou cetonas. Monoterpenos oxigenados apresentaram menos de 6% do total do óleo essencial. Pinocanfona e isopinocanfona foram identificados pela primeira vez em *Aloysia*.

Sartoratto (2001), estudando *A. gratissima* pela SPME e corroborando com nossos resultados, identificou alguns constituintes, como  $\alpha$ -pineno (0,18),  $\beta$ -pineno (3,65), trans-pinocanfona (10,86) e germacreno D (4,56), entre outros. Nos resultados, o  $\beta$ -pineno não foi identificado; o sabineno apenas 1,5% e, com maior porcentagem, o trans- e o cis-pinocanfona (16% e 4,9%), respectivamente (Tabela 3).

De acordo com os resultados de atividade e MIC, os melhores resultados foram obtidos para *Candida albicans* e *Streptococcus pneumoniae*, com a fração de óleo das inflorescências com a menor dose inibitória de 0,025 mg/mL, seguida pela fração azul, com MIC de 0,05 mg/mL para *S. pneumoniae*. Para *C. albicans*, as frações de inflorescência e preta foram capazes de inibir os microrganismos a concentrações de 0,02 mg/mL e 0,3 mg/mL, respectivamente, sendo ainda a fração de inflorescência ativa para *Bacillus subtilis* (MIC = 0,15 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 0,15 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (MIC = 0,25 mg/mL) (Tabela 3).

Muitos dos compostos identificados no óleo essencial de *A. gratissima* foram descritos anteriormente como tendo atividade antimicrobiana, incluindo 1,8-cineol, limoneno e linalol, geranial, germacrene-D, e mentol. Duarte et al. (2005), estudando o óleo de *A. gratissima* da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/ UNICAMP (São Paulo), não encontraram atividade anti-*Candida albicans*, corroborando com a hipótese de que a espécie pode ser afetada pela região de plantio, como descrito também por Ricciardi et al. (2000, 2005) e Soler et al. (1985).

Mendes et al. (2002), estudando a interação de dois antibióticos para tratamento de cepas multirresistentes de infecção hospitalar, para *S. pneumoniae*, a MIC<sub>50</sub>, para cefotaxima, cloranfenicol e quinupristina/dalfopristina (Q/D), foi de 0,023, 1,5 e 0,5 µg/mL, respectivamente, enquanto o MIC<sub>90</sub> obtido para cepas de *S. aureus* oxacilina-resistentes e oxacilina-sensíveis para Q/D foi de 0,5µg/mL. Para os *Staphylococcus* coagulase-negativos oxacilina-resistentes e oxacilina-sensíveis, o MIC<sub>90</sub> obtido para Q/D foi de 0,75µg/mL e 0,38µg/mL, respectivamente, com 100% de sensibilidade para ambas as espécies, corroborando a possibilidade do óleo de *A. gratissima* ser um protótipo para tratamento de *S. pneumoniae*.

De acordo com os resultados, todas as frações apresentaram atividade antimicrobiana, mas, em comparações com o antibiótico utilizado, a fração que permitiu obter menores doses de inibição foi a obtida a partir das inflorescências seguido pela fração azul para *S. pneumoniae*. Para a levedura *C. albicans*, a fração mais ativa foi a das inflorescências, sendo rica em germacreno-D (Tabela 4).

**TABELA 4.** Concentração mínima inibitória (MIC – mg/mL) do óleo essencial de *Aloysia gratissima* cultivada nos cromatinetes azul (A), vermelho (V), preto (P) e pleno sol (folhas e flores). UFLA. Lavras, MG, 2007.

Microorganismos	Amostras				
	Cromatinetes			Pleno sol	
	A	V	P	Folha	Flor
<i>Bacillus subtilis</i>	0,6	0,8	0,8	*	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,8	0,6	0,6	0,8	0,15
<i>Salmonella choleraesuis</i>	*	*	*	*	*
<i>Streptococcus pneumonea</i>	0,05	0,2	0,25	0,6	0,025
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,8	0,9	*	0,25
<i>Candida albicans</i>	0,9	0,9	0,3	0,9	0,02

\* concentração >1,0 mg/mL

As frações das inflorescências e da malha azul apresentam em comum bulnesol, óxido de cariofileno, guaiol, trans (E) cariofileno e espatulenol.

Estes resultados corroboram a importância da etnofarmacologia em estudos guiados pela cultura popular, como o uso da *A. gratissima* para tratamentos de pneumonias e afecções brônquicas. No entanto, ainda são

necessários estudos farmacológicos e clínicos específicos para viabilizar o uso do óleo essencial ou frações de *A. gratissima* como um fitoterápico.

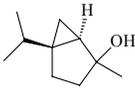
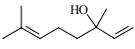
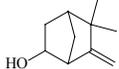
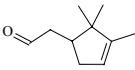
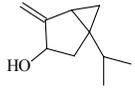
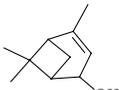
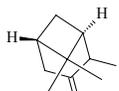
#### 4. CONCLUSÃO

O maior teor de óleo essencial foi obtido quando *A. gratissima* foi cultivada a pleno sol.

De acordo com a concentração inibitória mínima (MIC), o óleo essencial das inflorescências mostrou-se mais eficiente no controle dos microrganismos estudados.

A fração do óleo essencial das inflorescências de *A. gratissima* apresentou potencial para inibição de *Streptococcus pneumoniae* e *Candida albicans*. A fração controle (pleno sol) apresentou atividade significativa para os microrganismos para *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e a levedura *C. albicans*.

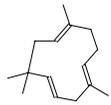
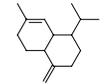
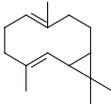
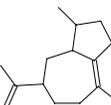
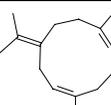
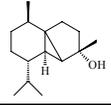
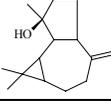
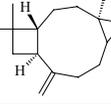
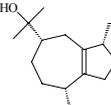
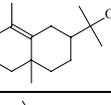
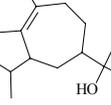
**TABELA 2.** Nomenclatura comum, índice de Kovatz (IK), IUPAC, fórmula linear, peso molecular (PM) e estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil. UFLA, Lavras, MG. 2007.

Analito	IK	IUPAC, fórmula linear e peso molecular (PM)	Estrutura química
<b>MONOTERPENO</b>			
Verbeno (trans)	1145	Verbenene C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> PM=152	
<b>MONOTERPENO OXIGENADO</b>			
Trans hidrato de sabineno	1098	trans-5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O PM=154	
Linalol	1100	2,6-Dimethyl-2,7-octadien-6-ol C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O PM=154	
Canfenol	1106	Camphenol C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	
α-canfolenal	1125	2,2,3-Trimethyl-3-cyclopentacetaldehyde C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	
Sabinol (trans)	1138	Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl), [1S-(1α,3β,5α)] C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	
cis-Pinal-2-ol	1140	cis 2- Pinanol C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O PM=154	
Trans verbenol	1144	trans-4,6,6-Trimethyl bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	
Pinocanfona (trans)	1161	trans-2,6,6-Trimethyl bicyclo[3.1.1]heptan-3-one C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	
Pinocanfona (cis)	1173	2,6,6-Trimethyl bicycle [3.1.1]heptan-3-one C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	

Continuação da tabela 2.

Terpin-4-ol	1176	4-Methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O PM=154	
Cimen-8-ol (para)	1184	1-Methyl-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-benzene C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O PM=150	
α- terpinol	1189	2-(4-Methylcyclohex-3-enyl)-propan-2-ol C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O PM=154	
Mirtenol	1195	6,6-Dimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-en-2-yl-methanol C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	
trans-carveol	1217	(1S,5R)-2-Methyl-5-(1-methylethenyl)-cyclohexen-2-ol C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O PM=152	
Acetato de Bornila	1284	endo-1,7,7-Trimethyl bicyclo[2.2.1]hept-2-yl acetate C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> PM=196	
Acetato de trans pinocarvoila	1300	trans-6,6-Dimethyl-2-methylene bicyclo[3.1.1]heptan-3-yl acetate C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> PM=194	
<b>SESQUITERPENO</b>			
β-bourboneno	1382	beta-Bourbonene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
β-elemenno	1390	2,4-Diisopropenyl-1-methyl-1-vinylcyclohexane C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
Cariofileno (E) trans	1417	β-trans-caryophyllene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
γ-elemenno	1431	1-Methyl-2,4-bis(1-methyl ethylidene)-1-vinylcyclohexane C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	

Continuação da tabela 2.

$\alpha$ -humuleno	1450	$\alpha$ -Caryophyllene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
$\gamma$ -muuroleno	1479	$\gamma$ -Muurolene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
Biciclogermacreno	1494	3,7,11,11-Tetramethylbicyclo[8.1.0]2,6-undecadiene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
Bulneseno ( $\alpha$ )	1502	(Z)-1,2,3,5,6,7,8,8alpha-Octahydro-1,4-dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)azulene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
Germacreno (B)	1554	(E,E)-1,5-Dimethyl-8-(1-methylethylidene)-1,5-cyclodecadiene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> PM=204	
<b>SESQUITERPENO OXIGENADO</b>			
Cubebol	1512	(-)-Cubebol C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O PM=222	
Espatuleno	1575	Isospathulenol C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O PM=220	
Óxido de cariofileno	1580	Caryophyllene oxide C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O PM=220	
Guaiol	1597	Champacol C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O PM=222	
10- epi $\gamma$ eudesmol	1618	10-epi-gamma-Eudesmol C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O PM=222	
Bulnesol	1665	2-(3,8-Dimethyl-1,2,3,3alpha,4,5,6,7-octahydro-5-azulenyl)-propan-2-ol C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O PM=222	

**TABELA 3.** Composição química (%) do óleo essencial de plantas de *A. gratissima* cultivadas sob malhas vermelha (V), preta (P) e azul (A) e a pleno sol como controle de *A. gratissima*. UFLA, Lavras, MG. 2007.

Analito	IK	% presente na amostra				
		Pleno sol		Cromatinetes		
		Folha	Flor	V	P	A
<b>MONOTERPENO</b>						
Verbeno (trans)	1145	-	-	2,358	-	-
$\Sigma$ monoterpenos		-	-	<b>2,358</b>	-	-
<b>MONOTERPENO OXIGENADO</b>						
Trans hidrato de sabineno	1098	1,531	0,245	1,600	1,352	1,070
Linalol	1100	1,018	-	1,231	1,247	0,720
Canfenol	1106	0,386	-	0,518	-	-
$\alpha$ -canfolenal	1125	0,409	-	0,530	-	-
Sabinol (trans)	1138	4,483	0,556	3,954	3,242	2,476
cis-pinal - 2- ol	1140	0,644	-	0,631	0,573	-
Trans verbenol	1144	2,464	0,960	-	2,572	1,836
Pinocanfona (trans)	1161	16,344	2,109	20,849	10,895	12,454
Pinocanfona (cis)	1173	4,895	0,818	6,022	3,499	3,708
Terpin-4-ol	1176	0,510	-	0,485	0,472	-
Cimen-8-ol (para)	1184	0,468	-	-	-	-
$\alpha$ -terpinol	1189	-	-	-	0,41	-
Mirtenol	1195	3,717	0,686	3,227	2,962	2,338
trans-carveol	1217	0,558	-	0,485	0,555	-
Acetato de bornila	1284	1,043	-	1,069	1,022	0,854
Acetato de trans pinocarvoila	1300	17,577	6,191	17,522	17,65	14,509
$\Sigma$ monoterpenos oxigenados		<b>56,047</b>	<b>11,565</b>	<b>58,123</b>	<b>46,451</b>	<b>39,965</b>
$\Sigma$ monoterpenos totais		<b>56,047</b>	<b>11,565</b>	<b>60,481</b>	<b>46,451</b>	<b>39,965</b>

Continuação da tabela 3.

<b>SESQUITERPENOS</b>						
$\beta$ -bourboneno	1382	0,489	-	-	-	-
$\beta$ -elemeno	1390	0,446	0,872	-	0,527	0,521
Cariofileno (E) trans	1417	3,137	8,928	2,361	2,852	3,779
$\gamma$ -elemeno	1431	-	0,730	-	-	0,553
$\alpha$ -humuleno	1450	1,111	2,352	0,930	1,115	1,531
$\gamma$ -muuroleno	1479	4,635	2,053	3,776	5,620	6,244
Biciclogermacreno	1494	2,759	4,223	1,736	2,451	2,732
Bulneseno ( $\alpha$ )	1502	0,460	0,742	-	0,470	0,534
Germacreno (B)	1554	5,638	10,480	4,218	5,977	6,749
<b><math>\Sigma</math> sesquiterpenos</b>		<b>18,675</b>	<b>30,38</b>	<b>13,021</b>	<b>19,012</b>	<b>22,643</b>
<b>SESQUITERPENOS OXIGENADO</b>						
Cubebol	1512	1,000	1,455	0,846	1,030	1,051
Espatuleno	1575	2,626	3,789	2,027	1,965	2,241
Guaiol	1597	11,481	19,541	12,176	16,308	17,277
Óxido de cariofileno	1580	3,343	8,245	2,788	2,955	3,651
10- epi $\gamma$ eudesmol	1618	0,533	1,550	0,481	0,653	0,675
Bulnesol	1665	3,688	10,004	4,558	6,488	7,118
<b><math>\Sigma</math> sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>22,671</b>	<b>44,584</b>	<b>22,876</b>	<b>29,399</b>	<b>32,013</b>
<b><math>\Sigma</math> sesquiterpenos totais</b>		<b>41,346</b>	<b>74,964</b>	<b>35,897</b>	<b>48,411</b>	<b>54,656</b>
<b><math>\Sigma</math> não identificados</b>		2,610	13,470	3,620	5,138	5,379

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. Allured, Illinois, 1995. 456 p.

CLINICAL AND LABORATORIAL STANDARDS INSTITUTE. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos – **Norma M7-A6**, v. 23, n. 2, 2005.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 305–311, 2005.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**-Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA/DEX, 1999. Software.

GONÇALVES, L. A. **Ontogenia dos tricomas glandulares e influência da radiação solar no desenvolvimento e no teor de óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae)**. 2001. 95 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LEITE, C.A.; ITO, R.M.; GERALD, L.T.C.; FAGNANI, M.A. **Manejo do espectro de luz através de malhas coloridas visando o controle do crescimento e florescimento de *Phalaenopsis* sp.** 2002. Disponível em: <<http://www.polysack.com/index.php>>. Acesso em: 10 nov. 2006.

MENDES, C.; SINTO, S.I.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; TEIXEIRA, L.; SEGURA, A.; SOUZA, D.; BARTH, A.; NICODEMO, A.C. Atividade antimicrobiana *in vitro* de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 191-197, 2002.

OREN-SHAMIR M.;GUSSAKOVSKY E.E.;SHPIEGEL E.;NISSIM-LEVI A.;RATNER K.;OVADIA R.;GILLER Y.E.;SHAHAK Y Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n, 3, p. 353-361, 2001.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MELO, L.A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

RICCIARDI, G.A.L.; RICCIARDI, A.I.A.; BANDONI, A.L. **Fitoquímica de verbenáceas (*Lippias y Aloysias*) del Nordeste Argentino**. Corrientes, Universidad Nacional del Nordeste, 2000. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas).

RICCIARDI, G.A.L.; van BAREN, C.M.; DI LEO LIRA, P.; RICCIARDI, A.I.A.; LORENZO, D.; DELLACASA, E.; BANDONI, A.L. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 4, p. 698-703, 2005.

SARTORATTO, A. **Análise de constituintes voláteis de plantas aromáticas por micro-extração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME/CG)**. 2001. 86p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E.E.; GAL, E.; GANELEVIN, R. Colornets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, Amsterdam v. 659, p. 143-151, 2004.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1343-1345, 1985.

SOUZA, G.S. **Desenvolvimento vegetativo, características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de duas espécies de guaco, submetidos a diferentes condições de qualidade de radiação**. 2006. 118 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

## 6. ANEXOS

**ANEXO A:** Resumo da análise de variância para os estudos realizados.

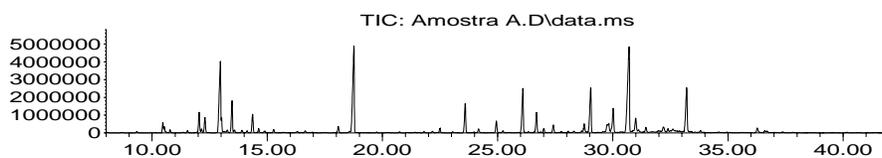
**TABELA 1A.** Resumo da análise de variância para porcentagem de teor do Clevenger graduado (volume) (G) e teor do Clevenger modificado (massa) (M) de óleo essencial de *A. gratissima* por Clevenger graduado e modificado. UFLA, Lavras, MG, 2007.

	GL	QM		
		Volume	Teor (G)	Teor (M)
<b>Tratamento</b>	4	0,92*	0,49*	0,11*
<b>Resíduo</b>	15	0,02	0,00	0,01
<b>CV</b>		18,11	12,16	29,53

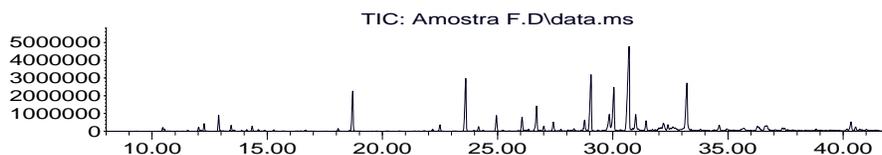
\*Significativo, a 5%, pelo teste F.

**ANEXO B:** Cromatogramas expandidos (8-42 minutos) das amostras de óleo essencial para os tratamentos nos cromatinetes azul (A), inflorescência a pleno sol (F), preto (P), folhas a pleno sol (S) e vermelho (V).

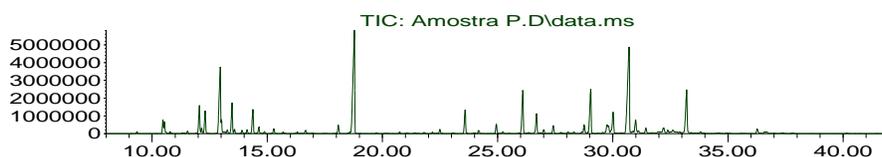
Abundance



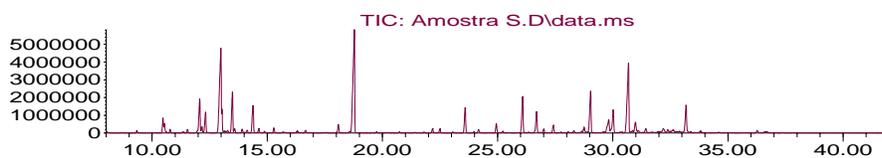
Abundance



Abundance



Abundance



Abundance

