

**ESTUDOS DE CALOGÊNESE IN VITRO E
DOS EFEITOS DO MANEJO FITOTÉCNICO
NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE
ÓLEO ESSENCIAL EM PLANTAS DE
CARQUEJA [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]**

FABIANO GUIMARÃES SILVA

2001

FABIANO GUIMARÃES SILVA

**ESTUDOS DE CALOGÊNESE E DOS EFEITOS DO
MANEJO FITOTÉCNICO NO CRESCIMENTO E NA
PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL EM PLANTAS
DE CARQUEJA [BACCHARIS TRIMERA (Less.) D.C.]**



...ssertação apresentada à Universidade
...ederal de Lavras como parte das
...igências do curso de Mestrado em
...gronomia, área de concentração em
...isiologia Vegetal, para obtenção do grau
...le "Mestre".

Orientador
José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

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

Silva, Fabiano Guimarães

Estudos de calogênese In Vitro e dos efeitos do manejo fitotécnico no crescimento e na produção de óleo essencial em plantas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] / Fabiano Guimarães Silva. -- Lavras : UFLA, 2001.

128 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Planta medicinal. 2. Calogênese. 3. Óleo essencial. 4. Carqueja. 5. *Baccharis trimera*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.88355

-581.634

-583.55

FABIANO GUIMARÃES SILVA

**ESTUDOS DE CALOGÊNESE IN VITRO E DOS
EFEITOS DO MANEJO FITOTÉCNICO NO
CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL EM PLANTAS DE CARQUEJA [*Baccharis
trimeria* (Less.) D.C.]**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do curso
de Mestrado em Agronomia, área
de concentração em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do título de
“Mestre”.

APROVADA em terça-feira, 6 de março de 2001

Prof. Dr. José Donizeti Alves

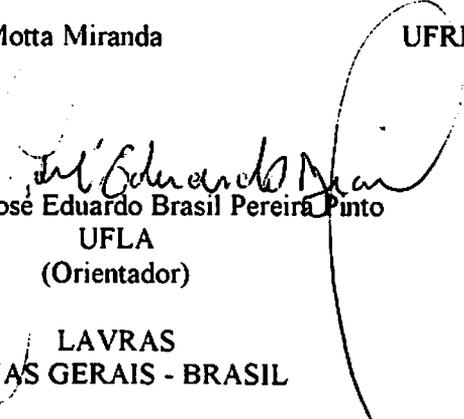
UFLA

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Cardoso

UFLA

Prof. PhD. Ricardo Motta Miranda

UFRRJ


Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA

(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

AGRADECIMENTOS

A Juliana, o meu grande amor, pela paciência, amor, ajuda e companheirismo, os meus sinceros agradecimentos e reconhecimento.

Aos meus pais, Sr. Aldeson e a Sr^a. Prof. Irma, pela minha vida, confiança e incentivo de continuar estudando.

Ao Sr. Moacir e Sr^a. Maria pela grande amizade.

Ao prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, que me recebeu muito bem desde que fui pela primeira vez ao seu laboratório pedir que me orientasse. Pela proteção e ajuda durante o decorrer do curso, pelo diálogo e liberdade durante o planejamento dos experimentos fica o meu reconhecimento e sinceros agradecimentos.

À prof. Maria das Graças Cardoso, pela sua valiosa ajuda nos trabalhos, amizade, companheirismo, exemplo de dedicação ao trabalho e competência.

Ao prof. Ricardo Motta Miranda, do Depto. de Fitotecnia/Inst. de Agronomia/UFRRJ, pela confiança, apoio, exemplo de integridade, humanidade e treinamento durante a iniciação científica, sem a qual dificilmente faria a pós-graduação e nela obteria êxito.

Ao prof. Sérgio Araújo Figueiredo, do Depto. de Ciências Fisiológicas/Inst. de Biologia/UFRRJ, pela amizade, incentivo e orientação durante a graduação e mestrado.

Ao prof. Evaristo Mauro Castro pela valiosa ajuda na parte anatômica.

Ao prof. José Donizeti Alves pelo convívio durante o curso e pela participação na banca.

Ao prof. Nelson Delú Filho, pela participação na pré-banca.

À prof. Ângela Maria Soares, pela atenção durante as dúvidas surgidas no decorrer do trabalho.

Aos estagiários do Lab. Cult. Tecidos e Plantas Medicinais, Daniel José de Souza Mol e Sheyla Paula Divino, pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos servidores técnicos do Laboratório de Cultura de Tecidos Evaldo Arantes de souza, e do Horto de Plantas Medicinais, Sr. Geraldo Luiz da Silva e Sr. Luiz Gonzaga do Carmo, pela grande colaboração e boa vontade na condução dos experimentos.

Aos servidores técnicos da biblioteca, Maria de Lourdes, Carlos e Aparecida, pela ajuda na solicitação de artigos científicos.

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

À UFLA e ao Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade concedida.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1.....	1
1- Introdução.....	1
2- Referencial Teórico.....	2
3 Referências Bibliográficas.....	2
CAPÍTULO 2: Efeito de fitorreguladores e concentração de sais na calogênese de <i>Baccharis trimera</i> Less. D.C.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	37
1 Referencial Teórico.....	39
2 Material e Métodos.....	47
3 Resultados e Discussão.....	51
4 Conclusões.....	68
5 Referências Bibliográficas.....	68
CAPÍTULO 3: Crescimento da planta, rendimento e qualidade de óleo essencial em <i>Baccharis trimera</i> Less. D.C., no campo, com diferentes níveis de irradiância.....	72
Resumo.....	72
Abstract.....	74
1 Referencial Teórico.....	76
2 Material e Métodos.....	82
3 Resultados e Discussão.....	86
4 Conclusões.....	99
5 Referências Bibliográficas.....	100

CAPÍTULO 4: Crescimento da planta e rendimento de óleo essencial em	
<i>Baccharis trimera</i> Less. D.C., em casa-de-vegetação, com adubação orgânica e	
química	103
Resumo	103
Abstract	105
1 Referencial Teórico	106
2 Material e Métodos	112
3 Resultados e Discussão	115
4 Conclusões	126
5 Referências Bibliográficas	126

LISTA DE SÍMBOLOS

2,4 D	ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
2-iP	Isopentenil
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftaleno acético
CCC	Cycocel (cloreto de 2 cloroetil-trimetil-amônio)
Ethephon	Ácido 2 cloroetil-fosfônico
GA3	Ácido giberélico
Picloram	ácido picolínico
TDZ	Tidhiazuron
ABA	Ácido abscísico
MS	Meio básico de Murashige e Skoog (1962)

RESUMO

SILVA, Fabiano Guimarães. Estudos de calogênese in vitro e dos efeitos do manejo fitotécnico no crescimento e na produção de óleo essencial em plantas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.]. LAVRAS: UFLA, 2001. 128p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

Foram conduzidos 4 ensaios: o primeiro, no campo, a fim de avaliar o efeito do nível de irradiância; o segundo, em casa-de-vegetação, a fim de avaliar a influência do nível de adubo orgânico e químico; e o terceiro e quarto com a finalidade de avaliar a influência da concentração de sais, vitaminas e inositol do meio MS e relação auxinas/citocininas na indução de calos. Os ensaios foram realizados no Horto de Plantas Mediciniais, Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais/DAG e Laboratório de Química Orgânica/DQI da Universidade Federal de Lavras. Para avaliar o efeito da intensidade luminosa, as plantas foram cultivadas em quatro níveis de irradiância: 100%, 60%, 50% e 20%, as quais, ao final de 267 dias de cultivo, foram avaliadas através das características de altura, diâmetro do caule (na altura do colo), número de ramos e de nós, biomassa fresca e seca da parte aérea e sistema radicular e teor, conteúdo e qualidade do óleo essencial e características anatômicas. Para avaliar o efeito do adubo orgânico e químico, as plantas foram cultivadas em vasos com doses crescentes a partir de 0%, 5%, 10%, 20% e 30% de esterco de curral, ausência e presença de adubo químico; e ao final de 125 dias de cultivo, foram avaliadas através das características citadas no experimento anterior, acrescentando a relação parte aérea/raiz e excetuando as características anatômicas e qualidade do óleo essencial. Em ambos experimentos foram utilizados seedlings com 94 dias após o plantio das sementes em substrato Plantmax®, em casa-de-vegetação, germinados em bandejas de isopor. No experimento de calogênese, inicialmente foi avaliada a concentração dos sais, vitaminas e inositol do meio de cultura MS, combinada com diferentes níveis das citocininas BAP e KIN e a auxina ANA. Posteriormente, as plantas foram avaliadas em meio MS com 50% da concentração de sais vitaminas e inositol, suplementados em várias concentrações das citocininas KIN e TDZ e as auxinas ANA e 2,4 D. Ao final de 60 e 45 dias no primeiro e segundo experimento respectivamente, foram avaliados através das características de biomassa seca e

* Comitê Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador), Dr^a. Maria das Graças Cardoso - UFLA, MSc. Sérgio Araújo Figueiredo - UFRJ.

fresca e porcentagem da área coberta/calos, explantes viáveis e formação e comprimento das partes aéreas. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que de uma maneira geral as plantas de carqueja responderam positivamente a elevação no nível de irradiância, aumentando a produção de biomassa aérea e radicular, o número de ramos e o conteúdo de óleo essencial, apresentaram tendência de aumento no teor de óleo, reduziram a altura das plantas e comprimento das alas e apresentaram grandes diferenças quanto à organização das células do mesófilo, demonstrando grande plasticidade fenotípica desta espécie. O aumento no nível de matéria orgânica levou a acréscimos na biomassa aérea, número de ramos, altura das plantas, comprimento das alas e conteúdo de óleo essencial. Para a indução e crescimento de calos, os resultados obtidos no primeiro experimento demonstraram que a concentração de sais, vitaminas e inositol do meio MS reduzido pela metade foi mais eficiente para maximizar a produção de calos, sendo necessário o suprimento exógeno de fitorreguladores, em que a combinação de KIN com ANA apresentou efeitos positivos nas características avaliadas. No segundo experimento, foi verificado que as auxinas se mostraram mais eficientes na indução e crescimento de calos do que as citocininas, e entre as auxinas e concentrações avaliadas, ANA (10,0 μM) foi mais eficiente na indução e crescimento de calos friáveis que 2,4 D. Para a formação de parte aérea, TDZ, isoladamente, nas concentrações de 1,25 e 2,50 μM , foram os únicos tratamentos eficientes.

ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Studies of in vitro callusgenesis and the effects of the phytotechnical management on the growth and yield of essential oil on carqueja plants [*Baccharis trimera* (Less) D.C.]. LAVRAS: UFLA, 2001. 128p. (Dissertation - Plant Physiology)*

Four trials were conducted, the first at the level of field in order to evaluate the effect of the level of irradiance and the second in greenhouse to evaluate the influence of the level of manure and fertilizer and the third and fourth with the purpose of evaluating the influence of concentration of salts, vitamins and inositol of the MS medium and ratio auxins/citokinins in callus induction. The trials were performed in the Horto de Plantas medicinais, Laboratorio de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais/DAG and Laboratorio de Quimica Organica/DQI of the Universidade Federal de Lavras. To evaluate the effect of the light intensity, the plants were grown under levels of irradiance: 100%, 60%, 50% and 20% where at the end of 257 days' cultivation were evaluated through the characteristics of height, stem diameter (at the height of the colon), number of branches and knots, fresh and dry biomass of the shoot and root system and content, amount and quality of the essential oil and anatomical characteristics. To evaluate the effect of the fertilizer and manure, the plants were grown in pots with growing doses from 0%, 5%, 10%, 20% and 30% of farmyard manure, absence and presence of fertilizer and at the end of 125 days' cultivation were evaluated through the characteristics quoted in the previous experiment, adding the ratio shoot/root and excepting the anatomical characteristics and quality of essential oil. In both experiments were utilized seedlings of 94 days after planting of the seeds on Plantmax[®] substrate in greenhouse, germinated on plastic foam trays. In the callusgenesis experiment at first the concentration of salts, vitamins and inositol of the MS culture medium, combined with different levels of the cytokinins BAP and KIN and auxin NAA. Afterwards, in MS medium with 50% of the concentration of salts, vitamins and inositol supplemented at several concentrations of the cytokinins KIN and TDZ and auxins NAA and 2,4 D. At the end of 60 and 45 days in the first and second experiment, respectively, were evaluated through the characteristics of dry and fresh biomass and percentage of covered area/calluses, viable explants and

* Guidance Committee: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Dr^a. Maria das Graças Cardoso - UFLA, MSc. Sérgio Araújo Figueiredo - UFRRJ.

formation and length of the shoots. From the results obtained, one may conclude that in general the carqueja plants responded positively to rise in the level of irradiance, increasing the aerial and root biomass yield, number of branches and essential oil content, presented trend of increased oil content and reduced height of the plants and length of the alas and presented great differences as to the organization of mesophyll cells, showing great phenotypic plasticity of this species. Increased level of dry matter led to increases in the shoot biomass, number of branches, plant height, alas length and essential oil content. For induction and growth of calluses, the results obtained in the first experiment showed that the concentration of salts, vitamins and inositol of the MS medium reduced by half was more efficient to maximize callus production, the exogenous supply of plant regulators being necessary where the combination of KIN with NAA presented positive effects in the evaluated characteristics. In the second experiment it was verified that auxins proved to be more efficient in induction and growth of callus than cytokinins and among auxins and concentrations evaluated, NAA (10.0 μM) was more efficient in the induction and growth of friable callus than 2,4 D. For formation of shoot, TDZ singly, at the concentrations of 1.25 and 2.50 μM were the only efficient treatments.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que a utilização de plantas medicinais seja tão antiga quanto a existência do homem. Porém, nas últimas décadas esta tradição esteve um pouco deixada de lado em várias regiões do mundo. No Brasil, as plantas medicinais são utilizadas pelas populações mais antigas e de interior, havendo até um certo preconceito em relação a sua eficácia. Nos últimos anos, tem-se notado um grande interesse por parte dos centros de pesquisas e grandes redes de laboratórios principalmente pelo elevado valor econômico que os princípios ativos dessas plantas têm alcançado no mercado, como o exemplo dos alcalóides vincristina e vimblastina de *Catharanthus roseus*.

Por outro lado, existe a ação dos raizeiros, e até de laboratórios ou farmácias de manipulação que compram plantas, resultando em um enorme extrativismo, o que poderá levar muitas espécies à extinção. Muitas delas podem nem chegar a serem estudadas, causando sérios prejuízos às futuras gerações.

Além do perigo da extinção, plantas de mesma espécie, coletadas em diferentes regiões, altitudes, condições de fertilidade, temperatura, luminosidade, órgãos e idade diferente podem ser medicinais em um local e tóxicas em outro, devido às diferenças no teor de princípios ativos. Por isso, torna-se fundamental o conhecimento da fisiologia da planta, a fim de padronizar e canalizar uma maior produção de metabólitos secundários, pré-requisitos não apenas para viabilizar o cultivo em larga escala para a indústria, mas para uma melhor utilização na medicina popular.

Quando o cultivo tradicional não é viável, a utilização de técnicas biotecnológicas, como grandes biorreatores, é uma opção, mas há necessidade de se dominarem as rotas biossintéticas a fim de elevar a produção e acúmulo de

metabólitos secundários, o que torna esta técnica relativamente cara, mas viável economicamente.

A carqueja é uma das inúmeras plantas medicinais com grande potencial. Vários estudos já demonstraram sua ação curativa, mas não existem estudos envolvendo a influência de fatores ambientais no desenvolvimento e aspectos relacionados a metabólitos secundários. Assim, este trabalho teve como objetivo: avaliar a influência do nível de nutrientes, através do estudo de diferentes concentrações de esterco de curral e presença e ausência de adubação química, em casa-de-vegetação, e diferentes níveis de irradiância, no campo, no desenvolvimento e características do óleo essencial. Objetivou, também, iniciar estudo biotecnológico como alternativa de produção de princípios ativos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Emprego e importância do gênero *Baccharis*

Baccharis (Compositae – Asteraceae) compreende um largo gênero de plantas amplamente distribuído do México até a Argentina, usadas tradicionalmente como uma fonte terapêutica para o tratamento de diversos distúrbios relacionados à saúde do homem (Loayza, et al., 1995; Suttisri, et al., 1993; Jakupovic, et al., 1990).

Vários estudos apontam que o gênero *Baccharis* é potencialmente indicado como fornecedor de óleo essencial na indústria. Apresenta diversas utilidades, dependendo da espécie, sendo usado em perfumaria, uso terapêutico sem efeitos tóxicos, droga anti-reumática, entre outros (Silva e Grotta, 1971; Loayza et al., 1995; Suttisri et al., 1994; Jakupovic, 1990; Queiroga et al., 1996).

Pesquisas realizadas por Armien, Peixoto e Tokamia (1993), demonstram que partes aéreas frescas de *Baccharis megapotamica* var.

megapotamica e var. *weirii*, quando administradas a ovinos, causaram intoxicação, sendo esta última variedade 5 vezes mais tóxica. No entanto, Costa (1995), estudando o efeito de *B. coridifolia*, conhecida como “mio-mio”, observou que quando administrada a equinos na época da floração e frutificação, dependendo da dose, pode causar intoxicação. Esta é considerada uma das plantas tóxicas mais importante na região sul do Brasil, onde causa mortes de bovinos e ovinos e, em menor escala, de equinos e suínos.

Foram verificadas possíveis variações na toxidez de *B. coridifolia* de acordo com a procedência, sexo, as diversas partes da planta e de um ano para outro. Rodrigues et al., (1995), administraram diferentes doses deste vegetal para coelhos, verificando que *B. coridifolia* mostrou-se mais tóxica quando coletada mais para o sul do Brasil. Observaram que a planta feminina foi até 32 vezes mais tóxica que a masculina, e as partes aéreas da planta, folhas, flores e caules finos juntos, apresentaram uma toxidez em torno de 16 vezes maior. Quando comparada com folhas, somente mostrou-se com maior ou menor toxidez de um ano para outro, com diferenças na dose letal de até quatro vezes. Tais variações podem ser explicadas por diferenças no tipo e quantidade de tricotecenos macrocíclicos acumulados nas suas diversas partes, que parecem ser absorvidos do fungo *Myrothecium verrucaria* que os produz. Tais variações não foram observadas quando a espécie *B. coridifolia* foi comparada com *B. megapotamica*.

Posteriormente, trabalhos de Varaschin, Barros e Jarvis (1998), utilizando *B. coridifolia*, verificaram que os níveis de tricotecenos macrocíclicos e seus glicosídeos foram muito maiores nas plantas femininas em floração do que os níveis observados nas plantas que não estavam em floração e nas plantas masculinas em floração. Concluiu-se que os tricotecenos macrocíclicos presentes na planta são responsáveis pelas lesões observadas na toxicose, e que

as plantas femininas em floração são substancialmente mais tóxicas que as plantas masculinas em floração ou aquelas que não estão em floração.

B. trimera é largamente utilizada na medicina popular na forma de infusão devido às suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e digestivas. Desta maneira Pedrazzi et al., (1996) avaliaram possíveis efeitos colaterais tóxicos de carqueja após administração oral em ratos e verificaram que o tratamento não apresentou nenhum efeito colateral pelas características avaliadas, quando comparado com o controle como valor de referência. A análise conjunta dos resultados para o tratamento agudo crônico mostrou que a infusão não causou alterações que pudessem sugerir a presença de dano patológico

Estudos de Avancini e Mundstock (2000), confirmaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do decocto de *B. trimera*, sugerindo a possibilidade de sua utilização como desinfetante e anti-séptico biológico por produto natural em determinadas situações problema em ambientes de produção animal.

Assim como outras plantas, os princípios ativos resultantes do metabolismo de *B. trimera* podem atuar em diversas funções metabólicas tanto na própria planta como para o homem, podendo ser usados direta ou indiretamente, entre outros, como: anti-inflamatórios, tratamento de distúrbios estomacais e desordens renais (Suttisri et al., 1994).

Segundo Gene et al., (1996), *B. trimera* é utilizada no tratamento de reumatismo, desordens hepatobiliares, diabetes, pele, ulceração e ferimentos. O efeito anti-inflamatório, analgésico e o tratamento de úlceras foram avaliados com extratos das partes aéreas de *B. trimera*. Para tal, os autores utilizaram ratos e tais propriedades foram confirmadas.

2.2 Composição do óleo de algumas espécies do gênero *Baccharis*

A carqueja amarga, conhecida também como carqueja do mato, carquejinha, tiririca de balaio (Souza et al., 1991), e cientificamente conhecida como *B. trimera*, como já citado anteriormente, apresenta várias propriedades terapêuticas. Como constituintes químicos principais, têm-se óleo essencial constituído de nonipeno, carquejol, acetato de carquejilo e sesquiterpenos (Santos, Torres e Leonart, 1988; Martins et al., 1995).

Pesquisas de Loayza et al., (1995), utilizando três espécies de gênero *Baccharis*, *B. salicifolia*, *B. latifolia* e *B. dracunculifolia*, identificaram quatro diferentes grupos de produtos: monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e vários sesquiterpenos oxigenados tais como germacrone e ledol.

Trabalhos de Siqueira, Alice e Theisen (1988), com *B. articulata*, verificaram que suas alas apresentam depressões epidérmicas, inserções de pêlos glandulares, de pé curto, unicelular e com duas ou três células sobrepostas e achatadas contendo essência. Como constituintes, foi verificada a presença de compostos flavonoídicos e taninos e testes positivos de cardenolídeos.

Posteriormente, Silva e Grotta (1971), estudando *B. retusa*, revelaram que esta espécie apresenta estômatos do tipo anomocítico e o óleo essencial foi encontrado nos canais secretores próximos das nervuras principal e secundária, a um teor de 0,3%.

Zunino (1998), estudando a composição dos óleos essenciais das espécies *B. articulata*, *B. myrtilloides* e *B. rufenses*, plantas utilizadas na medicina popular e em bebidas amargas na Argentina, verificou que a fração de monoterpenos presentes no óleo essencial destas foi relativamente pobre. Entre monoterpenos hidrocarbonados, *B. rufenses* foi caracterizada pelo conteúdo mais alto de limoneno (14,4%), enquanto, em *B. articulata* e *B. myrtilloides*, os

valores foram menores que 0,8% de limoneno. O teor de monoterpenos oxigenados também apresentou diferenças entre as espécies, sendo 0,7% para *B. articulata* e 1,8% para *B. rufenses*, enquanto, para *B. myrtilloides*, apresentou o mais alto valor (12,4%), identificando-se terpinen-4-ol (8,2%) como constituinte majoritário. Sesquiterpenos oxigenados variaram de 27,1% em *B. myrtilloides* para 47,0% em *B. articulata*. Entre os constituintes oxigenados o teor de *trans*-nerolidol encontrado nas amostras *B. articulata* foi de 15,6%, porém baixo em *B. myrtilloides*, 8,8%. O teor de sesquiterpenos hidrocarbonados variou entre 38,7% (*B. rufenses*) e 50,4% (*B. myrtilloides*). No entanto, *B. articulata* apresentou o mais alto valor de β -cariofileno (16,8%), enquanto, em *B. myrtilloide*, e *B. rufenses*, estes valores foram 4,7% e 4,5%, respectivamente.

Partes aéreas de *B. articulata* e *B. trimera* com flores masculinas apresentaram 0,3% de óleo essencial, enquanto *B. trimera* com flores femininas continham 1%. Neste mesmo estudo, foi verificada, por cromatografia delgada, a presença, tanto no óleo essencial de *B. articulata* como de *B. trimera*, com flores masculinas, o carquejol e acetato de carquejila como substâncias majoritárias. Em proporções bem menores encontram-se as mesmas substâncias no óleo essencial de *B. trimera*, com flores femininas. A análise cromatográfica em fase gasosa de amostras de óleo essencial de *B. articulata* e *B. trimera* evidenciou a sua composição, tendo sido possível determinar a presença de α -pineno, β -pineno, canfeno, carquejol e acetato de carquejila, entre outras estruturas não identificadas. Os dados levantados pela análise cromatográfica em fase gasosa apresentaram alto teor de acetato de carquejila nos óleos essenciais, *B. articulata* (67%) e *B. trimera* (45%), podendo estas espécies serem aproveitados na indústria de óleos essenciais, tendo em vista a alta porcentagem de acetato de carquejila encontrada. Foi verificada maior porcentagem de carquejol no óleo essencial de *B. articulata* (18,5%) do que em *B. trimera* (9%) (Siqueira et al., 1985).

O óleo essencial de algumas espécies de *Baccharis* é obtido em escala industrial no sul do Brasil. O valor comercial desses óleos varia em função dos teores de nerolidol e acetato de carquejila. Seus constituintes principais são o carquejol (9%) e o acetato de carquejila (45%). O carquejol é a substância mais estudada do ponto de vista farmacológico (Souza et al., 1991).

2.3 Aspectos taxonômicos de *Baccharis trimera*.

Segundo Barroso (1973), a espécie *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle apresenta-se como subarbusto glabro, glutinoso, ramificado; as alas dos ramos medem aproximadamente 0,5-1,5 cm de largura; folhas muito reduzidas, ovais; capítulos, geralmente aglomerados, formando espigas interrompidas, que se ordenam em inflorescências paniculiformes, com ramificações simples; involúcro do capítulo feminino com 5-6 mm de altura e 2-3 mm de diâmetro com 3-4 séries de brácteas involucrais glabras, agudas ou acuminadas; flores de 30-40, com corola de 3-4 mm de comprimento, com ápice truncado, envolvendo frouxamente o estilete; aquênio glabro, com mais ou menos 1-1,5 mm de comprimento, 10 estriado; estilete com 4-6 mm de comprimento; involúcro do capítulo masculino com cerca de 4-4,5 mm de altura e 5 mm de diâmetro, com brácteas involucrais ovaladas, glabras; corola de flor masculina com mais ou menos 3,5-4 mm de comprimento, com limbo dividido em lacínios longos, enrolados em espiral.

2.4 Óleos essenciais

Além do metabolismo primário, responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas e outras substâncias que realizam suas principais funções vitais, as plantas apresentam o chamado metabolismo secundário, do qual resultam substâncias de baixo peso molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades e responsáveis por funções nem sempre bem definidas, nem por isso

menos importantes. Entre tais substâncias, destacam-se as voláteis, que difundidas com facilidade a partir da evaporação, constituem um verdadeiro elo de ligação entre a fonte produtora e o meio ambiente. Consideradas por muito tempo mero desvio das funções vitais da planta, elas são fundamentais para a inter-relação dos organismos, contribuindo, assim, de maneira decisiva para a interação co-evolucionária e para o equilíbrio entre os reinos vegetal e animal (Craveiro e Machado, 1986).

A ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como produtos obtidos das partes das plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por pressão dos pericarpos de frutos cítricos. De uma forma geral, são misturas complexas de misturas voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem normalmente líquidas, de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo. Entretanto, a sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo, por isso, também chamados de essências. Eles são também solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas de hidrolatos (Simões e Spitzer, 1999).

Outras de suas características são:

- cor: quando recentemente extraídos, são geralmente incolores a ligeiramente amarelos; são poucos os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil da camomila, de coloração azulada, pelo seu alto teor de azulenos;
- estabilidade: em geral, os óleos voláteis não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais;
- a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas usadas na sua identificação e controle da qualidade (Simões e Spitzer, 1999).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (Simões e Spitzer, 1999).

2.5 Função dos óleos essenciais na planta

Os óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema; exercem papel fundamental na defesa contra microorganismos e predadores e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores (Siani et al., 2000). Acredita-se que os insetos reagem às substâncias voláteis através de um mecanismo de olfato semelhante ao humano, sentindo-se, portanto, atraídos ou repelidos pelos odores produzidos pelas plantas. Sabe-se que dificilmente o aroma é produto de um único componente. Na maior parte das vezes, resulta de uma variedade de substâncias, misturadas em quantidades que raramente excedem dez partes por milhão (10 ppm).

O conhecimento de substâncias voláteis que atuam sobre os órgãos sensoriais dos insetos vem progredindo de maneira bastante acelerada, tornando-se possível desenvolver técnicas de controle de ação destes animais a partir de agentes específicos e não poluentes. Por outro lado, é a adição de substâncias aromatizantes ao farelo e ao leite de soja que torna esses produtos palatáveis, propiciando a incorporação de novas e importantes fontes de proteína vegetal à alimentação humana. Os óleos voláteis da flora brasileira podem ser uma fonte alternativa para o suprimento dessa classe de substâncias (Craveiro e Machado, 1986).

As substâncias aleloquímicas podem atuar como alomônios ou como cairomônios, de acordo com os organismos em interação. O sesquiterpeno gossipol, um metabólito do algodão, é um alomônio que limita a atividade herbívora de várias espécies de lepdópteros; ao mesmo tempo, age como estimulante de apetite no caso do gorgulho (inseto que afeta esta mesma planta), sendo, neste caso, um cairomônio. Há muitos exemplos em que o inseto seleciona a planta hospedeira atraído pelos produtos do metabolismo secundário, que também servem como alomônios. Em outros, a presença de compostos que agem como repelentes faz com que o inseto evite entrar em contato com substâncias tóxicas presentes na planta (Craveiro e Machado, 1986).

2.6 Classificação dos óleos essenciais

As substâncias voláteis não se formam por um único caminho, mas contêm substâncias dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como ácidos graxos (gordura) e seus ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos e cumarinas. Os fenilpropanóides e, especialmente, os terpenóides são os principais constituintes dos óleos essenciais. Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é

constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que estes últimos preponderam. Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo que este termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno (Figura 1). Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (Simões e Spitzer, 1999). Os compostos terpenóides, assim como os demais metabólitos secundários, são originados de rotas alternativas do metabolismo primário, em resposta à adaptação do organismo ao meio em que vive.

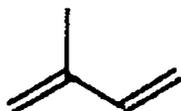


FIGURA 1- Estrutura do isopreno. Adaptado de Simões e Spitzer, (1999).

Biossinteticamente, são derivados do acetato, via ácido mevalônico que, ao sofrer fosforilação e descarboxilação, gera o isopentenilpirofosfato (isopentenil-PP), que se isomeriza a dimetilalipirofosfato (Figura 2). A condensação destes dois isômeros, seguida de posteriores incorporações de unidades de isopentenil-PP, leva à formação de todos os compostos terpenóides. A figura 3 traz de uma maneira bem resumida as rotas biossintéticas e os precursores diretos dos terpenóides (Simões e Spitzer, 1999).

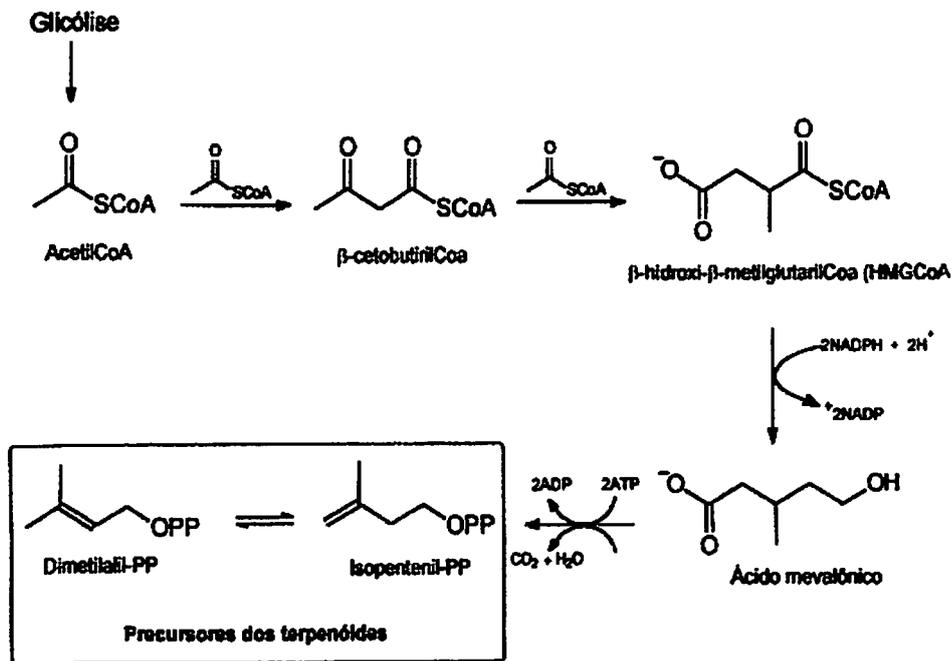


FIGURA 2- Biossíntese de isoprenos. Adaptado de Simões e Spitzer, (1999).

A maior parte dos fenilpropanóides enquadra-se na faixa dos voláteis com ação biológica e pertence à classe dos “arrastáveis com vapor”, isto é, substâncias que possuem baixo peso molecular e podem ser extraídas de plantas pela passagem de vapor e posterior condensação. Encontram-se nesta classe aromatizantes tradicionais, como eugenol, obtido do óleo de cravo, a vanilina, da baunilha, entre outros (Craveiro e Machado, 1986).

A classe mais numerosa e expressiva de compostos voláteis com atividade biológica pertence ao grupo dos isoprenóides (terpenóides), formando a maior subclasse de produtos naturais. São atribuídas aos isoprenóides voláteis as mais diversas atividades, como exemplo canfeno, um importante monoterpene, utilizado como matéria prima para síntese de inseticidas clorados.

Quanto aos monoterpenos oxigenados (álcool e ésteres), já se conhecem bem suas propriedades aromáticas e medicinais; e do 1,8-cineol, que apresenta ação como repelente de insetos, notadamente da barata doméstica. O álcool monoterpênico linalol é muito conhecido e apreciado por causa do aroma da rosa, e também como fonte alomônio que repele um tipo de pulgão (Craveiro e Machado, 1986).

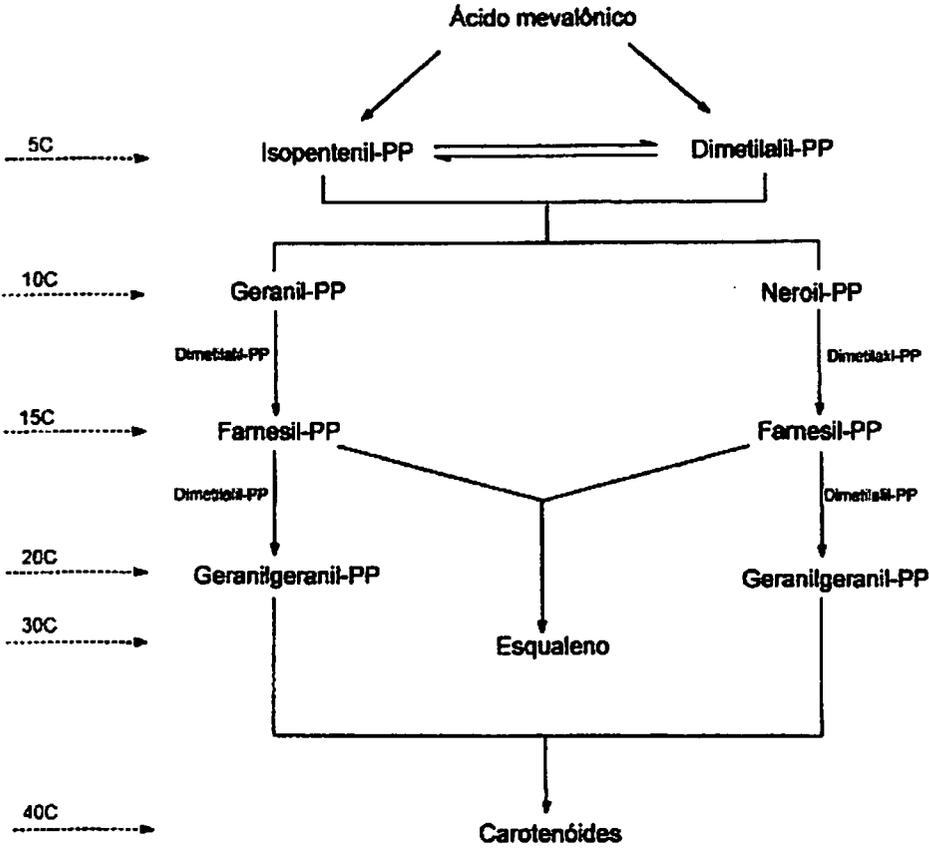


FIGURA 3: Rota biossintética geral dos terpenóides. Adaptado de Simões e Spitzer, (1999).

A classe dos sesquiterpenos compreende substâncias que atuam cada vez mais na comunicação de insetos e plantas. Entre elas, podemos citar o par de izômeros zingibeno e sesquifelandreno, constituintes do óleo do gengibre, devido às suas propriedades organolépticas, de grande significado para a perfumaria. Com relação às lactonas sesquiterpênicas, são substâncias de extrema sensibilidade ao olfato em pequenas variações estruturais (Craveiro e Machado, 1986).

2.7 Utilização

Os óleos essenciais são usados em muitas indústrias para conferir aroma e odor especiais a inúmeros perfumes, cosméticos, sabonetes, desodorantes, condimentos, doces, etc. São empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambiente de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como solventes e como insumos em produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas ou outras. Muitos fornecem compostos de partida para síntese de outras substâncias úteis nas indústrias químicas e farmacêuticas. Outros componentes têm propriedades farmacológicas e são usados como antibacterianos, analgésicos, sedativos, expectorantes, estimulantes e estomáticos na composição de diversos medicamentos (Craveiro, 1981).

2.8 Ocorrência em plantas

Os óleos voláteis são raramente encontrados em gimnospermas (exceção de coníferas). Em angiospermas monocotiledôneas, a ocorrência é relativamente rara, com exceção de gramíneas. No entanto, plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras (Simões e Spitzer, 1999).

Oliveira (1997), trabalhando com *Bidens pilosa*, família Asteraceae, verificou que o teor de óleo foi extremamente alto em comparação ao encontrado na maioria das espécies produtoras de óleo essencial (9,47%). A coleta foi realizada em uma época não chuvosa, o que provavelmente colaborou para a obtenção do alto teor do óleo essencial. Outro ponto, poderia ser explicado pelo fato da extração ser exaustiva, o que, de maneira geral, não é feito pela maioria dos autores.

época
de coleta

Dependendo da família, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como os pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae e Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae), ou em bolsas lisígenas ou esquisolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos voláteis podem estar estocados em certos órgãos, tais como nas flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto e louro), cascas dos caules (canela), madeira (sândalo e pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (curcuma e gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho e erva-doce) ou sementes (nós-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização (Simões e Spitzer, 1999).

2.9 Métodos de obtenção (extração)

Para obtenção destes óleos, vários métodos podem ser empregados: enfloração; arraste por vapor d'água; extração com solventes orgânicos; prensagem; extração por CO₂ supercrítico. A escolha do método dependerá dos objetivos e condições de que se dispõe. Sabe-se que a enfloração é o método utilizado na indústria de perfumes, enquanto o arraste por vapor d'água é o mais simples, mais barato e largamente utilizado pelos pesquisadores (Simões e Spitzer, 1999).

época
de coleta

Charles e Simon, (1990), objetivando avaliar diferentes métodos de extração de óleos essenciais em caules e folhas de três espécies de *Ocimum* (*O. basilicum*, *O. kilimandscharicum* e *O. micranthum*), verificaram que a produção de óleo foi maior por destilação a vapor do que por solventes orgânicos. Embora a concentração relativa dos principais constituintes tenha sido similar nos dois métodos, as quantidades absolutas foram mais altas por destilação a vapor. Não foram observadas diferenças significativas no rendimento do óleo e características relativas de constituintes principais usando amostras secas ou frescas ou usando amostras de 75 ou 10 g de tecido de planta seca.

2.10 Fatores que afetam a produção de biomassa e teor de metabólitos secundários

Além dos fatores nível de irradiância e nutricional, que serão abordados em seus respectivos capítulos, vários outros afetam a produção e composição dos metabólitos secundários. Em uma determinada espécie, a concentração de cada um dos constituintes de seu óleo volátil pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influenciam a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. Nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos voláteis é mais constante (Simões e Spitzer, 1999).

Em plantas medicinais, a produção de metabólitos secundários está sujeita à variação de fatores exógenos e endógenos; portanto, no cultivo de espécies medicinais, deve-se levar em conta fatores genéticos, fisiológicos e ecológicos que influenciam a produção de fármacos (Tetenyi, 1983).

Plantas, ao se desenvolverem em diversos ambientes, apresentam uma enorme flexibilidade de adaptação; no entanto, essa adaptação implica em modificações nas formas anatômicas e morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Nos anos recentes, tem aumentado a atenção ao comportamento bioquímico das plantas e sua adaptação aos diferentes ambientes. A adaptação bioquímica pode envolver o metabolismo primário e secundário. As respostas bioquímicas de plantas para vários fatores ambientais envolve uma ou mais alterações bioquímicas das células das plantas (Harbone, 1997).

Uma planta medicinal pode ser eficiente em um ambiente e ser ineficiente em outras condições. Essa variação pode ocorrer ao longo do seu desenvolvimento, dependendo de inúmeras características, tanto genéticas (indivíduos, populações) quanto ecológicas (pressões de variações no clima, solos, competidores entre outros) e fisiológicas (estádios de desenvolvimento, ritmo estacional, rotas metabólicas alternativas, hormônios e estágio reprodutivo) (Bucher, 1977; Nakagawa et al., 1986; Castro, 1998).

Em menta (*Mentha piperita*), foi claramente demonstrado o efeito significativo da irradiação de luz azul (comprimento de onda de 450 nm) na fotomorfogênese e composição do óleo. Expansão total da folha, índice de área foliar e clorofila total foram encontrados aumentados em menta sob irradiação de luz azul + branca, mas não são acompanhados por incrementos no teor de óleo nem nas taxas fotossintéticas, indicando um efeito geral na produção de óleo. Além do mais, biossíntese de mentol parece ser especialmente afetada por irradiação de luz azul, enquanto biossíntese de mentofurano parece ser incrementada, com conseqüente decréscimo na qualidade e valor comercial do óleo (Maffei e Scannerini, 1999). Foi verificado que a luz azul tem efeito claro na abertura estomática, todavia este efeito não foi acompanhado por aumentos nas taxas fotossintéticas, entretanto, assimilação de CO₂ foi reduzida em irradiação de luz azul + branca, apesar de um maior conteúdo de clorofila total.

Assimilação de CO₂ mais alta na presença de luz branca foi provavelmente devida a uma eficiência fotossintética mais alta e rendimento de quantum mais alto de componentes de luz vermelha e de luz branca e ao desbalanceamento da distribuição de fótons nos dois fotossistemas devido à presença de luz azul.

Com relação ao teor de proteína solúvel, decréscimos significativos foram encontrados em plantas irradiadas com luz azul + branca, enquanto incrementos significativos foram observados nas plantas irradiadas com luz azul no período noturno.

Como encontrado para proteína, clorofila e fenóis, uma redução significativa no conteúdo total de óleo essencial foi observada somente em plantas irradiadas com luz azul + branca. Em especial, o teor de 1,8 cineole, γ -terpineno e α -terpineol foram reduzidos quando plantas foram irradiadas com luz azul + branca, enquanto seu conteúdo aumentou em plantas que foram irradiadas com luz azul no período noturno. Os monoterpenos acíclicos myrceno e (E)- β -ocimene aumentaram somente após irradiação com luz azul no período noturno. Um aumento significativo foi encontrado para α -pino após irradiação com luz azul durante o período noturno e especialmente após irradiação com luz azul + branca, enquanto que β -pino foi significativamente aumentado somente após irradiação com luz azul no período noturno.

O efeito combinado da luz azul + branca afetou claramente a expressão de genes que controlam várias enzimas. A comparação direta de tratamentos de luz azul no período noturno e luz azul + branca, indica que a formação de mentol e mentofurano, é especialmente afetada pela luz azul. Luz azul parece ter efeito particular na ausência de branca (Maffei e Scannerini, 1999).

Para altura, não foram encontradas diferenças significativas entre plantas não irradiadas com luz azul e plantas irradiadas com luz azul no período do dia, ou seja, com luz branca, enquanto decréscimo significativo foi encontrado quando plantas foram irradiadas com luz azul no período noturno. A resposta

para luz azul foi uma inibição significativa da alongação da planta, proporcionada pela irradiação durante o período noturno. Os últimos 3 internós de menta são mais acentuadamente afetados pela inibição de alongação causada pela luz azul (Maffei e Scannerini, 1999).

A radiação UV-A (360 nm) afeta a fotomorfogênese e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita*. Os fenóis totais e clorofila *b* são também afetados por UV-A. Quando UV-A é irradiada durante o dia (UV-A + luz branca), um aumento significativo foi encontrado na área foliar total, índice de área foliar, relação clorofila *a/b*, fenóis total, teor de óleo essencial, menthofurano e menthol. Irradiação UV-A durante o período noturno induz uma aparência de plantas crescidas sob baixos níveis de luz, com alongação do caule, decréscimo na área e índice foliar, proteína e teor de fenol total, óleo essencial e teor de menthol. O aumento no comprimento de internó, redução da expansão foliar dos ramos laterais e formação de folha são consequência da irradiação UV-A encontrado em menta e são respostas clássicas também obtidas com aumento na irradiação com vermelho distante (Maffei et al., 1999).

Em tomilho, foi verificado que plantas sob estresse hídrico tiveram número baixo de glândulas oleíferas, menor teor de cera epicuticular, menor crescimento. O estresse hídrico afetou a composição do óleo essencial, causou menor rendimento de óleo essencial, área foliar e biomassa seca aérea e subterrânea (Letchamo e Gosselin, 1996; Letchamo e Gosselin, 1995; Letchamo et al., 1994).

Outro fator importante na produção de óleo essencial é o fotoperíodo. Em *Origanum syriacum* L., plantas crescidas sob fotoperíodo longo tiveram o teor de óleo essencial nas folhagens e de monoterpenos fenólicos do óleo aumentados, enquanto *p*-cymene diminuíram. Um efeito similar foi observado em dias com 8 horas de luz natural suplementado com mais 8 horas de luz artificial. Quando dias com 16 horas foram compostos de 12 horas de luz

natural, o efeito no teor do óleo e composição foi intensificado. Sob fotoperíodos curtos, aumentos na temperatura ou intensidades de irradiâncias aumentaram o teor relativo de *p*-cymene, enquanto monoterpenos fenólicos e γ -terpineno geralmente diminuíram. Florescimento diminuiu o teor de óleo essencial nas folhas e o teor relativo de monoterpenos fenólicos do óleo essencial. Desde então, as condições ambientais influenciaram no florescimento e tiveram efeitos diretos e indiretos no teor e composição do óleo essencial. A constituição química do óleo se alterou durante o inverno e o florescimento. A variação do teor e composição foi causada principalmente por fatores ambientais e fatores relacionados com o desenvolvimento da planta. Todavia, não ficou claro se os fatores ambientais sobre os óleos essenciais foram diretos ou indiretos, por mudanças na fase de desenvolvimento das plantas do estágio vegetativo para reprodutivo. Realmente, observou-se, nesta planta, que o florescimento afeta o teor e a composição do óleo essencial (Dudai et al., 1992).

Castro (1999) verificou que o incremento do fotoperíodo entre 8 e 20 horas influenciou consideravelmente o crescimento de plantas de confrei, traduzido por um aumento tanto na produção de biomassa total, como particionada, entre os diversos órgãos da planta. Em relação à produção e acúmulo de alantoína, foi verificado que o aumento no fotoperíodo promoveu um aumento no acúmulo de alantoína em raízes e uma diminuição nos seus teores em rizomas.

A maioria das espécies de *Mentha*, expostas a fotoperíodo de 21-3 horas, produziu significativamente concentrações mais elevadas de mentol, comparadas aos tratamentos em curtos fotoperíodos. Temperatura noturna baixa teve um pequeno efeito nos níveis de mentol sob um fotoperíodo de 21 horas. O rendimento total de mentol e mentona nas espécies de *Mentha* foi significativamente maior do terceiro para o quinto par de folhas, comparado com

o par de folha da posição mais alta. Observou-se, também, que regimes de luz e temperatura podem influenciar a biossíntese de óleo essencial (Fahlém, Welander e Wennersten, 1997).

Em *Lippia alba*, estudos demonstraram que maiores rendimentos de óleos essenciais foram encontrados nas folhas senescentes, localizadas na parte basal do caule, enquanto folhas mais novas obtiveram mais de 50% do óleo essencial. Estudos anatômicos revelaram que o óleo essencial está presente nas células parenquimáticas do mesofilo e nos tricomas glandulares, capitatos e peltatos (Castro et al., 2000).

A biossíntese e o acúmulo de metabólitos secundários dependem, em muitos casos, do estágio de desenvolvimento da planta. Por exemplo, o acúmulo de alcalóides em várias espécies de solanáceas e antocianina em cultura de *Daucus carota* ocorrem quando a planta encontra-se na fase estacionária de crescimento (Noe et al., 1980; Lindsey, 1983).

Para funcho (*Foeniculum vulgare*), o estágio de maturação (sementes verdes e maduras) não apresentou diferenças no teor de óleo essencial na base seca entre as sementes secas e maduras (Figueiredo e Stefanini, 2000).

Foi estudada também, em davana, a possibilidade de obter mais de uma colheita. Foi verificado que isto seria possível sem a adição de fertilizantes adicionais, o que reduziria muito o custo de produção. Constatou-se que para a segunda colheita, apesar de maior produção de biomassa, o rendimento de óleo foi reduzido, o que foi atribuído ao menor número de flores, órgãos nos quais se encontra o maior teor de óleo em davana. Na cultura, principal a relação flores/folha foi maior, o que não aconteceu na segunda colheita, reduzindo o rendimento de óleo essencial (Rao et al., 1997).

Um estudo sobre 3 linhagens de menta (*Mentha piperita*), de um período de cultivo de 2 anos, revelou diferenças na quantidade e composição do óleo. De um ano para outro, a produção de óleo, a porcentagem de limoneno, terpineno-4-

ol e pulegone aumentaram, enquanto o mentol e o neo mentol decresceram. Houve também diferenças entre as linhagens avaliadas, mostrando que o efeito do ambiente e genótipos influenciam a síntese de monoterpenos em menta (Maffei, 1999).

O uso de reguladores vegetais, quando empregados em manejo, pode modificar o comportamento de uma planta, podendo alterar não só a produtividade da planta, como seu metabolismo secundário; com isso, obtém-se um aumento do teor de óleo essencial (Stefanini, Rodrigues e Ming, 1998).

Objetivando aumentar o teor de óleo essencial em capim-limão (*Cymbopogon citratus*), foram realizadas aplicações de giberelina, ethrel, CCC, Alar e Accel, que não apresentaram diferenças significativas no teor de óleo essencial. Os decréscimos coincidiram com o déficit hídrico, sendo que este, por longos períodos altera a fisiologia da planta, promovendo modificações no metabolismo secundário, que poderão resultar numa maior ou menor produção de substâncias, dependendo da espécie vegetal (Figueiredo, Delachiave e Ming, 2000).

Em *Lippia alba*, o rendimento de óleo essencial variou nas diferentes estações, sendo melhor no verão com o uso de GA₃ (50 ppm). A segunda melhor estação foi o inverno, com os melhores resultados CCC (2000 mg.L⁻¹) e (GA₃ 100 mg.L⁻¹). Na primavera, obteve-se a mais alta taxa de biomassa, com GA₃ (100 mg.L⁻¹). No verão, aplicações de GA₃ (50 mg.L⁻¹), mostraram melhores resultados que CCC (1000 mg.L⁻¹). Concluiu-se que ainda não é viável a aplicação destes reguladores de crescimento devido à relação custo/benefício (Stefanini, Rodrigues e Ming, 1998).

O aumento no teor de óleo pode ser favorecido com a secagem, comparado à extração de material fresco, ou com a elevação da temperatura de secagem, encontrando respostas positivas de 40 °C até 60 °C para capim-limão, devido ao fato de as células armazenadoras de óleos essenciais nesta planta

estarem em tecidos mais internos e possuírem paredes lignificadas. Portanto, o aumento da temperatura favorece a extração do óleo, quando comparado com o produto fresco, mas a concentração de citral decresceu com o aumento da temperatura de secagem de 40 °C até 60 °C (Martins et al., 2000).

A temperatura de secagem também influencia o teor de óleos essenciais. Em alecrim (*Rosmarinus officinalis*), temperaturas de 60 °C e 80 °C causaram perdas de 24% e 49% nas secagens, comparadas com a temperatura de 40 °C, que foi atribuída a danos que maiores temperaturas proporcionam a estruturas secretoras ou armazenadoras de óleos essenciais. Quanto a composição química, foi observado que não ocorreram diferenças entre as temperaturas de 40 °C e 60 °C, e sim entre 40 °C e 80 °C (Blanco et al., 2000). É importante o conhecimento das estruturas que armazenam óleo essenciais, pois nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície, o teor e qualidade dos óleos voláteis são menos constantes.

2.11 Aspectos biotecnológicos da produção de princípios ativos

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos atualmente é amplamente difundida, destacando-se a micropropagação, a limpeza clonal, determinação de rotas metabólicas, isolamento e cultivo de protoplastos e hibridação somática (Austin et al., 1985; Radke, Grun e Ewang, 1987; Hirasuna et al., 1991; Facchini e Dicosmo, 1991; Bokem, Wray e Strack, 1991). Algumas dessas técnicas têm possibilitado estudos fisiológicos muito importantes na área de produção de metabólitos secundários, destacando-se o uso de suspensões celulares (Godoy-Hernandez e Loyola-Vargas, 1997; Couillerot et al., 1994; Hagendoorn et al., 1994).

Um considerável esforço tem sido feito no intuito de produzir produtos fitoterápicos a partir de plantas com substâncias ativas que tenham sido acumuladas em cultura de células ou tecidos da planta. No entanto, são raros os

processos economicamente viáveis devido à necessidade de otimização dos compostos ativos que dependem, em última instância, do entendimento dos mecanismos genéticos, fisiológicos e morfológicos de controle da biogênese e acúmulos dos compostos bioativos (França, 1999). Além de melhoramento de linhagem, métodos de seleção de linhagens de alta produção e otimização do meio podem levar a um incremento na produção de princípios ativos. Porém, o principal problema encontrado na produção de princípios ativos usando técnicas biotecnológicas é a falta de conhecimento básico das rotas biossintéticas e dos mecanismos responsáveis pela produção dos princípios ativos, ficando a produtividade dos princípios ativos limitada pela falta de precursores específicos (Dornenburg e Knorr, 1995).

Considerando a variabilidade de biossíntese e acúmulo de determinados princípios ativos quando a planta interage com o meio, somados à utilização da flora medicinal pela indústria farmacêutica, tomam-se fundamentais o estudo e o estabelecimento de protocolos de cultivos que permitam uma maximização de produção de metabólitos secundários, bem como o aumento da utilização das plantas medicinais.

O crescimento contínuo de culturas de tecidos organizados resulta em um sistema biológico bastante eficiente para a produção de metabólitos secundários, que são sintetizados nos diversos órgãos da planta intacta. Entretanto, as chances das culturas de órgãos serem usadas industrialmente são reduzidas, devido ao crescimento lento e à relativa dificuldade de manipulação. Por outro lado, o metabolismo secundário ocorre em células e tecidos específicos e em determinados estádios de desenvolvimento das plantas superiores, mostrando que a expressão destes metabólitos está intimamente correlacionada com o crescimento e diferenciação celular, por isso, algumas substâncias não são sintetizadas em culturas com certo grau de diferenciação, como suspensão celular e calogênese.

A transformação genética de células de plantas usando como vetor *Agrobacterium rhizogenes* resulta na indução de raízes que possuem inúmeras ramificações laterais (meristemas apicais radiculares múltiplos) e crescem muito rapidamente, as chamadas “hairy roots”. Devido à transferência de Ti-DNA da bactéria para a planta, as “raízes cabeludas” são autotróficas em relação a produção de auxinas, ou seja, elas se desenvolvem sem a necessidade de suplementação exógena de auxinas (França, 1999). Portanto, esta técnica é muito interessante por causa de sua produção contínua de metabólitos secundários iniciada pela indução do órgão (Dornenburg e Knorr, 1995). Outra vantagem seria a menor possibilidade de variação somaclonal devido à ausência de suprimento exógeno de fitorreguladores e à atividade organogenética relativamente simples, quando comparada ao grande número de órgãos formado nos caules (gemas, folhas, frutos e inclusive raízes) (Peres e Kerbauy, 2000). A variação somaclonal pode ser reduzida também quando comparada à cultura de calos e suspensão celular por ser um órgão diferenciado.

Algumas plantas são hábeis em produzir substancial quantidade de metabólitos secundários. Entretanto, a produção desses compostos em cultura de tecidos e células de plantas é geralmente baixa. Inúmeras metodologias têm sido descritas com objetivo de aumento de produção; estas, às vezes, estimulam uma resposta defensiva da célula (Hangendon et al., 1994).

Existem diversos efeitos estimulativos na produção de metabólitos secundários, citados em vários trabalhos, como, por exemplo, a adição de sulfato de cobre, que estimulou a produção de beberina em células de *Thalietrum rugosum* (Kim, Pedersen e Chin, 1991). Há outras substâncias eliciadoras, como radiação UV, ou elicitores bióticos, que incluem paredes de células vegetais (pectina ou celulase), de microorganismos (chitina, quitosana ou glucanos), glicoproteínas e ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Dornenburg e Knorr, 1995; Maraschin e Verpoorte, 1999).

Em cultura de suspensões celulares, reguladores de crescimento de plantas afetam a produção de metabólitos secundários, bem como o crescimento. Diferentes tipos de reguladores de crescimento, como auxina, citocinina, giberelina e ácido abscísico, são conhecidos devido aos seus diferentes efeitos sobre o crescimento e o metabolismo secundário. Vários efeitos de auxinas sobre o metabolismo secundário têm sido relatados; em muitos casos, auxinas sintéticas, especialmente o 2,4-D, inibiram a síntese de nicotina na cultura de *Nicotiana tabacum* (Furuya et al., 1971; Tabata et al., 1971).

As citocininas têm diferentes efeitos dependendo do tipo de metabólito e da espécie com a qual se esteja trabalhando. Por exemplo, a cinetina estimulou, em cultura de calos de *Stizolobium hassjoo*, o acúmulo de L-dopa, ocorrendo o mesmo estímulo para a produção de berberine em suspensão de *Thalictrum minus* (Obata-Sasamoto e Komamine, 1983).

A cultura de células em suspensão tem sido amplamente utilizada em trabalhos de pesquisa, envolvendo diversas áreas, como engenharia genética, fisiologia, bioquímica, entre outras. Este tipo de técnica apresenta como fatores positivos a homogeneidade e a superior taxa de crescimento. Altas taxas, moderadas ou baixas de incrementos populacionais poderão ser obtidas numa suspensão em meio nutritivo adequado. Todavia, vale a pena ressaltar que a composição do meio pode afetar o padrão de diferenciação celular (Bassetti e Tramper, 1995; Choi et al, 1995).

Diante do exposto acima, quando o objetivo for a produção de princípios ativos *in vitro*, a cultura de calos é uma das ferramentas mais promissoras, assim como a cultura de suspensão celular. Mesmo esta última é fundamental para o seu estabelecimento, definição de um protocolo eficiente na produção de calos, pois é através desta, que se inicia a suspensão celular.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMIÉM, A.G.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental por *Baccharis megapotamica* var. *megapotamica* e var. *weirii* (Compositae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.13, n.1/2, p.5-20, jan./jun. 1993.
- AUSTIN, S.; BAER, M.; EHLENFELD, M.; KAZMIERCZAK, P.J.; HELGESON, J.P. Intra-specific fusions in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.71, p.112-175, 1985.
- AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D. C.; Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.3, p.230-234, jun. 2000.
- BARROSO, G. M. **Compositae – Subtribo BACCHARIDINEAE Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. Tese de doutorado em ciências.** São Paulo: UNICAMP, 1973. (Tese – Doutorado em Ciências).
- BASSET, L.; TRAMPER, J. Use of non-conventional media in *Morinda citrifolia* cell culture. **Plant Cell**, Rockville, v. 43, n.2, p.93-95, 1995.
- BLANCO, M.C.S.G.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.; BOVI, O.A. Influencia da temperatura de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de alecrim. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.903-904, 2000. Suplemento.
- BOKERN, M.; WRAY, V.; STRACK, D. Accumulation of phenolic acid conjugates and betacyanins, and change in the activities involved in feruloylglucose. **Planta**, Berlin. v.184, n.2, p.261-270, 1991.
- BURKEY, K.O.; WELLS, R. Responses of soybean photosynthesis and chloroplast membrane function to canopy development and mutual shading. **Plant Physiology**, Rockville, v.28, n.3, p.355-377, July 1977.

- CASTRO, D.M.; MARQUES, M.O.M.; MING, L.C.; TANAKA, F.A.D.; MACHADO, S.R. Caracterização anatômica e composição química dos óleos essenciais de folhas de erva-cidreira em diferentes regiões do eixo caulinar. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.918-919, 2000. suplemento
- CASTRO, H.G. Caracterização isoenzimática, crescimento e rendimento de tanino em seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.). Viçosa – MG: UFV, 1998. 167p. (Tese -Doutorado em Fitotecnia)
- CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.3, p.458-462, May 1990.
- CHOI, H.J.; TAO, B.Y.; OKOS, M.R. Enhancement of secondary metabolite production by immobilized *Gossypium arboreum* cell. **Biotechnology Progress**, Washington, v.13, n.3, p.306-311, 1995.
- COSTA, E.R.; COSTA, J.N.; ARMIÊM, A.G.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.19-26, jan./jun. 1995.
- COUILLEROT, E.; CARON, C.; COMOE, L.; AUDRAN, J.; MOLINATTI, P.; ZECHES, M. MENOLIVIER, L.L.; JARDILIER, J.; CHENIEUX, J. Benzophenanthridine and furoquinone accumulation in cell suspension culture of *Fagara Zanthoxyloides*. **Phytochemistry**, Oxford, v.37, n.2, p.425-428, Sept. 1994.
- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; et. al. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: Editora UFC, 1981. 210p.
- CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.4, n.26, p.54-63, mar./abr. 1986.
- DORNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, Washington, v.17, p.674-684, 1995.

- DUDAI, N.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; PALEVITCH, D.; HALEVY, A.H. Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected by environmental conditions and flowering. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.84, n.3, p.453-459, Mar. 1992.
- FACCHINI, P.J.; DICOSMO, F. Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don immobilized by adhesion to glass fibers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.35, n.3, p.382-392, Mar. 1991.
- 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 and Food Agriculture*, London, v.73, p.111-119, 1997.
- FIGUEIREDO, R.O.; DELACHIAVE, M.E.A.; MING, L.C. Ação de reguladores vegetais no teor de citral em capim-limão em diferentes épocas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.18, p.920-921, 2000. suplemento.
- FIGUEIREDO, R.O.; MING, L.C.; STEFANINI, M.B. Teor de óleo essencial em sementes de funcho em dois estádios de maturação. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.18, p.922-923, 2000. Suplemento.
- FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; et al. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121.
- FURUYA, T.; KOJIMA, H.; SYONO, K. Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissue. *Phytochemistry*, Oxford, v.10, p.1529-1532, 1971.
- GENE, R.M.; CARTAÑA, C.; ADZET, T.; MARÍN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of active constituents. *Planta Medica*, Stuttgart, v.62, p.232-235, 1996.
- GODOY-HERNADEZ, G.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Effect of acetylsalicylic on secondary metabolism, of *Catharanthus roseus* tumor

- suspension cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, n.5, p.287-290, Feb. 1997.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Micropropagação. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1, 864p. 1998.
- HAGENDOON, M.J.M.; WAGNER, A.K.; SEGERS, G.; VAN DER PLAS, L.H.W.; OOSTDAM, A.; WALRAVEN, H.S.V. Citoplasmic acidification and secondary metabolite production in diferent plant cell suspension. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, n.2, p.723-730, Oct. 1994.
- HARBONE, J.B. Biochemical plant ecology. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. (eds). **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. p.487-516.
- HIRASUNA, P.J.; SHULER, M.L.; LACKEY, V.K.; SPANSWICK, R.M. Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures. **Plant Science**, Shannon, v.78, n.1, p.107-120, 1991.
- JAKUPOVIC, J.; SCHUSTER, A.; GANZER, U.; BOHLMANN, F.; BOLDT, P.E. Sequi- and diterpenes from *Baccharis* species. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, n.7, p.2217-2222, July 1990.
- KIM, D.I.; PEDERSEN, H.; CHIN, C.K. Stimulation of berberine production in *thalictrum rugosum* suspension cultures in response to addition of cupric sulfate. **Biotechnology Letters**, Kew, v.13, n.3, p.213-216, 1991.
- LETCHAMO, W.; GOSSELIN, A. Effects of supplemental lighting and soil water levels on growth, essential oil contend and composition of two thyme (*Thymus vulgaris* L) clonal selections. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.75, n.1, p.231-238, Jan. 1995.
- LETCHAMO, W.; GOSSELIN, A. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v.71, n.1, p.123-134, 1996.

- LETCAMO, W.; MARQUARD, R.; HOLZL, J.; GOSSELIN, A. Effects of supply and light intensity on growth and essential oil of two *Thymus vulgaris* selections. *Angewandte Botanik*, Berlin, v.68, p.83-88, 1994.
- LINDSEY, K; YOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkali acculation in cell culture. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.34, n.145, p.1055-1065, Aug. 1983.
- LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F. I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, Oxford, v.38, n.2, p.381-389, Feb. 1995.
- MAFFEI, M.; CANOVA, D.; BERTEA, C.M.; SCANNERINI, S. UV-A effects on photomorphogenesis and essential-oil composition in *Mentha piperita*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Lausanne, v.52, p.105-110, 1999.
- MAFFEI, M.; SCANNERINI, S. Photomorphogenic and chemical responses to blue light in *Mentha piperita*. *Journal Essential Oil Research*, Wheaton, v.11, p.730-738, 1999.
- MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. *Biotecnologia Ciência & desenvolvimento*, Uberlandia, v.2, n.10, p.x-y, set./out. 1999.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV, 1995. 220p.
- MARTINS, P.M.; MELO, E.C.; CORRÊA, P.C.; BARBOSA, L.C.A.; SANTOS, R.H.S. Influência da temperatura e velocidade do ar na secagem, teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.18, p.911-912, 2000. Suplemento.
- NAKAGAWA, K.; KONAGAI, A.; FUKUI, H.; TABATA, M. Release and crystalization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. *Plant cell Reports*, Berlin, v.3, p.254-257, 1986.

- NOE, W.; LANGEBARTELLS, C.; SEITZ, H.U. Antocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. *Planta*, Berlin, v.149, n.3, p.283-287, Aug. 1980.
- OBATA-SASAMOTO, H.; KOMAMINE, A. Effect of culture conditions on dopa accumulation in callus culture of *Stizolobium hassjoo*. *Planta Medica*, Stuttgart, v.49, p.120-123, 1983.
- OLIVEIRA, J. Z. Variabilidade isozimática e do teor de óleo essencial em acessos de *Bidens pilosa* L. Viçosa – MG: UFV, 1997. 72p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)
- PEDRAZZI, A.H.P.; RODRIGUES, E.R.; ZANARDO-FILHO, A. FRANCO, J.J. Hematological evaluation of “carqueja” (*Baccharis trimera*) infusion. *Fitoterapia*, Milan, v.68, n.1, p.26-29, Jan./Feb. 1997.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. In: *Universa*. Brasília: Editora Universa, v. 8, n. 1, p. 181-195, 2000.
- QUEIROGA, M.L.; FERRACINE, V.; MARSAIOLI, A.J. Three new oxygenated cadinanes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, Oxford, v.42, n.4, p.1097-1103, Abr. 1996.
- RADKE, S.; GRUN, P.; WANG, M. Regeneration of plants from potato protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin: Springer-Verlag, 1987. p.194-222.
- RAO, E.V.S.; NARAYANA, M.R.; RAO, B.R.R. The effect of nitrogen and farm manure on yield nutrient uptake in davana (*Artemisia pallens* Wall. Ex D.C.). *Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants*, Birmingham, v.5, n.2, p.39-48, 1997.
- RODRIGUES, R.L.; TOKARNIA, C.H. Fatores que influenciam a toxidez de *Baccharis coridifolia* (Compositae): um estudo experimental em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.15, n.2/3, p.51-69, abr./set. 1995.

- SANTOS, C.A.M.; TORRES, K.R.; LEONART, R. **Plantas medicinais (Herbarium, flora et scientia)** São Paulo: Icone, 1988. 179p.
- SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F. S. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v.3, n.16, p.38-43, set./out. 2000.
- SILVA, J.B.; GROTTA, A.S. Anatomia e óleo essencial de *Baccharis retusa* D.C. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.9, n.2, p.321-326, 1971.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. (orgs). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121.
- SIQUEIRA, N.C.S.; ALICE, C.B.; THIESEN, F. V. Aspestos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* Lam. (PERS.), Compositae. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v.4, n.1/2, p.63-76, 1988.
- SIQUEIRA N.C.S.; SILVA, G.A.A.B.; ALICE C.B.; NITSCHKE M. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. e *Baccharis trimera* (Less.) DC (Compositae), espécies espontâneas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.36-39, 1985.
- SOUZA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.C.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC, 1991. 416p.
- STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Efeito do ácido giberélico, CCC e ethephon no conteúdo de biomassa e rendimento de óleo essencial em diferentes épocas de aplicação em *Lippia alba* (MILL.) N.E.Br.-Verbenaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.1, n.1, p.39-48, jan./jun. 1998.
- SUTTISRI, R.; KINGHORN, A.D.; WRIGHT, A.D.; STICHER, O. Neoclerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. **Phytochemistry**, Oxford, v.35, n.2, p.443-446, Feb. 1994.



TABATA, M.; MIZYKAMI, H.; HIRAOKA, N.; KONOSHIMA, M. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, Oxford, v.13, Oxford, p.927-932, 1974.

TETENYI, P. Biological preconditions for cultivation and procescinal of medicinal plants. In: WIJESEKERA, R.O.B. **The medicinal plant industry**. Boca Raton: CRC Press, 1991. Cap.3, p.33-41.

VARASCHIN, M.S.; BARROS, C.S.L.; JARVIS, B.B. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.69-75, abr./jun. 1998.

ZARRABEITIA, A.; LEJARCEGUI, X.; VERAMENDI, J.; MINGO-CASTEL, A.M. Influence of nitrogen supply on micropropagation and subsequent microtuberization of four potato cultivars. *American Potato Journal*, Orono, v.74, n.6, p.369-378, Nov./Dec. 1997.

ZUNINO, M.P.; NEWTON, M.N.; MAESTRI, D.M.; ZYGADLO, J.A. Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Medica*, Stuttgart, v.64, n.1, p.86-87, 1998.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE FITORREGULADORES E CONCENTRAÇÃO DE SAIS NA CALOGÊNESE DE [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.]

RESUMO

SILVA, Fabiano Guimarães. Concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.]. LAVRAS: UFLA, 2001. 128p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de sais MS, vitaminas e inositol, e a relação auxinas/citocininas na indução e crescimento de calos, visando futuros estudos de produção de princípios ativos de carqueja a partir de calos e suspensão celular, foi realizado experimento no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais/DAG, utilizando-se como explantes ápices caulinares. Os explantes foram inoculados, no primeiro experimento, em meio MS e MS com 50% da concentração de sais, vitaminas e inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e pH 5,7, suplementado com diferentes balanços de fitorreguladores, incluindo duas citocininas (BAP e KIN) e a auxina ANA, todos nas concentrações de 0; 2,5 e 10,0 µM, totalizando 15 balanços de fitorreguladores. No segundo experimento, foram avaliadas duas citocininas (KIN e TDZ), nas concentrações de 0; 1,25 e 2,50 µM e duas auxinas (ANA e 2,4 D), nas concentrações de 0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM, totalizando 35 balanços de fitorreguladores, em meio MS com 50% da concentração de sais, vitaminas e

* Comitê Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Dr^a. Maria das Graças Cardoso - UFLA, MSc. Sérgio Araújo Figueiredo - UFRRJ.

inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e pH 5,7. Em ambos os experimentos, foram utilizados 10 mL de meio de cultura por tubo, os quais, após a inoculação, foram incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 15 $\mu\text{Mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 °C. No primeiro experimento, após 60 dias de cultivo, foi verificado, através das características de biomassa fresca e seca, porcentagem da área coberta de calo/explante e calo viável/explante, que a sobrevivência do explante e ocorrência de qualquer manifestação de crescimento e/ou desenvolvimento dependem do suprimento exógeno de fitorreguladores. Dentre os fitorreguladores, isoladamente, apenas ANA apresentou produção de calos satisfatória, e entre as citocininas, KIN foi mais eficiente que o BAP. O meio de cultura com 50% da concentração de sais MS, vitaminas e inositol mostrou-se mais eficiente na indução e crescimento de calos. No segundo experimento, ao final de 45 dias de cultivo, verificou-se, através das características de Biomassa fresca, porcentagem da área coberta de calo/explante e calo viável/explante, porcentagem de explantes viáveis e formação e comprimento de parte aérea, que as auxinas mostraram-se mais eficiente na indução e crescimento de calos que as citocininas, e entre as auxinas e concentrações estudadas, ANA (10 μM) foi mais eficiente na indução e crescimento de calos friáveis que 2,4 D. Para a formação de parte aérea, TDZ, isoladamente, nas concentrações de 1,25 e 2,50 μM , foram os únicos tratamentos eficientes. Entretanto para esse objetivo, novos estudos ainda precisam ser realizados para otimização da propagação in vitro.

ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Concentration of salts and growth regulators in the induction of callus of carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.]. LAVRAS: UFLA, 2001. 128p. (Dissertation - Plant Physiology)*

With the purpose of evaluating the influence of the concentration of MS salts, vitamins and inositol and auxin/cytokinins ratio in the induction and growth of callus, aiming at future studies of production of the active principles of carqueja from callus and cell suspension, an experiment was conducted in the Tissue Culture and medicinal Plant laboratory utilizing as explants the stem. The explants were inoculated in the first experiment in MS medium and MS with 50% of concentration of salts, vitamins and inositol, 30gL⁻¹ of sucrose, 6 g L⁻¹ of agar and pH 5.7, supplemented with different balances of plant regulators, including two cytokinins (BAP and KIN) and auxin NAA, all at the concentrations of 0; 2.5 and 10.0 µM, amounting to 15 balances of growth regulators. In the second experiment, two cytokinins (KIN and TDZ) at the concentrations of 0, 1.25 and 2.50 µM and two auxins (NAA and 2.4 D) at the concentrations of 0;5.0; 10.0 and 15.0 µM, amounting to 35 balances of growth regulators in MS medium with 50% of the concentration of salts, vitamins and inositol, 30gL⁻¹ of sucrose, 6gL⁻¹ and pH5.7 were evaluated. In both experiments, 10 ml of culture medium per tube which after inoculation were incubated in growth room with 16-hour photoperiod, light intensity of 15 µMol. m⁻².s⁻¹ and temperature of 25 °C. In the first experiment, after 60 days' cultivation were verified through the characteristics of fresh and dry biomass, percentage of area covered with callus/explant and viable callus/ explant which for the explant survival and occurrence of any manifestation of growth and/or development, the exogenous supply of plant regulators is necessary. NAA presented satisfactory production of callus, and among citokins, KIN was more efficient than BAP. The culture medium with 50% of the concentration of MS salts, vitamins and inositol proved to be more efficient in callus induction and growth. In the second experiment at the end of 45 days' cultivation were verified through the characteristics of fresh biomass, percentage of area covered with callus/explant and viable callus/explant, percentage of viable explants and formation and length of shoot, which auxins proved to be more efficient in the

* Guidance Committee: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Dr^a. Maria das Graças Cardoso - UFLA, MSc. Sérgio Araújo Figueiredo - UFRRJ.

induction and growth of callus than cytokinins and among auxins and concentrations studied, NAA (10 μM) was the most efficient in the induction and growth of friable callus than 2,4 D. For the formation of the shoot, TDZ alone, at the concentrations of 1.25 and 2.50 μM were the only efficient treatments but for this objective new studies still been need to be performed for optimizing in vitro propagation.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Calogênese é uma cultura de massa celular, com crescimento desordenado e certo grau de diferenciação (Torres et al., 2000), em resposta a uma injúria química, como concentração de sais e fitorreguladores, ou injúria física, como ferimentos nos tecidos.

Estudando o efeito de dois tricotecenos macrocíclicos (baccharinoide B4 e roridina E) e 2,4 D, na indução do crescimento de calo em 4 espécies de *Baccharis* (*B. coridifolia* e *B. megapotamica*, *B. halimifolia* e *B. neglecta*), Kuti e Jarvis (1992) verificaram que a roridina E não teve efeito na indução de calo de *B. coridifolia*, uma planta produtora de roridina E, porém induziu calo em plantas não produtoras de roridina E (*B. megapotamica*, *B. halimifolia* e *B. neglecta*). Produção ótima de calo foi obtida para *B. coridifolia* em meio contendo apenas $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4 D; para *B. halimifolia* em meio contendo $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4 D e 10^{-8} M de roridina E; para *B. megapotamica* em meio contendo $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4 D e 10^{-6} M de roridina E e para *B. neglecta* em meio contendo $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e 10^{-8} M de roridina E. Tecidos de calos formado em todos tratamentos foram de cor clara e altamente friáveis.

Em *Ambrosia tenuifolia* (Asteraceae), não ocorreram proliferação do tecido foliar na ausência de suprimento exógeno de fitorreguladores. Os resultados mostraram que só foi possível manter a proliferação celular e proliferação de calo com a adição de 2,4 D entre 0,1 e $1 \text{ }\mu\text{M}$ ao meio de cultura doses maiores foram menos eficientes na indução de calos em cultura de tecidos. BAP aumentou grandemente a proliferação do tecido em todas as concentrações testadas até $10 \text{ }\mu\text{M}$, porém somente quando foi usada junto com 2,4 D, o que conduziu a uma maior produção de calo do que os obtidos com somente auxinas. A presença do fitorregulador ABA a uma concentração de 100 a $200 \text{ }\mu\text{M}$ aumentou a proliferação do tecido. O efeito foi mais pronunciado quando foram

combinados 100 μM de ABA com 1 μM de 2,4 D, originando calo com elevada biomassa seca (Goleniowski, Silva e Trippi, 1992).

Em *Tagetes erecta*, (Asteraceae), foi observado desenvolvimento de calos em vários graus, em meio MS contendo 0,2 mg.L^{-1} de ANA e 5,0 mg.L^{-1} de BAP (Belarmino, Abe e Sasahara, 1992).

Cultura de calos foram iniciadas a partir de plantas estabelecidas *in vitro* de *Artemisia absinthium* (Asteraceae), em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, KIN, ANA, AIA e 2,4 D, em combinação ou não. Suplementação do meio com baixas doses de BAP em combinação com ANA, e KIN em combinação com ANA, aumentaram a taxa de crescimento das culturas de calos. Iniciação de primórdios radiculares e de brotos ocorreram diretamente de explantes foliares cultivados em 1,8 μM de 2,4 D, enquanto formação de brotações adventícias provenientes de calos foram observadas ocasionalmente quando BAP foi adicionado ao meio em combinação com AIA. Além disso, meios contendo 2,22 μM de BAP e 2,69 μM de ANA estimularam ambos, crescimentos de calos e organogênese em algumas culturas de calos derivadas de folhas e caules de material estoque jovem (Nin et al., 1996).

Em *Swertia chirata* (Gentianaceae), cultivados em 1 e 5 μM de 2 iP, BAP, KIN, TDZ ou Zeatina, foi constatado que, em geral, a calogênese foi mais eficiente em citocininas mais fortes como TDZ ou BAP, levando a uma formação clara de calos, mas com sintomas severos de vitrificação, e a Zeatina na menor concentração levou a grande vitrificação. O 2 iP, na concentração de 5 μM , mostrou-se mais eficiente que o BAP, KIN e Zeatina nas mesmas concentrações (Wawrosch, Maskay e Kopp, 1999).

Conceição (2000), desenvolvendo um protocolo eficiente para a cultura de calos de *Derris urucu*, através de diversos tipos de explantes e várias concentrações e combinações de auxinas e citocininas, verificou que segmentos foliares oriundos de plântulas germinadas *in vitro* proporcionaram a melhor

resposta à indução de calos, em meio MS suplementado com 1,6 mg.L⁻¹ de 2,4 D. Segmentos radiculares oriundos de plântulas germinadas *in vitro* proporcionou a melhor resposta à indução de calos em meio MS, suplementado com 1,6 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP ou 0,8 mg.L⁻¹ de AIB + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. Para a manutenção, o meio de cultura mais eficiente de calos oriundos de folhas ou raiz foi proporcionado com meio MS, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Objetivando a obtenção de calos em folhas de *Tournefortia cf paniculata*, foi verificado que sob condição de luminosidade, a indução de calo ocorre de maneira bastante elevada em relação àqueles cultivados na ausência de luz. A presença de luz também influencia as reações de oxidação, apresentando coloração marrom-escuro, enquanto, no escuro, apresentaram uma coloração creme. Tratamentos no escuro foram adequados para indução; entretanto, quando se utilizaram 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, obtiveram-se 94% de indução, e com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, obtiveram-se apenas 75%. Porém, para uma manutenção dos calos por um período maior, após a 4^o subcultura, a menor quantidade de BAP foi mais eficiente. Quando se utilizaram 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, houve 100% de formação de calos marrom-claros, e apenas 51,4% de calos desta cor foram observados no tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (Bertolucci, 2000).

Bertolucci (2000) também estudou o efeito da citocinina TDZ na indução de calos em *Tournefortia cf paniculata*, verificando que estes apresentaram melhor aparência do que os induzidos pelo fitorregulador BAP. Entretanto, calos induzidos com TDZ foram obtidos com explantes foliares induzidos *in vitro*, e aqueles induzidos com BAP foram obtidos com explantes oriundos de casa-de-vegetação. Calos induzidos com TDZ mostraram uma coloração heterogênea branco-leitosa e creme-esverdeada, não apresentando, portanto, problemas com oxidação. Na indução de calo, o melhor meio foi o MS + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L⁻¹ de TDZ. Contudo, na manutenção no mesmo

meio de cultura, observou-se que os calos não apresentaram coloração inicial, a qual foi de marrom-clara a marrom. Optou-se, então, pela redução de metade da concentração de TDZ, permanecendo a coloração marrom-clara após várias subculturas. Em todas estas condições, os calos apresentaram-se friáveis.

A partir de raízes de plantas de *Jatropha podagrica* produzidas *in vitro*, Spera et al. (1997) verificaram interação significativa entre 2,4 D e KIN. Na presença de 4,6 μM de KIN e 9,1 μM de 2,4 D, foi observada maior biomassa de calo proveniente de raiz. Independente da concentração de KIN utilizada, foi verificada ocorrência de um crescimento linear para calos, nas concentrações de 4,5 e 9,1 μM de 2,4 D; a partir desta, foi constatada significativa redução, tendendo a zero. Na ausência de 2,4 D, houve redução da biomassa de calos com o aumento das concentrações de KIN. Na concentração de 18,1 μM de 2,4 D, não houve influência das diferentes concentrações de KIN, podendo isto ter ocorrido devido à alta concentração de 2,4 D utilizada.

Com o objetivo de induzir e manter calos de erva-baleeira (*Cordia verbenaceae*), Lameira et al. (1997) avaliaram diferentes concentrações de TDZ (0,22; 0,68; 2,04; e 6,13 μM), verificando que as maiores concentrações foram mais eficientes, para as quais todos explantes formaram calos, apresentaram a maior área coberta com calos, os quais apresentaram as maiores biomassas. Quando transferidos para o meio fresco de cultivo, os calos continuaram crescendo. Os tratamentos com as menores concentrações de TDZ foram menos eficientes, apresentaram explantes com 50% da área coberta com calos e, quando transferidos para o meio fresco nas mesmas concentrações, ocorreu a paralisação do crescimento, com a posterior morte dos calos. Os tratamentos que apresentaram o explante com maior área coberta com calos, em média 75%, foram 2,04 e 6,13 μM de TDZ. Somente nesses tratamentos os calos se mostraram friáveis, aumentaram de volume e mantiveram a coloração inicial

quando transferidos para o meio fresco de cultura. A friabilidade dos calos é muito importante para o início da suspensão celular.

Mercier, Vieira e Figueiredo-Ribeiro (1992) descreveram, em seu trabalho com *Gomphrena officinalis*, que a produção de calo foi obtida em meio suplementado com BAP (1,0; 5,0 ou 10,0 mg.L⁻¹) apenas ou combinado com ANA (0,1; 0,5; ou 1,0 mg.L⁻¹), porém não em meio com ANA sozinho, e todos os tratamentos testados exibiam textura friável.

Cultura de calos de *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae) foi maximizada em meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de KIN + 1,0 de ANA. Baixos níveis de auxinas promoveram formação de apenas raízes e altos níveis de citocininas produziram somente brotações (Varma, Vikramaditya e Sarkar, 1992).

Melhor indução de calos de *Hydrocotyle asiatica* foi alcançada em meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4 D e 0,5 mg.L⁻¹ de KIN em meio MS/2 (85-94% das culturas), seguido do MS com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4 D e 0,5 mg.L⁻¹ de KIN (40-50% das culturas), com 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4 D e 0,5 mg.L⁻¹ de KIN (20-28% das culturas) e, por último, com 0,05 mg.L⁻¹ de 2,4 D e 0,5 mg.L⁻¹ de KIN, que não formou calo (Josekutty, 1998).

Calos de *Uraria picta* (Fabaceae) foram iniciados em meio MS suplementado com citocinina e auxina (ANA e Benziladenina). Com 1,68 µM de ANA, observou-se formação mínima de calo (5%), enquanto, com 5,37 µM, até 72% de explantes mostraram formação de calo. Os calos foram testados para morfogênese em meio com BAP (0-0,22 µM). O número médio de brotações/cm² de calo, em baixas concentrações (0-0,04 µM), regeneraram 4 a 7 brotos, confirmando sua natureza autotrófica. Estes resultados confirmam relatos anteriores de calos de natureza autotrófica. A adição de BAP (0,089-0,133 µM) aumentou o número de brotos/calos de 7,5 para 17,35. O aumento na concentração de BAP (0,22 µM) reduziu a 5,36 brotos/cm² de calo (Anand, et al., 1998).

Em *Datura insignis*, o desenvolvimento de gemas axilares a partir de segmentos nodais foi observado em meios com baixas concentrações de ANA. Concentrações de ANA de 0,25 a 4,00 mg.L⁻¹, em combinação com BAP (2 e 1 mg.L⁻¹) induziram e promoveram grande desenvolvimento de calos claros e compactos, especialmente ao longo do lado abaxial da nervura central. O desenvolvimento de calos decresceu gradualmente com o decréscimo das concentrações de ANA e BAP. Em segmentos nodais, todas as concentrações testadas, exceto combinações de 0,015 mg.L⁻¹ de ANA + 0,06 ou 0,015 mg.L⁻¹ de BAP e 0,004 mg.L⁻¹ + 0,015 mg.L⁻¹ de BAP, promoveram o crescimento de calo. Esta redução no crescimento de calo foi também proporcional ao decréscimo da concentração de reguladores de crescimento. Meio contendo 1 mg.L⁻¹ de BAP + 0,25 ou 1 mg.L⁻¹ de ANA foi considerado ideal para a formação de calos (Figueiredo e Esquibel, 1991).

Estudando o melhor tipo e fonte de explantes para indução de calos em *Tridax procumbens*, verificou-se que segmentos foliares foram mais eficiente para indução de calos na presença de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 2,0 mg.L⁻¹ de ANA, comparados com segmentos caulinares. Maior ganho de matéria fresca foi obtido de explantes provenientes do cultivo *in vivo* e acondicionado no escuro (Cerqueira, 1999).

Em *Pfaffia glomerata*, foi avaliada a capacidade de segmentos de caules e raízes responderem a diferentes concentrações de 2,4 D e KIN no crescimento de calo e produção de saponósidos, verificando que o melhor crescimento de calos ocorreu em vários balanços 2,4 D/KIN, a partir de 1,0 x 0,5 até 2,5 x 2,5 mg.L⁻¹. Meio suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4 D x 0,5 mg.L⁻¹ de KIN e 2,5 mg.L⁻¹ de x 0,1 mg.L⁻¹ de KIN resultou em calos com maior incremento de matéria fresca. O melhor tratamento, que resultou em maior produção de saponinas, foi a suplementação com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4 D x 0,5 KIN. Foi

observada, também, correlação positiva entre aumentos nos níveis de sacarose no meio de cultura e a produção de saponinas (Kajiki, 1996).

A produção de princípios ativos muitas vezes não é viável economicamente, principalmente devido ao grande desconhecimento de rotas biossintéticas, falta de precursores específicos, entendimento dos mecanismos genéticos, fisiológicos e morfológicos de controle da biogênese e acúmulos dos compostos bioativos (França, 1999). Além de melhoramento de linhagem, métodos de seleção de linhagens de alta produção e otimização do meio podem levar a um incremento na produção de princípios ativos. A utilização de técnicas biotecnológicas é uma grande alternativa que poderá viabilizar a produção em larga escala. O melhor entendimento destas rotas e utilização de substâncias eliciadoras tomam a cultura de calos e suspensão celular uma ferramenta de grande valia. A cultura de células em suspensão tem sido amplamente utilizada em trabalhos de pesquisa, envolvendo diversas áreas, como engenharia genética, fisiologia, bioquímica, entre outras. Este tipo de técnica apresenta como fatores positivos a homogeneidade e a superior taxa de crescimento. Altas, moderadas ou baixas taxas de incrementos populacionais poderão ser obtidas numa suspensão em meio nutritivo adequado.

Calos friáveis são mais preferidos para produção de metabólitos secundários e iniciação de culturas de suspensão celular. Várias formulações de minerais, tais como MS, WH, LS e SH, acrescidas de substâncias reguladoras de crescimento, podem ser usadas na sua indução. Provavelmente, a característica de friabilidade seja favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, bem como pela adição de outros componentes ao meio, como água de coco, uréia, prolina além do genótipo (Cid, 1998). Segundo França (1999), geralmente calos cultivados em presença de luz apresentam-se friáveis, crescendo ativamente (elevado índice mitótico), enquanto calos cultivados no escuro se mostram mais compactos e bem menos proliferativos. Essa mesma autora afirma que calos ou

células em suspensão, resultantes da dediferenciação in vitro de tecidos de plantas, usualmente sofrem uma aparente perda de habilidade em acumular metabólitos secundários. Porém, existem alguns exemplos em que a variação propicia o desenvolvimento de culturas com alto nível de atividade biossintética. É importante manipular essas variações morfológicas, bioquímicas e genéticas, selecionando continuamente a população celular para manter as propriedades desejadas das culturas.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), quantidades excessivas de auxinas estimulam a produção de calo. O ácido 2,4 D tende a estimular a formação de calo mesmo em baixas concentrações, enquanto o AIB é uma auxina muito eficiente no enraizamento. O AIA é, de todas, a auxina menos estável em condições de meio de cultura devido à fotooxidação e à ação da AIA-oxidase nos tecidos dos explantes, o que confere a este fitorregulador características desejáveis, pois supriria as necessidades do explante sem, contudo, ter um efeito excessivo prolongado, o que resultaria na formação de calo e comprometimento da parte aérea. O ANA é bastante utilizado em meio de isolamento, porém, se adicionado em concentrações acima de alguns décimos de miligrama, tende a estimular a formação de calo.

Portanto, com o objetivo de iniciar estudo de produção de princípios ativos em carqueja, inicialmente através da cultura de calos friáveis, otimizando concentração de sais, vitaminas e balanços de fitorreguladores, e posteriormente através de suspensão celular, é fundamental, para o seu estabelecimento, a definição de um protocolo eficiente na produção de calos, pois é através deste que se inicia a suspensão celular, sobre a qual foi desenvolvido o presente estudo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento 1:

2.1.1 Localização do experimento

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura de Universidade Federal de Lavras.

2.1.2 Material vegetal

Foram utilizados ápices caulinares mantidos em casa-de-vegetação, de plantas matrizes oriundas de propagação por estaquia, retiradas de uma planta, localizadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA.

2.1.3 Tratamentos

Meio de cultura: MS-100 [concentração original dos sais Murashige e Skoog (1962)] e MS-50 (metade da concentração original dos sais MS, vitaminas e inositol), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de ágar e pH 5,7. Foram utilizados 15 balanços de fitorreguladores, incluindo duas citocininas [Benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN)] e a auxina ácido naftalenoacético (ANA). (Tabela 1).

TABELA 1- Combinação dos diferentes balanços de fitorreguladores avaliados. UFLA, LAVRAS, 2001.

ANA	0	BAP		KIN	
		2,5 µM	10,0 µM	2,5 µM	10 µM
0	1	2	3	4	5
2,5	6	7	8	9	10
10,0	11	12	13	14	15

Desinfestação: Foi realizada pulverização nas plantas matrizes com benlate (Benomil) 0,2%, 48 e 24 horas antes da inoculação. Após a coleta, os ápices foram lavados em água corrente por 15 minutos, 30 seg. em etanol (70%), 20 minutos em água sanitária Q-Boa Bactericida (30%). Já em capela de fluxo laminar, foram realizados 4 banhos em água destilada autoclavada por 3 minutos cada. Após a lavagem e corte do material vegetal (toaleta), estes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), em 10,0 mL de meio de cultura.

Manejo pós-inoculação: Foram incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $15 \mu\text{Mol.m}^2\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 °C.

2.1.4 Características avaliadas

Ao final de 60 dias, após implantação, o experimento foi coletado e foram avaliadas as seguintes características:

Biomassa fresca (BF) e seca (BS)- Foi obtida com auxílio de uma balança de precisão, com sensibilidade de 0,0001 g.

Porcentagem da área coberta de calo/explante (%CE)- Esta característica foi avaliada atribuindo valores de 0, 10, 25, 50, 75 e 100%, conforme o explante original se apresentava coberto por calo.

Porcentagem da área coberta de calo viável/explante (%CVE)- Foi avaliada da mesma maneira que a característica anterior, mas as partes que já estavam necrosadas foram consideradas como não viáveis.

2.1.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), disposto esquema fatorial (2 x 15), sendo duas concentrações dos sais MS e 15 balanços de fitorreguladores, como mostrado na tabela 1. Cada parcela foi constituída por 5 tubos. Cada tratamento foi constituído por 25 tubos

2.2 Experimento 2:

2.2.1 Localização do experimento

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

2.2.2 Material vegetal

Foram utilizados ápices caulinares de uma planta matriz, localizada no Horto de Plantas Medicinais da UFLA. Por ocasião da coleta dos explantes, no dia 24/12/00, a planta matriz encontrava-se em um crescimento vegetativo intenso e vigoroso.

2.2.3 Tratamentos

Meio de cultura: O meio de cultura utilizado foi o MS-50, como citado no experimento anterior. Foram utilizados 35 balanços de fitorreguladores, incluindo 2 citocininas [thidiazuron (TDZ) e cinetina (KIN)] e duas auxinas [ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D)]. (Tabela 2).

Desinfestação: Foi realizada pulverização com benlate 0,2% nas plantas, 48 e 24 horas antes da inoculação. Após a coleta, os ápices foram lavados em água corrente por 15 minutos, 30 seg. em etanol (70%), 15 minutos em Q-Boa Bactericida (30%). Já em capela de fluxo laminar, foram realizados 4 banhos em água destilada autoclavada por 3 minutos cada.

Manejo pós-inoculação: Foram incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $15 \mu\text{Mol.m}^2\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 °C.

TABELA 2- Combinação dos diferentes balanços de fitorreguladores avaliados. UFLA, LAVRAS, 2001.

Citocininas (μM)	Auxinas (μM)						
	ANA			2, 4 D			
0	5	10	15	5	10	15	
0	1	2	3	4	5	6	7
1,25 KIN	8	9	10	11	12	13	14
1,25 TDZ	15	16	17	18	19	20	21
2,5 KIN	22	23	24	25	26	27	28
2,5 TDZ	29	30	31	32	33	34	35

2.2.4 Características avaliadas

Ao final de 45 dias, o experimento foi coletado e foram avaliadas as seguintes características:

Biomassa fresca (BF)- Foi obtida com auxílio de uma balança de precisão, com sensibilidade de 0,0001 g.

Porcentagem da área coberta de calo/explante (%CE)- Esta característica foi avaliada atribuindo valores de 0, 10, 25, 50, 75 e 100%, conforme o explante original se apresentava coberto por calo.

Porcentagem da área coberta de calo viável/explante (%CVE)- Foi avaliada da mesma maneira que a característica anterior, mas as partes que já estavam necrosadas foram consideradas como não viáveis.

Porcentagem de explantes viáveis (EV %)- Foram considerados viáveis todos os explantes com o menor sinal de formação de parte aérea ou calos, mas as partes que já estavam necrosadas foram consideradas como não viáveis.

Formação de parte aérea (NBR %)- Para a avaliação desta característica, foram considerados como presença de parte aérea os explantes que apresentaram no mínimo início de brotação, atribuindo-se a estes nota 1; quando não havia qualquer sinal de parte aérea, foi atribuída nota 0.

Comprimento das partes aéreas (COMP)- Foi avaliado com o auxílio de uma régua, com os explantes ainda nos tubos de ensaios.

2.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 35 balanços de fitorreguladores, como mostrado na tabela 2, cada um constituído por 25 tubos. Cada parcela foi constituída por 5 tubos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento I – Influência da concentração de sais MS e da relação auxina/citocininas na indução de calos em *Baccharis trimera*.

Em todos tratamentos que produziram calos, estes apresentaram uma consistência altamente friáveis.

Efeito da concentração dos sais MS: A carqueja mostrou-se sensível, a uma concentração de sais no meio de cultura, na indução de calos. O meio de cultura básico do Murashige e Skoog (1962) é considerado um meio com elevada concentração de sais. O meio com MS-50 foi significativamente superior ao meio MS-100 para produção de biomassa, porcentagem da área

coberta com calos e área coberta com calos viáveis, aos 60 dias de cultivo (Tabela 1). Estes resultados concordam com os de Josekuti (1998), com *Hydrocotyle asiatica*, que encontrou melhores resultados na indução de calos em meio MS 50% da concentração de sais.

TABELA 1- Efeito da concentração dos sais MS na biomassa fresca (BF) e seca (BS), porcentagem da área coberta com calo/explante (%CE) e calo viável por explante (%CVE), aos 60 dias de cultivo. LAVRAS, UFLA, 2001.

CONC. SAIS	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS			
	MS	BF (mg)	BS (mg) ^y	%CE
50%	2560 A ^z	175,98 A	48,63 A	28,10 A
100%	1870 B	128,31 B	41,70 B	16,68 B

^z Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^y Dados transformados por 100.X.

Efeito do balanço de fitorreguladores: Não ocorreu proliferação dos ápices na ausência de suprimento exógeno de fitorreguladores (Tabela 2), o que provavelmente foi devido ao nível endógeno de hormônios insuficientes para induzir ou manter a divisão celular. Goleniowski, Silva e Trippi, (1992), trabalhando com *A. tenuifolia*, também não obtiveram proliferação de calos na ausência de suprimento exógeno de fitorreguladores. Fato semelhante foi observado por Kuti e Jarvis, (1992), que trabalhando com 4 espécies de *Baccharis* (*B. coridifolia*, *B. halimifolia*, *B. megapotamica* e *B. neglecta*), praticamente não obtiveram formação de calo na ausência do suprimento exógeno de fitorreguladores. A indução de calos é provocada por algumas injúrias no tecido e/ou por indução química. O genótipo pode responder às duas classes de fitorreguladores, citocinina e auxina, e a diferentes combinações, como: auxina somente; citocinina somente; auxina + citocinina e ausência. A carqueja (*B. trimera*) mostrou-se responder mais efetivamente com a presença

de reguladores de crescimento em duas classes, auxina somente e auxina e citocinina. Entretanto, o tecido mostrou maior indução com auxina somente no meio de cultura.

TABELA 2- Efeito do balanço de fitorreguladores na biomassa fresca (BF) e seca (BS), porcentagem da área coberta com calo/explante (%CE) e calo viável por explante (%CVE). Médias sobre diferentes meios de cultura, aos 60 dias de cultivo. LAVRAS, UFLA, 2001.

BAL. FITOR. (μ M)	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS			
	BF (mg)	BS (mg) ^y	%CE	%CVE
CONTROLE	---	---	---	---
2,5 BAP	124,13 D ^z	10,65 D	4,63 E	2,13 E
10,0 BAP	380,93 D	32,63 D	13,63 E	6,63 E
2,5 KIN	---	---	---	---
10,0 KIN	---	---	---	---
2,5 ANA	1164,33 D	74,98 D	17,13 E	7,88 E
10,0 ANA	4444,68 AB	265,59 ABC	71,13 ABCD	32,50 BCD
2,5 BAP + 2,5 ANA	3421,03 BC	218,47 BC	61,75 BCD	29,75 BCD
2,5 KIN + 2,5 ANA	2859,13 C	195,68 C	53,63 D	16,13 DE
10,0 BAP + 2,5 ANA	3040,40 C	209,78 BC	74,00 ABCD	46,88 AB
10,0 KIN + 2,5 ANA	2718,90 C	197,70 C	60,25 CD	20,75 CDE
10,0 BAP + 10,0 ANA	2738,93 C	210,08 BC	76,75 ABC	56,75 A
10,0 KIN + 10,0 ANA	3669,33ABC	260,16 ABC	81,88 AB	39,63 ABC
2,5 BAP + 10,0 ANA	3781,93 ABC	282,88 AB	86,25 A	46,13 AB
2,5 KIN + 10,0 ANA	4792,53A	327,13 A	76,50 ABC	30,75 BCD

^z Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^y Dados transformados por 100.X.

Relacionado a produção de biomassa de calo, a auxina ANA foi fundamental para sua otimização. Sozinho, apenas o ANA apresentou produção de biomassa satisfatória, sendo o BAP e KIN insuficientes, tanto em 2,5 μ M

quanto em 10,0 μM . Um bom desempenho com apenas ANA foi encontrado em cultura de *Uraria picta*, para a qual doses crescentes deste fitorregulador (até 5,37 μM) levaram à produção de até 72% dos explantes com formação de calos (Anand et. al., (1998). Como podemos notar claramente na tabela 2, quando se aumentou a relação de citocinina/auxina de 1:1 para 4:1, não foram verificados aumentos na biomassa, e quando se eleva a dose de auxina com KIN 1/1, foram observados aumentos na produção de biomassa. Aumentos consideráveis foram verificados nos tratamentos em que a relação citocinina/auxina é reduzida a 1:4, para a qual alguns dos melhores tratamentos, são 2,5 μM KIN + 10,0 μM de ANA, 2,5 μM BAP + 10,0 μM ANA, respectivamente. As citocininas BAP e KIN, apresentaram efeito positivo somente em conjunto com ANA. Balanço citocinina/auxina equilibrados, mas em concentrações menores se comparados com balanços equilibrados em concentrações maiores, apresentaram um comportamento semelhante. Os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos com balanço tendendo à auxina ANA, como podemos notar no tratamento com ANA 10 μM , que obteve uma das maiores produções de biomassa seca (Tabela 2). KIN apresentou forte tendência de maior eficiência na produção de biomassa de calos, se comparado ao BAP. Isto se deve ao efeito biológico do BAP ser maior do que a de KIN, para a indução de brotações. A ausência ou formação desprezível de calos, quando se utilizou apenas BAP ou KIN, nas concentrações de 2,5 ou 10,0 μM foi decorrente da não sobrevivência dos explantes, ou seja, quando não houve formação de calo, não houve também qualquer tipo de organogênese. Relação equilibradas de citocinina/auxina baixo apresentaram produção mediana, melhorando quando essa relação foi aumentada.

Em relação à área coberta de calo viável/explante, esta característica serve para dar uma idéia de um maior tempo de permanência de calos viáveis, sem a transferência para outro meio, antes de entrar na fase de senescência,

ficando escurecidos. Este comportamento será melhor visualizado quando, futuramente, for avaliada a curva de crescimento de calos. Para a manutenção do calo formado no meio de cultura original, sem subcultura, o BAP na concentração de 10,0 μM mostrou-se bastante eficiente, superando consideravelmente a citocinina KIN, e até mesmo a auxina ANA na concentração de 10,0 μM sozinha, que na fase de indução foi bastante eficiente (Tabela 2).

Interação concentração de sais X balanço de fitorreguladores: A melhor produção de biomassa foi obtida em meio MS-50, comparado com MS-100, suplementado com 2,5 μM de KIN + 10,0 μM de ANA, balanços estes, que apesar de apresentarem tendência bastante forte de maior produção de biomassa, não diferiram de 10,0 μM de ANA, 10,0 μM de ANA + 10,0 μM de KIN e 2,5 μM de ANA + 2,5 μM de KIN. A calogênese foi favorecida nos tratamentos com relação tendendo a auxinas, ou no máximo, equilibradas e preferencialmente com KIN (Tabela 3).

Quando se utilizou auxina em conjunto com citocinina ou apenas 10 μM de ANA, no meio MS-50, foi observada pouca diferença em relação à área coberta por calos, entre as diferentes combinações e concentrações de fitorreguladores. Quanto se utilizou o meio MS-100, houve maiores diferenças; apenas no tratamento 10 μM das citocininas com 10 μM de ANA ou 2,5 μM de citocininas com 10,0 μM de ANA promoveu a maior formação de calo, sugerindo, mais uma vez, que taxa de sais e vitaminas menos concentrados é mais propícia para formação de calo na espécie em estudo (Tabela 4). Ocorreu uma tendência de maior formação de calo no meio MS-100 suplementado com ANA e BAP (Tabela 4), que foi superada pelo efeito significativo na produção de biomassa nos tratamentos com ANA e KIN, em meio MS-50% (Tabela 3).

O trabalho de Mercier, Vieira e Figueiredo-Ribeiro (1992) com *G. officinalis* demonstrou que relações muito mais elevadas de citocinina/auxina (BAP/ANA) que as avaliadas no presente trabalho favoreceram a produção de

TABELA 3- Efeito da concentração dos sais MS X balanço de fitorreguladores na biomassa fresca (BF) e seca (BS) de calo, aos 60 dias de cultivo. LAVRAS, UFLA, 2001.

BAL. FITOR. (μ M)	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS			
	BF(mg)		BS (mg) ^y	
	MS 50%	MS 100%	MS 50%	MS 100%
CONTROLE	---	---	---	---
2,5 BAP	89,75 Fa ^z	158,50 Da	8,80 Ea	12,50 Da
10,0 BAP	614,85 EFa	147,00 Da	54,30 DEa	10,50 Da
2,5 KIN	---	---	---	---
10,0 KIN	---	---	---	---
2,5 ANA	2040,45 DEa	288,20 Db	127,80 CDa	22,15 Db
10,0 ANA	5043,95 ABa	3845,40 ABb	303,00 ABa	226,21 ABCb
2,5 BAP+2,5 ANA	4357,25 ABCa	2484,80 ABCb	271,15 ABa	165,79 Cb
2,5 KIN+2,5 ANA	3998,55 ABCa	1719,70 CDb	255,35 Ba	136,00 Cb
10,0 BAP+2,5 ANA	3298,45 BCDa	2782,35 ABCa	243,75 Ba	175,81 BCb
10,0 KIN+2,5 ANA	3437,10 BCDa	2000,70 BCDb	244,20 Ba	151,2 Cb
10,0 BAP+10,0 ANA	2837,20 CDa	2640,65 ABCa	221,65 BCa	198,39 BCa
10,0 KIN+10,0 ANA	3788,65 ABCDa	3550,00 ABCa	285,53 ABa	234,8 ABCa
2,5 BAP + 10,0 ANA	3355,70 BCDa	4208,15Aa	253,96 Ba	311,79 Aa
2,5 KIN + 10,0 ANA	5483,95 Aa	4101,10 Ab	370,25 Aa	284,00 ABb

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre fitorreguladores e minúscula entre concentração de sais MS, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^y Dados transformados por 100.X.

TABELA 4- Efeito do balanço de fitorreguladores na porcentagem da área coberta com calo/explante (%CE) e porcentagem de calo viável por explante (%CVE) de calo, aos 60 dias de cultivo. LAVRAS, UFLA, 2000.

BAL. FITOR. (μ M)	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS			
	%CE		%CVE	
	MS 50%	MS 100%	MS 50%	MS 100%
CONTROLE	---	---	---	---
2,5 BAP	3,00 Ba	6,25 Da	3,00 Da	1,25 Da
10,0 BAP	22,25 Ba	5,00 Da	12,75 Da	0,50 Da
2,5 KIN	---	---	---	---
10,0 KIN	---	---	---	---
2,5 ANA	24,25 Ba	10,00 Da	12,75 Da	3,00 Da
10,0 ANA	80,00 Aa	62,25 BCb	40,50 BCa	24,50 ABCDb
2,5 BAP+2,5 ANA	71,00 Aa	52,50 BCb	45,25 ABC	14,25 CDb
2,5 KIN+2,5 ANA	56,75 Aa	50,50 Ca	27,75 CDa	4,50 Db
10,0 BAP+2,5 ANA	84,25 Aa	63,75 ABCb	55,25 ABa	38,50 ABCb
10,0 KIN+2,5 ANA	67,50 Aa	53,00 BCa	25,75 CDa	15,75 CDa
10,0 BAP+10,0 ANA	79,25 Aa	74,25 ABCa	68,00 Aa	45,50 ABb
10,0 KIN+10,0 ANA	82,50 Aa	81,25 ABa	42,50 ABCa	36,75 BCa
2,5 BAP+10,0 ANA	78,75 Aa	93,75 Aa	44,75 ABCa	47,50 Aa
2,5 KIN+10,0 ANA	80,00 Aa	73,00 ABCa	43,25 ABCa	18,25 BCDb

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre fitorreguladores e minúscula entre concentração de sais MS não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

calos. Isto demonstra que não apenas a concentração de sais e fitorreguladores é importante para a indução de calos, mas o genótipo é um dos fatores mais importantes na diferenciação celular. Resultados parecidos foram obtidos por Varma, Vikramaditya e Sarkon (1991), com *Vitex agnus*, segundo os quais a

relação citocinina/auxina 1:2 maximizou a produção de calos. Efeitos positivos da combinação BAP/ANA ou KIN/ANA foram descritos para *A. absinthium*, que se destacou sob várias outras combinações de outros fitorreguladores (Nin et al., 1996). Foi descrita, também, a influência positiva do BAP ou 2,4 D, sozinhos, em induzir calos. Para *Datura innoxia*, a relação aproximada de 3:1 BAP:ANA foi considerado ideal para formar calos (Figueiredo e Esquibel, 1991); para *Tagetes erecta*, a relação 1,07/22,19 μM ANA/BAP favoreceu a formação de calos (Belarmino, Abe e Sasahara, 1992); para *Tridax procumbens*, a relação 8,97/10,74 μM BAP/ANA se mostrou eficiente na indução de calos (Cerqueira, 1999).

3.2 Experimento II – Influência da relação auxinas/citocininas na indução de calos em *Baccharis trimera*.

Como no experimento anterior, em todos os tratamentos que produziram calos, estes mostraram uma consistência altamente frável, com uma tendência de coloração mais clara, às vezes tendendo a uma cor avermelhada em algumas partes do calo, no tratamento com apenas 10 μM de ANA (Figura 1 e 2); e tendendo a uma coloração mais escurecida em 15 μM de ANA, ou nos tratamentos com ANA + KIN.

Efeito da utilização de auxinas: Uma das fases importantes em cultura de tecidos é o estabelecimento do explante. Observamos que na ausência de auxinas, o número de explantes viáveis foi bastante inferior em relação à presença deste fitorregulador. Quando foi utilizada a auxina 2,4 D, melhorou significativamente o número de explantes viáveis, que respondeu ainda mais

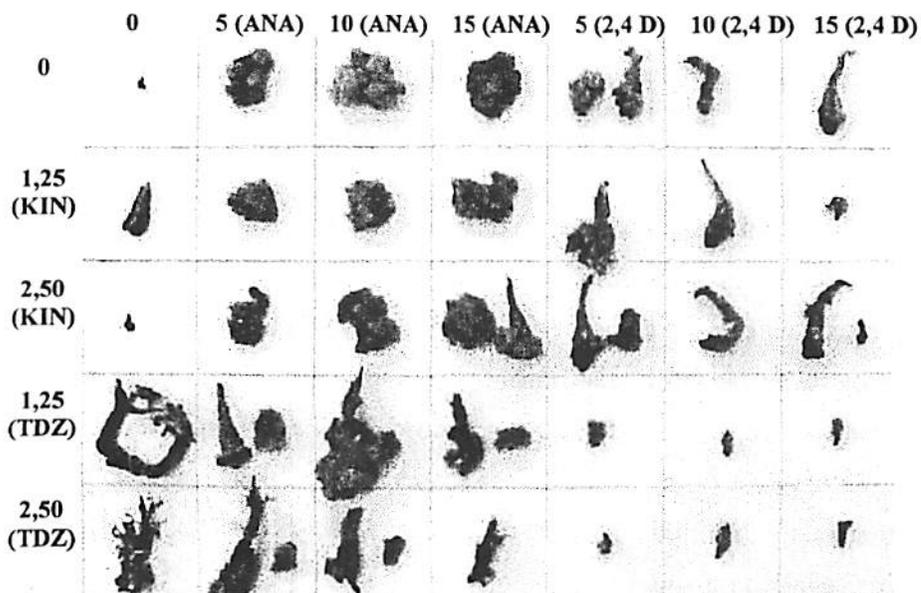


FIGURA 1- Visão geral das diferentes combinações de fitorreguladores na morfogênese de *B. trimera*, aos 45 dias de cultivo, em meio MS-50. UFLA, Lavras, 2001.

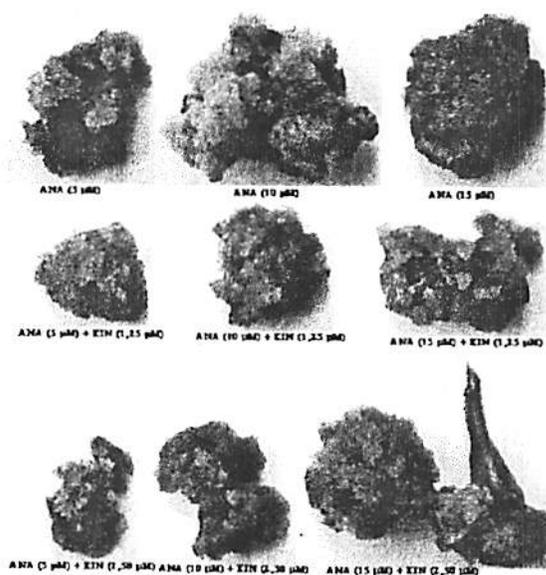


FIGURA 2- Efeito de diferentes balanços ANA/KIN na calogênese em *B. trimera*, aos 45 dias de cultivo, em meio MS-50. UFLA, Lavras, 2001.

com a utilização da auxina ANA (Tabela 5). A presença de auxina em meio de cultura exerceu grande inibição de parte aérea; na ausência deste fitorregulador, 100% dos explantes viáveis apresentaram no mínimo início de desenvolvimento da parte aérea ANA e 2,4 D, não diferiram entre si. O comprimento da parte aérea não foi influenciado pela presença ou não de auxina.

Resultados inversos ao da formação de parte aérea foram encontrados para formação de calos. Não houve formação de calo em ausência de auxina, e na presença de auxina ANA esta formação foi mais eficiente quando comparada à observada na presença de 2,4 D. Produção de biomassa seca (calo e parte aérea) não apresentou diferença entre a ausência de auxinas ou quando se utilizou auxina ANA, mas em presença de 2,4 D, ocorreram as menores produções de biomassa.

TABELA 5- Efeito da auxina utilizada na porcentagem de explantes viáveis (EV) e número de explantes com formação de parte aérea (NBR), comprimento das partes aéreas (COMP), porcentagem da área do explante coberta com calos (CE), calos viáveis (CVE) e biomassa fresca (BF), aos 45 dias de cultivo em meio MS-50. LAVRAS, UFPA, 2001.

FITOR.	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS					
	EV %	NBR %	COMP (cm)	CE %	CVE %	BF (g)
CONTR.	23,01 C	100 A	2,52 A	0 C	0 C	0,25 A
ANA	87,39 A	29,77 B	2,36 A	73,11 A	72,14 A	0,49 A
2,4 D	54,93 B	31,79 B	2,36 A	25,42 B	21,64 B	0,20 B

^z Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Efeito da utilização de citocininas: ausência ou presença de citocininas não influenciaram o número de explantes viáveis, o comprimento das brotações e o número de explantes com formação de parte aérea. Para esta última característica, como podemos notar na tabela 6, não ocorreram diferenças entre a

ausência ou presença de citocininas avaliadas devido a ter sido utilizada como critério de avaliação apenas a ausência ou presença de formação de parte aérea. Portanto, quando se avalia a qualidade das brotações, verifica-se que as obtidas com a citocinina TDZ foram bastante superiores e até iniciaram o desenvolvimento de múltiplas brotações, sem apresentar escurecimento das mesmas, o que não foi observado em presença de KIN (Figura 1), demonstrando claramente o efeito positivo do TDZ na diferenciação de parte aérea. Já para a formação de calos e produção de biomassa, presença de TDZ causou efeito inibitório.

TABELA 6- Efeito da citocinina utilizada na porcentagem de explantes viáveis (EV) e número de explantes com formação de parte aérea (NBR), comprimento das partes aéreas (COMP), em cm, porcentagem da área do explante coberta com calos (CE), calos viáveis (CVE) e biomassa fresca (BF), aos 45 dias de cultivo em meio MS-50. LAVRAS, UFLA, 2001.

FITOR.	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS					
	EV %	NBR %	COMP	CE %	CVE %	BF (mg)
CONTR.	64,12 A ^z	36,45 A	2,44 A	59,35 A	58,38 A	0,38 A
KIN	62,65 A	32,37 A	2,45 A	65,03 A	61,27 A	0,50 A
TDZ	67,52 A	34,26 A	2,29 A	40,58 B	40,19 B	0,19 B

^z Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Efeito do balanço auxinas/citocininas: Uma visão geral da interação dos fitorreguladores pode ser observada na figura 1. Como ocorreu no experimento 1, na ausência de suprimento exógeno de fitorreguladores não houve nenhuma proliferação de tecidos. Quando se utilizou apenas KIN, houve uma porcentagem desprezível de explantes viáveis na concentração de 1,25 µM; e não ocorreram explantes viáveis quando se utilizaram 2,50 µM de KIN. Como podemos notar na tabela 7, tratamentos em presença de auxina ANA, em

qualquer uma das três concentrações avaliadas, apresentaram as maiores porcentagens de explantes viáveis. Em presença de fitorreguladores, os menores números de explantes viáveis foram obtidos na combinação de 2,4 D e KIN, ou apenas 2,4 D, exceto na concentração de 5 μM , e resultados intermediários foram obtidos na combinação de 2,4 D e TDZ.

TABELA 7- Efeito do balanço de fitorreguladores na porcentagem de explantes viáveis (EV) aos 45 dias de cultivo em meio MS-50. LAVRAS, UFLA, 2001.

AUXINAS (μM)	CITOCININAS (μM)				
	0	1,25 KIN	2,50 KIN	1,25 TDZ	2,50 TDZ
0	0 Db ²	4,76 Db	0 Db	44 Ca	58,33 ABCa
5 (ANA)	100 Aa	88 ABab	91,30 Aab	91,67 Aab	76 Ab
10 (ANA)	90,91 Aa	100 Aa	90,91 Aa	83,33 Aa	62,5 ABb
15 (ANA)	96 Aa	100 Aa	95,24 Aa	84 Aa	59,09 ABCb
5 (2,4 D)	79,17 Aa	76 Ba	68 Ba	60,87 BCa	73,68 ABa
10 (2,4 D)	32 Cbc	21,74 CDc	48 BCb	75 ABa	52,58 Bcab
15 (2,4 D)	54,17 Bb	33,33 Cc	36 Cbc	80,95 ABa	38,89 Cbc

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre auxinas e minúscula entre citocininas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A área coberta de calo/explante foi intensificada nos tratamentos em presença de 15 μM de ANA isoladamente, ou 10 e 15 μM de ANA em conjunto com KIN (1,25 ou 2,5 μM) (Figura 2). Em ausência de auxina, citocininas não induziram formação de calos; em presença de ANA, KIN praticamente não apresentou efeito; e TDZ reduziu a área coberta/calos. 2,4 D foi muito inferior ao ANA na indução de calos quanto utilizado sozinho, com KIN ou TDZ (Tabela 8).

TABELA 8- Efeito do balanço de fitorreguladores na porcentagem da área coberta por calos aos 45 dias de cultivo em meio MS-50. LAVRAS, UFLA, 2001.

AUXINAS (μM)	CITOCININAS (μM)				
	0	1,25 KIN	2,50 KIN	1,25 TDZ	2, 50 TDZ
0	---	---	---	---	---
5 (ANA)	66,58 Ba ^z	75,48Ba	76,25 Aa	72,62 Aa	34,71 ABCb
10 (ANA)	71,50 Bb	81,04 ABab	94,44 Aa	45 BCc	45,50 Abc
15 (ANA)	95,83 Aa	96,88 Aa	88,16 Aa	53,21 ABb	55,83 Ab
5 (2,4 D)	33,33 Ca	39,17 Ca	29,12 Ba	27,08 CDa	30,83 Bca
10 (2,4 D)	11,88 Ca	37 Ca	11,25 Ba	32,27 BCDA	20 Bca
15 (2,4 D)	22,28 Ca	28,33 Ca	11,67a B	12,67 Da	12,50 Ca

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre auxinas e minúscula entre citocininas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Como podemos observar na tabela 9, a presença de auxina, principalmente ANA, causou inibição da diferenciação de brotações, exceto no tratamento com 10,0 μM de ANA + 1,25 μM de TDZ, que apresentou tendência de maior formação de parte aérea, mas ocorreu formação de calo na base dos explantes, o que não é interessante se o objetivo for a propagação *in vitro*. Em Relação ao tratamento com 1,25 μM de KIN, houve, em todos os explantes, início de desenvolvimento de parte aérea, mas por ocasião da avaliação do experimento, estes já se encontravam escurecidos. A auxina 2,4 D apresentou uma tendência de maior formação de parte aérea dos explantes, mas estas já se encontravam com uma coloração escurecida (Figura 1). Este escurecimento se deve, provavelmente, à taxa de citocinina insuficiente para manter a divisão celular. A combinação de 2,4 D e TDZ apresentou os piores resultados para a formação de parte aérea, juntamente com as maiores concentrações de ANA.

Para a formação de parte aérea, os tratamentos mais eficientes foram a utilização de 1,25 e 2,5 μM de TDZ, sem a utilização de auxina (Figura 3).

TABELA 9- Efeito do balanço de fitorreguladores na formação de parte área aos 45 dias de cultivo em meio MS-50. LAVRAS, UFLA, 2001.

AUXINAS (μM)	CITOCININAS (μM)				
	0	1,25 KIN	2,50 KIN	1,25 TDZ	2, 50 TDZ
0	---	---	---	100 Aa	100 Aa
5 (ANA)	39,13 ABa ^z	22,73 Aa	42,86 ABa	18,18 Ca	36,84 Ba
10 (ANA)	35 ABab	28 Ab	21,05 Bb	68,42 ABa	33,33 Bab
15 (ANA)	16,67 Ba	12 Aa	33,33 Ba	33,33 BCa	7,69 Ba
5 (2,4 D)	33,33 ABa	5,56 Ab	45 ABa	14,29 Ca	14,29 Ba
10 (2,4 D)	50 ABab	40 Aab	78,57 Aa	8,33 Cb	22,22 Bb
15 (2,4 D)	64,29 Aa	42,86 Aab	55,56 ABab	11,76 Cb	14,29 Bab

^z Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre auxinas e minúscula entre citocininas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As maiores produções de biomassa (calo e parte aérea) foram obtidas com ANA, principalmente nas concentrações de 10 e 15 μM , sozinha ou em combinação com KIN (1,25 ou 2,50 μM). Esta maior produção de biomassa foi causada principalmente devido à maior formação de calos nestes tratamentos. Portanto, a produção de biomassa foi um reflexo da produção de calos, ocorrendo menor acúmulo de biomassa nos tratamentos com menor formação de calo, nas combinações de 2,4 D e TDZ. Exceção ocorreu no tratamento em que auxina estava ausente, 1,25 μM de KIN e 1,25 e 2,50 μM de TDZ. Nestes tratamentos não ocorreram a formação de calos, portanto, a produção de biomassa nestes tratamentos foi exclusivamente de formação de parte aérea (Tabela 10).

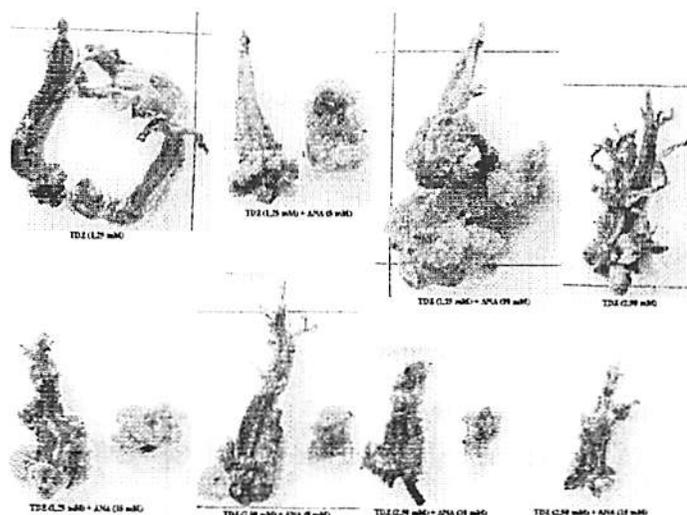


FIGURA 3- Efeito de diferentes balanços ANA/TDZ na morfogênese em *B. trimera*, aos 45 dias de cultivo, em meio MS-50. UFLA, Lavras, 2001.

TABELA 10. Efeito do balanço de fitorreguladores na produção de biomassa fresca (g), aos 45 dias de cultivo em meio MS-50. LAVRAS, UFLA, 2001.

Auxinas (μM)	Citocininas (μM)				
	0	1,25 KIN	2,50 KIN	1,25 TDZ	2,50 TDZ
0	---	---	---	0,22 ABa	0,27 Aa
5 (ANA)	0,31 BCab	0,42 BCab	0,54 Aa	0,27 ABb	0,37 Aab
10 (ANA)	0,56 ABab	0,65 ABa	0,74 Aa	0,40 Abc	0,26 Ac
15 (ANA)	0,72 A	0,81 A	0,69 A	0,16 AB	0,11 A
5 (2,4 D)	0,18 Ca	0,09 Da	0,18 Ba	0,08 Ba	0,07 Aa
10 (2,4 D)	0,20 Ca	0,16 CDa	0,24 Ba	0,05 Ba	0,08 Aa
15 (2,4 D)	0,17 Ca	0,14 CDa	0,20 Ba	0,06 Ba	0,05 Aa

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre auxinas e minúscula entre citocininas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A ocorrência de calos friáveis, o que foi interessante, uma vez que estes são preferidos para a produção de metabólitos secundários e iniciação de culturas de suspensão celular, pode ter ocorrido devido aos calos terem sido cultivados em presença de luz (França, 1999), e/ou devido à alta relação auxina/citocinina (Cid, 1998).

Goleniowski, Silva e Trippi (1992) relatam, em seu trabalho com *A. tenuifolia*, que concentrações de 2,4 D em meio de cultura entre 0,1 e 10,0 μM resultaram em boa produção de calos, e doses mais elevadas foram menos eficientes. Portanto, esta reduzida eficiência do 2,4 D, em produzir calos, comparado ao ANA, nas concentrações avaliadas, pode ser devida ao fato de ser esta uma auxina muito potente, causando efeito tóxico nestas concentrações para a *B. trimera* e condições fisiológicas dos explantes utilizados. Ainda em *A. tenuifolia*, foi relatada a influência positiva do BAP até 10,0 μM , mas esta influência foi muito maior quando o BAP estava associado à auxina 2,4 D.

Por outro lado, a literatura mostra exemplos de trabalhos com a utilização de doses elevadas não apenas de 2,4 D, como também de TDZ, uma citocinina muito potente, apresentando efeitos benéficos, como para a cultura de *D. urucu*, para a qual a melhor resposta foi obtida com 7,24 μM de 2,4 D, e 8,59 μM de ANA + 4,44 μM de BAP, dependendo do tipo de explante (Conceição, 2000); e para *T. paniculata*, para a qual 2,69 μM de ANA + 9,08 μM de TDZ proporcionaram a melhor resposta (Bertolucci, 2000). Spera et al. (1997), em explantes de *J. podagrica*, alcançaram melhores resultados na presença de 4,6 μM de KIN e 4,5 μM de 2,4 D; Lameira et al. (1997) também verificaram influência positiva de TDZ 2,04 e 6,13 μM . Nestas concentrações, os explantes de *C. verbenaceae* apresentavam maior área coberta por calos. Resultados de Kuti e Jarvis (1992) verificaram não apenas concentrações benéficas mais elevadas de 2,4 D na produção de calos, mas também grandes diferenças entre 4 genótipos de *Baccharis*: *B. megapotamica* respondeu positivamente até 1,11

μM , *B. coridifolia* e *B. neglecta* até 2,22 μM e *B. halimifolia* até 4,44 μM , demonstrando que diferentes genótipos respondem de maneira distinta a variação nas concentrações do meio de cultura e balanços de fitorreguladores.

Josekutty (1988) descreveu maior formação de calo em balanços equilibrados (2,36 μM de 2,4 D e 2,32 μM de KIN) quando o balanço auxina/citocinina foi tendendo ao BAP; foi observada redução na formação de calos, até chegar à ausência de formação destes, no balanço 1:10 (0,22 μM de 2,4 D x 2,30 μM de KIN).

Em *P. glomerata*, a formação de calo ocorreu em diferentes combinações de 2,4 D e KIN, desde 4,52 μM de 2,4 D e 3,32 μM de KIN até 11,31 μM de 2,4 D e 11,32 μM de KIN; e maior produção de biomassa, atingida em 4,52 μM de 2,4 D e 2,32 μM de KIN e 11,31 μM de 2,4 D e 0,46 μM de KIN (KAJAKI, 1996).

O efeito superior do TDZ, comparado com a KIN, provavelmente foi devido à ocorrência de habituação, ou seja, as fenil uréias são bastante capazes de tomar os explantes autotróficos em citocininas, como o ocorrido para regeneração de plantas de tabaco, expansão de cotilédones de rabanete e crescimento de calos de soja (Thomas e Katterman, 1986). Portanto, os resultados eficientes para formação de parte aérea obtidos nos tratamentos com TDZ provavelmente decorreram de um maior nível endógeno de citocininas purinas, causado pelo suprimento exógeno com TDZ. Resultado semelhante não foi observado com suprimento exógeno com citocinina purina KIN.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

Para que o explante sobreviva e ocorra qualquer manifestação de crescimento e/ou desenvolvimento, é necessário o suprimento exógeno de fitorreguladores.

O meio de cultura com 50% da concentração de sais MS, vitaminas e inositol mostrou-se mais eficiente na indução e crescimento de calos.

A auxina mostrou-se mais eficiente na indução e crescimento de calos que as citocininas, e entre as auxinas e concentrações estudadas, ANA (10 μM) foi mais eficiente na indução e crescimento de calos que 2,4 D, sendo, desta maneira, indicado para a indução e crescimento de calos friáveis.

Para a formação de parte aérea, TDZ sozinho, nas concentrações de 1,25 e 2,50 μM foram os únicos tratamentos eficientes. Entretanto, para alcançar esse objetivo, novos estudos ainda precisam ser realizados para otimização da propagação *in vitro*.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios, apresentando boa produção de calos friáveis de acordo com o objetivo inicial, para futuros estudos de produção de princípios ativos em calos de *B. trimeria*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, A.; RAO, C.S.; LATHA, R.; JOSEKUTTY, P.C.; BALAKRISHNA, P. Micropropagation of *Uraria pictata*, a medicinal plant, through axillary bud culture and callus regeneration. *In Vitro Cell Developmental Biology-Plantarun*, Columbia, v.34, p.136-140, 1998.

BELARMINO, M.M.; ABE, T.; SASAHARA, T. Callus induction and plant regeneration in african marigold (*Tagetes erecta* L.). *Japan Journal Breed*, v.42, p.835-841, 1992

BERTOLUCCI, S.K.V. Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tounefortia cf paniculata* Cham. **Dissertação de Mestrado**. Lavras: UFLA, 2000. 79p. (Dissertação - Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica).

CERQUEIRA, E.S. Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal. **Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal**, Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

CID, L.P.B. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. Suspensão celular. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. v.1, p.331-353, 1998.

CONCEIÇÃO, H.E.O. Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp). Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

FIGUEIREDO, S.F.L.; ESQUIBEL, M.A. Callogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura innoxiosa* Barb. Rodr. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.3, n.2, p.63-68, dez. 1991.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121.

GOLENIOWSKI, M.E.; SILVA, G.L.; TRIPPI, V.S. Effect of phytohormones on sesquiterpene lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. *Phytochemistry*, Oxford, v.31, n.7, p.2359-2361, July 1992.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Micropropagação. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. v.1, 864p. 1998.

- JOSEKUTTY, P.C. Callus culture and micropropagation of *Hydrocotyle asiatica* [*Centella asiatica* (L.) Urban], a medicinal plant. *Phyton*, Hom, v.63, v.1/2, p.275-278, 1998.
- KAJIKI, F.O. Estudos das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Piracicaba: ESALQ, 1996. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).
- KUTI, J.O.; JARVIS, B.B. Growth hormone-like activities of macrocyclic trichothecenes in in vitro callus induction and growth of four *baccharis* species *Journal of Plant Growth Regulation*, New York, v.11, p.149-154, 1992.
- LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.M. de F.; CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M.L. Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.27, n.1, p.x-y, jan./mar. 1997.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue Culture and Plant Propagation of *Gomphrena officinalis* a Brazilian medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v.28, p.249-254, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, copenhagen, v.15, p.473-493, 1962.
- NIN, S.; MOROSI, E.; SCHIFF, S.; BENNICI, A. Callus cultures of *Artemisia absinthium* L.: iniation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v.45, n.1, p.67-72, Apr. 1996.
- SPERA, M.R.N; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L; SALVADOR, E.D. Efeito de diferentes concentrações de cinetina e 2,4 D sobre a indução de calos provenientes de raízes de *Jatropha podagrica* HOOK *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.21, n.3, p.386-389, jul./set. 1997.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRIGIDO, M.M.; ROMANO, E. Glossário de

biotecnologia vegetal. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 128p.

VARMA, P.N.; VIKRAMADITYA, SARKAR, M. A preliminary report on the in vitro culture of *Vitex agnus castus*. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, v.15, n.3, p.687-694, 1991.

WAWROSCH, C.; MASKAY, N.; KOPP, B. Micropagation of the threatened nepalese medicinal plant *Stevia chirata* Buch.-Ham. ex Wall. **Plant Cell Reports**, Berlim, v.18, p.997-1001, 1999.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Sabe-se que o tamanho e a espessura de uma folha podem ser influenciados pela duração e pelo comprimento de onda da luz, mas as diferenças na intensidade da irradiância são responsáveis pelas maiores variações no tamanho da folha. Dentro de certos limites, quanto maior a intensidade da irradiação, menor e mais grossa será a folha, embora a resposta precisa irá depender da espécie. De uma maneira geral, folhas de sol são pequenas e grossas, enquanto folhas de sombras são grandes e finas (Whatley e Whatley, 1982).

A estrutura interna das folhas de sol é muito diferente da de folhas de sombra. As folhas de sol contêm mais camadas de células que as folhas de sombra; as células do tecido paliádico estão muito juntas umas das outras e são alongadas em uma direção perpendicular à superfície da folha; os espaços intercelulares entre células da camada interior do mesofilo são pequenos; o sistema vascular é extenso e as paredes celulares são grossas. Nas folhas de sombra, o tecido paliádico é pouco desenvolvido e os espaços intercelulares são grandes. A epiderme superior da folha de sol é coberta por uma grossa camada de cutícula, menos permeável que aquela encontrada em folhas de sombra. Assim, é evitada a perda excessiva de água por transpiração em irradiação direta, muito importante por reduzir a volatilização rápida do óleo (Letchamo e Gosselin, 1996; Whatley e Whatley, 1982).

É característico que folhas de sombra tenham cloroplasto maiores, com desenvolvimento muito maior de grana do que folhas de sol de mesma planta; há mais clorofila por cloroplasto, e a razão da clorofila *b:a* é maior. Todas estas mudanças resultam de uma utilização mais eficiente de irradiação menos intensa e mais esverdeada, características de condições de sombra. Com mais clorofila por cloroplasto, os pigmentos disponíveis para captar fótons e os centros

fotoquimicamente ativos são mais numerosos, e quando a razão da clorofila *b:a* é maior, a banda de absorção dos pigmentos expande-se em direção à parte verde do espectro (Whatley e Whatley, 1982).

Investigações de Yamaura, Tanaka e Tabata, (1988) em seedlings estiolados de tomilho constataram somente traços de monoterpenos em cotilédones e hipocótilos após o desenvolvimento dos tricomas glandulares peltate. Estes resultados indicaram que a diferenciação dos tricomas ocorre antes do acúmulo de monoterpenos em seedlings tanto em presença quanto ausência de irradiação, e que esta estimula acentuadamente a formação dos tricomas e óleo essencial, especialmente em cotilédones. Foi verificado também que a produção de monoterpenos pode ser induzida irradiando seedlings estiolados de tomilho. A produção de timol, o principal constituinte do óleo essencial, elevou com o aumento do tempo de irradiação. Análise de tricomas mostrou que monoterpenos eram acumulados principalmente nos tricomas glandulares peltatos de cotilédones e folhas primárias em seedlings verdes. Além do mais, o teor de monoterpenos em vários órgãos dos seedlings estava estreitamente correlacionado com o número de tricomas, cuja formação é um pré-requisito para o acúmulo do óleo essencial nesta planta. Todavia, não está claro se a produção de monoterpenos em tomilho é dependente do suprimento de sacarose através da fotossíntese.

Engel e Poggiani (1991), estudando o efeito do sombreamento em quatro espécies florestais nativas, verificaram que a concentração de clorofila nas folhas se correlacionava positivamente com o nível de sombra em todas as espécies, ou seja, menor disponibilidade de irradiância, maior teor de clorofila, sendo essa correlação mais elevada para clorofila *b*. Mostraram também que as quatro espécies estudadas possuem a capacidade de alterar seus fotossistemas em termos de quantidades de pigmentos e de composição relativa de clorofila *a* e *b*. Com relação à clorofila extraída, afirmaram que as alterações sofridas nas

folhas proporcionaram uma maior eficiência de absorção de irradiação não só na faixa do vermelho, mas também de outras regiões do espectro.

Auken e Bush (1990), estudando *Baccharis neglecta*, verificaram que conforme elevou o nível de irradiância, aumentou significativamente o número de folhas, o comprimento e o diâmetro basal do caule, a produção de biomassa aérea, radicular e total.

Estudos de Naves (1993), em diferentes níveis de irradiância, com *Sesbania sesbam*, *Cybistax antisyphilitica* (“ipê mirim”) e *Copaifera langsdorffi* (“óleo copaiba”), verificaram que plantas de *S. sesbam* apresentaram uma maior área foliar quando crescidas sob maior nível de irradiância, mas graus satisfatórios quando crescidas sob menor nível de irradiância. As plantas de *C. antisyphilitica* e *S. sesbam* apresentaram uma maior altura quando cultivadas sob menor nível de irradiância, enquanto *C. langsdorffi*, não apresentou qualquer diferença na altura em função dos diferentes níveis de irradiância. As plantas de *C. langsdorffi* e *C. antisyphilitica* apresentaram grande plasticidade fenotípica em relação à disponibilidade de irradiação do ambiente, adaptando-se a uma ampla faixa. Contudo, *C. langsdorffi* comportou-se como planta mais altamente tolerante ao sombreamento no estágio inicial do seu desenvolvimento, em relação às demais espécies estudadas. *S. sesbam* apresentou desenvolvimento mais favorável no maior nível de irradiância, bem como maior acúmulo de biomassa seca em relação as demais espécies em todos os níveis de irradiância estudado.

Scalon e Alvarenga (1993), pesquisando pau-pereira (*Platycyamus regnelli*), verificaram que o cultivo de plantas submetidas a diferentes níveis de irradiância não afetou o diâmetro de caule, biomassa seca, área foliar e altura, embora tenha havido uma ligeira tendência de maior desenvolvimento naquelas que se encontravam sombreadas.

Trabalhos de Letchamo e Gosselin, (1995); Letchamo e Gosselin, (1996), com tomilho (*Thymus vulgaris*), em diferentes níveis de irradiância, demonstraram que plantas cultivadas sob maior intensidade, apresentaram menor altura, brotos eretos com mais perfilhos, ramos mais grossos e folhas mais grossas, maiores valores de área foliar, biomassa seca da parte aérea e raízes, enquanto plantas cultivadas em menor intensidade tiveram um tipo de crescimento prostrado, com folhas menos espessas, mais largas e cor verde levemente pálida. Estas adaptações morfológicas favorecem uma melhor interceptação da irradiação, resultando em maior produção de matéria seca e maior teor de óleo essencial.

O número de glândulas oleíferas nos dois lados da folha aumentou significativamente em maior irradiação. Houve uma correlação positiva entre o número de glândulas oleíferas e o teor de óleo essencial, sugerindo que um aumento simultâneo de intensidade luminosa e água no solo, possam aumentar a formação de glândulas oleíferas, com aumentos subsequentes no teor de óleo essencial. A carga de cera epicuticular significativamente mais alta ocorreu em plantas de tomilho cultivadas em maior intensidade luminosa. A cera é importante por reduzir a volatilização rápida do óleo. Todavia, para minimizar a retirada por lavagem da quantidade de cera epicuticular e volatilização do óleo da superfície foliar, o contato direta da água com as folhas durante a irrigação deve ser evitado ou minimizado. Foram observados que plantas cultivadas em menor intensidade de luz liberaram um aroma de tomilho típico sem perturbação mecânica, enquanto plantas cultivadas em maior intensidade não liberaram o aroma, a não ser que a folha fosse comprimida. Simultaneamente, plantas de tomilho cultivadas no campo liberaram aroma característico desta planta, com intensidade aumentando durante ou após a chuva. Estas constatações demonstram o efeito benéfico da irradiância no maior acúmulo de cera, e consequente redução na volatilização do óleo. A composição do óleo essencial

foi significativamente afetada por regimes de irradiação. Houve mudanças significativas no conteúdo de fenóis, em particular monoterpenos hidrocarbonados do óleo essencial, devido às diferenças em intensidades luminosas. O maior nível de timol foi obtido do óleo essencial, em maior intensidade luminosa. Houve diferenças significativas entre os dois genótipos estudados em relação ao nível de timol, indicando diferentes potenciais existente em resposta a diversas condições de irradiância. (Letchamo et al., 1994; Letchamo e Gosselin, 1995).

Castro, Alvarenga e Gomide (1996) verificaram em mudas de calabura (*Muntingia calabura*) submetidas a três níveis de irradiância (100%, 67% e 48%), que as plantas cultivadas em maior nível, quando comparadas com as plantas em menores níveis, apresentaram inferior acúmulo de biomassa seca total, reduzidos valores de diâmetro de caule, altura e área foliar. Porém, para a biomassa seca de raiz, não houve diferenças significativas entre os diferentes níveis de irradiância. Todavia, as maiores taxas assimilatórias líquidas e de distribuição de biomassa seca para as raízes foram obtidas em plantas cultivadas a 100% de irradiância.

Pesquisas de Souza (1998), revelaram que a produção de biomassa em tanchagem (*Plantago major* L) apresentou efeito significativo da intensidade luminosa. A produção de biomassa seca e fresca de folhas e inflorescências, o sistema radicular, a área foliar e a altura foram influenciados pelo nível de irradiância, sendo mais expressiva em maior nível. A emissão das inflorescências e a produção de sementes foram precoces em relação às plantas submetidas a baixa irradiância.

Atroch (1999) estudando o efeito do nível de irradiância em pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), verificou que, em relação ao diâmetro do caule, não ocorreram diferenças entre as intensidades luminosas, o que não se observou com o crescimento em altura, que aumentou com a redução do

irradiância até 70%, não diferindo do nível de 50%. Para a característica de área foliar específica, houve diferenças significativas entre os tratamentos. Os dois maiores níveis de irradiância proporcionaram a maior área foliar específica. A biomassa seca da parte aérea não se alterou entre os tratamentos. Entretanto, houve diferenças significativas entre os tratamentos para biomassa seca do caule, sendo o nível de 70% o que proporcionou maior acúmulo de biomassa seca, não diferindo do menor nível.

Giloni (2000), constatou, em 2 cultivares de soja submetidas a 3 níveis de irradiância (100, 79 e 51%), que as cultivares apresentaram plasticidade diferenciadas. Uma aumentou a concentração de clorofila à medida que diminuiu o nível de irradiância, constatando-se aumento de N na raiz e parte aérea. Entretanto, na outra, com produção de biomassa seca superior, a síntese de clorofila foi afetada pelo sombreamento na fase reprodutiva. Os menores níveis de irradiância afetaram o desenvolvimento dos nódulos, mas o N total foi alterado somente no nível de 79%. Todos os genótipos diminuíram significativamente o número de folhas por planta, especialmente na fase reprodutiva, com exceção de um genótipo, que aumentou. Em todos os genótipos, a área foliar por planta, a área foliar específica e o índice de área foliar aumentaram em relação ao tratamento não sombreado, com a exceção de um genótipo, que sofreu significativa redução

Ventrela e Ming (2000), demonstraram maiores produções de biomassa e teor de óleo essencial em maior intensidade de irradiância de 30% a 100%, em *Lippia alba*.

Objetivando avaliar a influência do nível de irradiância na otimização do crescimento, rendimento e qualidade do óleo essencial, foi realizada a presente pesquisa. Este trabalho foi necessário devido à inexistência de estudos neste sentido para a carqueja, a observações de ocorrência espontânea em diferentes níveis de irradiância para a espécie e devido à necessidade de implantar o cultivo

comercial, uma vez que praticamente toda a produção atual vem do extrativismo desordenado, levando a uma produção de óleo muito heterogênea e a uma possível extinção deste vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento

O experimento foi conduzido em condições de campo no período de 30 de março a 13 de dezembro de 2000, no Setor de Plantas Medicinais-Horticultura/DAG da Universidade Federal de Lavras, situada a 918,87 metros de altitude, com latitude de 21° 14' sul e longitude de 45° oeste. As características do clima durante o período de duração do experimento são mostradas na tabela 1. O clima, segundo a classificação de Koppem, é do tipo cwa.

TABELA 1- Características do clima durante o período de 30/03/2000 a 13/12/2000. UFLA, LAVRAS, 2001.

Temperatura			Precipitação	Umidade relativa	Insolação (h)
Máx.	Min.	Méd.	(mm)	(%)	
26,50	13,90	19,30	1,91	67,46	7,32

2.2 Material vegetal

O material vegetal utilizado foram seedlings oriundos de sementes coletadas no Horto de Plantas Medicinais/UFLA, com 94 dias após o plantio das sementes em substrato Plantmax[®] em casa-de-vegetação, com as seguintes características: 30,85 cm de altura, 1,25 ramos/planta, 8,75 nós/planta e massa fresca de 1,45 g. Foi implantado o experimento em que permaneceram até 2

semanas antes do plantio; as plantas foram retiradas da casa-de-vegetação e colocadas a pleno sol para aclimatarem.

2.3 Tratamentos

Foram avaliados 4 níveis de irradiância, utilizando para tal sombrite com especificação comercial 80%, 50% e 30%, o que correspondeu, através de leitura feita pelo aparelho SKP 200, marca HANSATECH, a 21,92%, 50,36% e 60,13% de irradiância, respectivamente, e pleno sol (100%).

O experimento foi implantado em canteiros preparados com enxada rotativa. O espaçamento utilizado foi de 1,0 m entre linhas x 0,5 m entre plantas. Não foi realizada qualquer adubação, pois o solo já apresentava características de fertilidade satisfatória para a cultura (tabela 2).

Após o plantio, foi realizada cobertura morta com grama batatais (*Paspalus sp.*) a fim de controlar plantas invasoras e manter uma maior umidade no solo.

A análise do solo, mostrada na tabela 2, foi realizada no Departamento de Solos da UFLA, antes da instalação do experimento na área.

TABELA 2- Análise química do solo.

pH	P	K	Al	Ca	Mg	H + Al	SB	CTC	V	m	
								Efet. total			
H ₂ O	mg/dm ³					Cmolc/dm ³				%	
5,6	1,0	19,0	0,3	0,4	0,1	2,9	0,5	0,8	3,4	15,9	35,3

P e K: extrator Mehlich 1.

2.4 Características avaliadas

2.4.1 Crescimento

Ao final de 257 dias, o experimento foi colhido sempre no período de 7 às 10 horas da manhã, avaliando as seguintes características:

Altura (ALT)- Foi medida com trena, em cm, da região do colo até a porção apical do ramo mais alto.

Número de ramos (NRA)- Foi realizado através da contagem de todos os ramos que se originavam na região do colo da planta.

Número de nós (NNO)- O número de nós de cada planta foi contado verticalmente, iniciando-se na base do ramo principal até o ápice da planta, porém, quando um ramo lateral superava o ramo principal em altura, aquele era utilizado na contagem até ser atingida a máxima altura da planta.

Diâmetro (DIA)- Foi realizado com o auxílio de um paquímetro. A medida foi tirada da região do colo da planta.

Biomassa fresca da parte aérea (BFA)- Foram colhidas as partes aéreas das plantas, realizadas as avaliações anteriores, trituradas e pesadas em balança com sensibilidade de 0,1 kg.

Biomassa seca da parte aérea (BSA)- A parte aérea triturada foi acondicionada em sacos de papel, colocada em estufas de ventilação forçada até peso constante e pesada em balança com sensibilidade de 0,1 g.

Biomassa fresca da Raiz (BFR)- Foram colhidas as raízes através de valas feitas ao lado de cada planta, de onde as mesmas foram puxadas até o arranquio, sendo, em seguida, lavadas, colocadas entre folhas de papel para absorver o excesso de água e pesadas em balança com sensibilidade de 0,1 kg.

Biomassa seca de raiz (BSR)- As raízes foram acondicionadas em sacos de papel, colocadas em estufas de ventilação forçada até peso constante e pesadas em balança com sensibilidade de 0,1 g.

2.4.2 Características anatômicas

Após um período de 257 dias após implantação do experimento, foram coletados, ao acaso, ramos do terço superior, em cada tratamento, fixados em FAA 70% (JOHANSEN, 1940) e conservados em álcool etílico 70% (JENSEN, 1962).

Os cortes foram efetuados a mão livre, com o auxílio de uma lâmina de barbear com inclusão do material em peciolo de embaúba, sendo estes submetidos à clarificação em solução de hipoclorito de sódio a 20% do produto comercial, por um período de 3 a 5 minutos, seguido de três lavagens em água destilada. O material foi, em seguida, neutralizado com solução de ácido acético a 1% por um minuto, repetindo-se as lavagens. A coloração foi efetuada ao processo de dupla coloração com safranina-azul de astra (BUKATSH, 1972). Posteriormente, foram montadas lâminas semi-permanentes com água glicerizada e feita lutagem com esmalte. Em seguida, as lâminas foram observadas ao microscópio e fotomicrografadas.

2.4.3 Extração e determinação do rendimento de óleo essencial por arraste a vapor

O óleo essencial foi obtido pela técnica arraste a vapor d'água, no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFLA. As partes aéreas foram colhidas, picadas, sendo em seguida transferidas para estufa com ventilação forçada, a uma temperatura máxima de 35 °C, até massa constante. Uma amostra de 100 g de massa seca foi transferida para um balão de três bocas (de 1 L de capacidade), por onde passaria o vapor e ocorreria o arraste.

Em um teste preliminar, 1 L de hidrolato foi particionado com diclorometano e pentano a fim de padronizar o melhor solvente para proceder as

demais análises dos diferentes tratamentos. Nas demais análises, também foi coletado 1 L de hidrolato, dividido em duas porções de 500 mL e cada porção foi submetida à separação com diclorometano (290 mL dividido em 4 vezes); reuniram-se as frações orgânicas, adicionou-se sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e levou ao evaporador rotatório, evaporou-se todo o solvente, transferiu-se o produto obtido para um frasco de vidro, que foi deixado em estufa até 35 °C para completa evaporação do diclorometano, até peso constante. A massa do óleo obtido foi, finalmente, determinada.

2.4.4 Análise por CG/MS do óleo essencial.

As análises químicas do óleo essencial de *B.trimera* foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM).

2.5 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições, cada uma formada por 10 plantas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à morfologia externa, as plantas apresentaram grandes diferenças na largura das alas. O maior nível de irradiância (100%) reduziu a largura das mesmas (Fig. 1 A); com a diminuição para 60% de irradiância, houve um aumento na largura (Fig. 1 B), que foi ainda mais pronunciado para as plantas cultivadas a 20% (Fig. 1 C). Como a espécie em estudo é uma planta áfila, consideramos as alas com função de folha, portanto os resultados encontrados estão de acordo com Castro, Alvarenga e Gomide (1996), para *Muntingia calabura*; Giloni (2000), em soja; Naves (1993), com *Sesbania*

sesbam; Souza, (1998), com *Plantago major*; Letchamo e Gosselin (1995), para *Thymus vulgaris*; e Atroch (1999), para *Bauhinia forficata*.

Foram verificadas diferenças também na coloração das plantas, que a 100% de irradiância apresentaram coloração verde brilhante, enquanto que as plantas cultivadas sob 20% de irradiância, apresentaram uma coloração verde pálida.

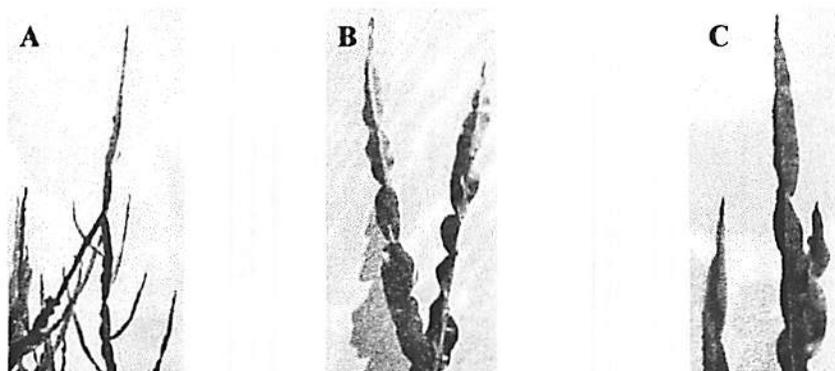


Figura 1-Ramos de plantas cultivadas sob 100% (A), 60% (B) e 20% (C) de irradiância, aos 257 dias de cultivo. UFLA, Lavras, 2001.

Quanto à arquitetura da planta, as cultivadas a 100% de irradiância eram totalmente eretas, enquanto as cultivadas sob 20% de irradiância apresentaram tipo de crescimento prostrado (Figura 2). Letchamo e Gosselin (1996), trabalhando com tomilho, observaram resultados semelhantes em relação à arquitetura e à coloração. Provavelmente isto se deve à maior altura das plantas cultivadas a 20% de irradiância (1,84 m), comparadas com as plantas crescidas a 100% de irradiância (1,31 m), e/ou a uma maior deposição de lignina, formando um cordão esclerenquimatoso, que foi observado apenas nas plantas cultivadas a 100% de irradiância.

Em relação a morfologia interna, ala e ramo das plantas de carqueja amarga (*Baccharis trimera*) apresentaram modificações estruturais proporcionadas pelo nível de irradiância. Quanto à região mediana da ala, as

epidermes em secção transversal são uniestratificadas, as células são retangulares, a maioria alongada no sentido radial: mostram camada de cutícula mais espessa nas plantas cultivadas a 100% de irradiância em relação às cultivadas a 20% de irradiância. Ambas as epidermes apresentaram tricomas simples, pluricelulares e tricomas claviformes.

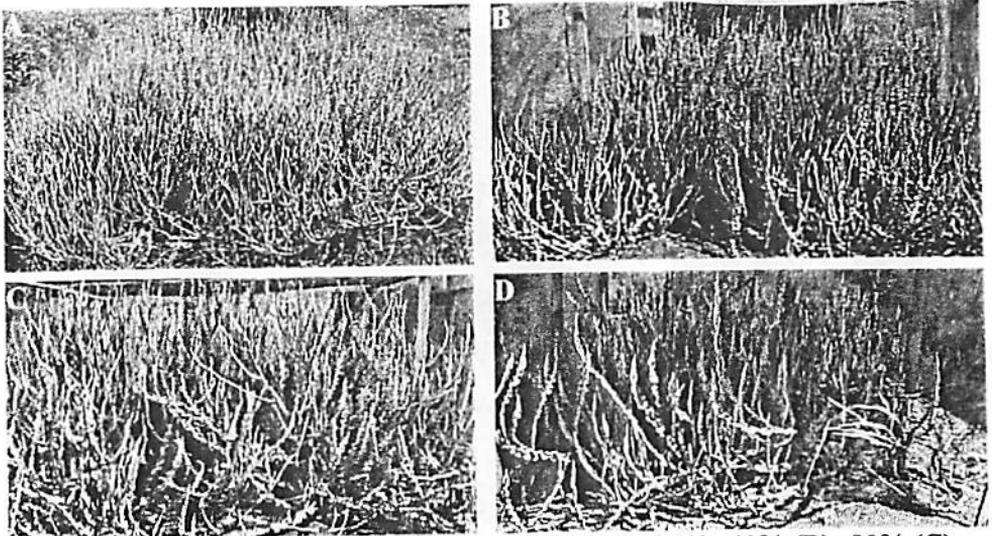


FIGURA 2-Plantas com 257 dias, cultivadas sob 100% (A), 60% (B), 50% (C) e 20% (D) de irradiância. UFLA, Lavras, 2001.

Na secção transversal da região mediana, observou-se, nas plantas cultivadas sob 20% de irradiância, um parênquima paliçádico bisseriado em ambas faces, com uma disposição mais compacta do extrato externo. As células que compõem os extratos paliçádicos internos são mais curtas, podendo assemelhar-se aos elementos do parênquima esponjoso, que se mostrou constituído geralmente por 4 extratos de células de secção arredondada, deixando entre elas espaços intercelulares de forma e dimensão variáveis; então a lâmina é chamada de isobilateral ou isolateral (Figura 3 A). Nas plantas

cultivadas a 100% de irradiância, o mesofilo apresenta o parênquima paliçádico constituído por 3 estratos de células em ambas faces; o parênquima esponjoso por 2 a 3 estratos de células de secção arredondada compactado, com um número bem reduzido de espaços intercelulares em relação às plantas cultivadas a 20% de irradiância (Figura 3 B). O mesofilo das plantas cultivadas sob 20% de irradiância apresentou-se mais delgado, especialmente com relação ao tecido paliçádico. Resultados semelhantes foram observados por Whatley e Whatley (1982); Castro et al. (1998). Estas diferenças, devido ao arranjo das células do mesofilo, são um importante fator que aumenta a eficiência fotossintética, sendo, portanto, um aumento de um sistema de espaços intercelulares no mesofilo o que facilita as trocas gasosas. Estas observações indicam grande plasticidade morfológica das folhas desta espécie, em função dos níveis de irradiância as quais foram submetidas.

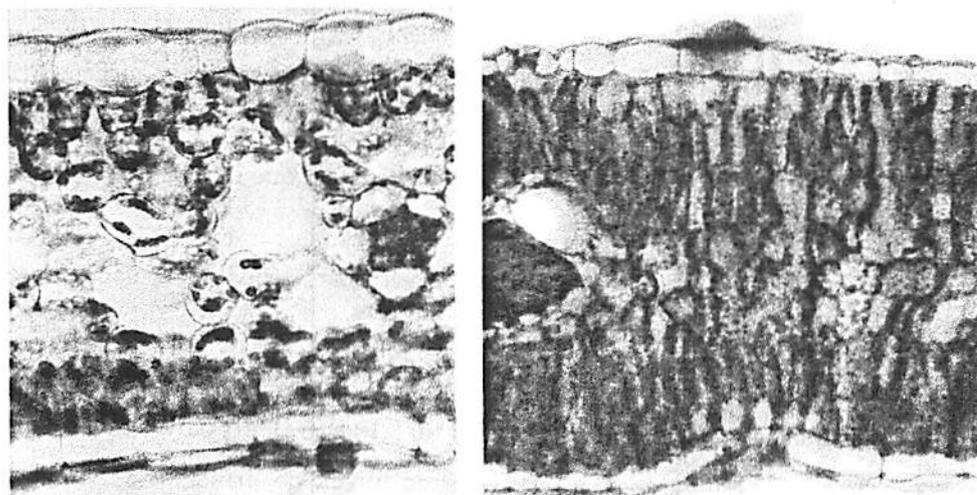


Figura 3-Secção transversal da região mediana da ala, evidenciando organização dos parênquimas das plantas cultivadas sob 20% (A) e 100% (B) de irradiância. UFLA, Lavras, 2001.

O sistema vascular apresentou-se constituído por feixes do tipo colateral, estando associado a eles canais secretores. Os feixes têm porção floemática e xilemática guamecida por um cordão de fibras lignificadas e estão envolvidos por bainha parenquimatosa.

A epiderme do ramo é formada por uma camada de células e apresenta-se com uma continuidade do revestimento das alas, também foi observada a presença de tricomas simples, pluricelulares e tricomas claviformes, como observados para as alas. A região cortical demonstrou também, diferenças nas estruturas. Nas plantas cultivadas a 100% de irradiância (Fig. 4), acima do canal, observou-se um cordão esclerenquimatoso, enquanto, nas cultivadas em 20% de irradiância, não foi observado (Fig. 5). A região cortical é constituída por um clorênquima, com 3-5 camadas de espessura, que se dispõe como uma bainha descontínua. Essa descontinuidade é resultante da presença de um colênquima. A endoderme foi observada em toda a secção do ramo. Segundo Hamberlant (1928), funcionalmente, a endoderme, além de constituir uma proteção mecânica para o sistema condutor, representa, também, uma barreira entre o tecido vascular e o córtex, limitando a passagem de substâncias, que são transportadas pelos feixes vasculares

Quanto à altura das plantas, podemos verificar, através dos dados da tabela 1, que a medida que aumentaram os níveis de irradiância, foram observadas reduções significativas na altura das plantas. Estes resultados parecem contradizer aqueles obtidos por Auken e Bush (1990) para *Baccharis neglecta*. Segundo estes, com a elevação do nível de irradiância, foram observados aumentos significativos na altura das plantas, mas quando verificamos as intensidades avaliadas por esses autores, concluímos que as mesmas foram muito reduzidas, de $53 \mu\text{M}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a $611 \mu\text{M}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, insuficientes para causar resposta típica de redução de altura. Nas condições em que foi

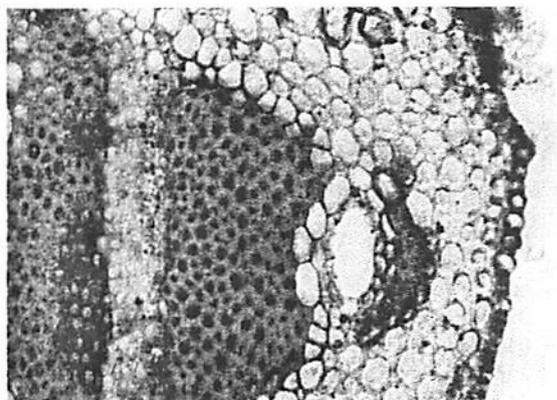


FIGURA 4- Ramo, secção transversal, região cortical, epiderme, colênquima, células lignificadas guarnecendo canal secretor e endoderme de plantas aos 257 dias de cultivo a 100% de irradiância. UFLA, Lavras, 2001.

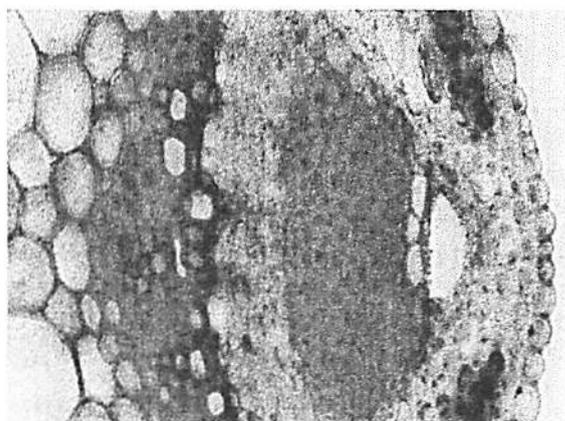


FIGURA 5- Ramo, secção transversal, região cortical, epiderme, colênquima, canal secretor e endoderme de plantas aos 257 dias de cultivo a 20% de irradiância. UFLA, Lavras, 2001.

desenvolvido o presente trabalho, ou seja, clima tropical, as intensidades de irradiâncias são bem mais elevadas. Os resultados foram concordantes com aqueles encontrados por Atroch (1999) para *Bauhinia forficata*; Castro, Alvarenga e Gomide (1996) para *Muntingia calabura*; Naves (1993) com *Sesbania sesbam* e *Cybistax antisyphilitica*; e Letchamo e Gosselin (1996) com *Thymus vulgaris*.

TABELA 1. Efeito do nível de irradiância na altura (ALT), número de ramos (NRA), número de nós (NNO), diâmetro (DIA), biomassa fresca aérea (BFA) e seca aérea (BSA) e Biomassa fresca (BFR) e seca de raiz (BSR), teor (TOE) e conteúdo de óleo essencial (COE), em plantas de carqueja aos 257 dias de cultivo em diferentes níveis de irradiância. UFLA, LAVRAS, 2001.

Carac.	Irradiância (%)			
	20 ^Z	50	60	100
Avaliadas				
ALT (m)	1,84 A ^Y	1,55 B	1,47 BC	1,31 C
NRA	8,60 B	9,69 AB	12,50 AB	14,30 A
NNO	29,80 B	33,73 AB	33,50 AB	34,50 A
DIA (cm)	1,19 B	1,62 A	1,56 A	1,76 A
MFA (g)	553,39 C	1258,87 B	1245,47 B	2172,57 A
MSA(g)	166,62 C	412,51 B	455,54 B	690,75 A
MFR (g)	26,57 C	88,38 B	112,68 B	207,88 A
MSR (g)	11,98 C	35,24 B	49,92 B	82,10 A
TOE (%)	0,0358 A	0,0342 A	0,0460 A	0,0591 A
COE (g/planta)	0,0596 B	0,141 AB	0,21 AB	0,408 A

^Z Medição estimada, correspondendo, respectivamente, a 21,92, 50,36 e 60,13%, em relação à exposição a pleno sol, medida pelo quantômetro (SKP 200, marca HANSATECH). ^YMédias seguidas pela mesma letra dentro de cada característica avaliada não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Analisando os dados da tabela 1, observa-se que para o número de ramos, houve diferenças significativas apenas para os níveis de irradiância extremos, onde plantas cultivadas sob 20% de irradiância produziram número de ramos inferior as plantas cultivadas a pleno sol, e os demais níveis de irradiância não diferiram entre si. Resultados semelhantes foram obtidos por Letchamo e Gosselin (1996). Estes, trabalhando com tomilho, encontraram maior número de brotos em plantas cultivadas sob maior nível de irradiância.

Igualmente ao número de ramos, o número de nós apresentou diferenças estatisticamente superiores apenas em plantas cultivadas em maior nível de irradiância, comparado ao menor nível. As plantas cultivadas a 100% de irradiância tiveram um entrenó mais curto em relação às plantas cultivadas com 20% de irradiância, apesar destes apresentarem uma maior altura.

Para o diâmetro do caule, apenas o nível de irradiância de 20% de luz apresentou menor diâmetro, os demais não diferiram entre si. Segundo Naves (1993), o diâmetro do caule pode ser um bom indicador da capacidade assimilatória líquida da planta. Resultados semelhantes foram encontrados por Auken e Bush (1990), para *Baccharis neglecta*. Castro, Alvarenga e Gomide (1996), trabalhando com *Muntingia calabura*, observaram que quanto maior o nível de irradiância, maior o diâmetro das plantas produzidas. Pesquisas de Scalon e Alvarenga (1993), com *Platycyamus regnelli* e Atroch (1999), com *Bauhinia forficata* demonstraram não haver diferenças entre níveis de 50% a 100%, o que também aconteceu no presente trabalho.

Quanto à produção de biomassa fresca e seca da parte aérea, observa-se que aumentaram significativamente com a elevação do nível de irradiância; apenas os dois níveis intermediários não diferiram entre si. As plantas cultivadas sob maior intensidade apresentaram acúmulo de biomassa seca mais de quatro vezes superior às cultivadas a 20% de irradiância. Portanto, esta espécie responde à elevação no nível de irradiância com aumento no acúmulo de

biomassa, demonstrando ser uma espécie de sol. Resultados semelhantes foram obtidos por Auken e Bush, (1990), para *Baccharis neglecta*, Castro, Alvarenga e Gomide (1996), para *Muntingia calabura*; Souza (1998), para *Plantago major*; Letchamo et al. 1994; Letchamo e Gosselin (1995), para *Thymus vulgaris*; Ventrela e Ming (2000), para *Lippia alba*. Enquanto que Scalon e Alvarenga (1993), para *Platycyamus Regnelli*, e Atroch (1999), para *Bauhinia forficata*, verificaram não haver diferenças entre níveis de 50% a 100% de irradiância, o que não aconteceu no presente estudo, no qual o nível de irradiância de 100% diferiu dos níveis de 50 e 60%, sendo superior a estes dois.

Em relação à produção de biomassa subterrânea, o comportamento foi idêntico ao da parte aérea, tanto em biomassa fresca quanto seca. A 20% de irradiância, as plantas apresentaram acúmulo de biomassa inferior, os níveis de irradiância de 50 e 60% apresentaram valores medianos, não diferindo entre si, e o nível de 100% produziu plantas com maior acúmulo de biomassa subterrânea.

Para extração do óleo essencial, constatou-se que o diclorometano foi o melhor. Com este, houve um rendimento de 0,033 g/500 mL de hidrolato, diferindo do pentano, para o qual se obteve-se 0,025 g/500 mL de hidrolato.

Não ocorreram diferenças significativas no teor de óleo essencial entre os diferentes níveis de irradiância estudados, e sim, apenas uma tendência de elevação do teor em maior nível de irradiância (Tabela 1). Na literatura não foram encontrados trabalhos estudando o nível de irradiância sobre o rendimento de óleos essenciais em *B. trimera*, ou espécie deste gênero; por isso, os resultados obtidos foram comparados com plantas de outros gêneros. Com relação à média dos tratamentos de rendimento de óleo essencial, estes foram bastante inferiores aos obtidos em trabalhos anteriores, como para *B. retusa*, para o qual foi obtido um teor de 0,3% (Silva e Grotta, 1971); 0,2% para *B. articulata*, *B. myrtilloides* e *B. rufenses* (Zunino, 1998), 0,3% para *B. articulata*

e *B. trimera* com flores masculinas e 0,1% para *B. trimera* com flores femininas (Siqueira, et al., 1985).

Além de vários fatores, como temperatura, altitude, fertilidade do solo, localidade, época de colheita, estágio fisiológico, fisiologia pós-colheita, método de extração e outros, que podem influenciar no teor de óleo essencial, um fato que não podemos deixar de mencionar foi o intenso período chuvoso, que ultrapassou 15 dias, na ocasião da colheita. Segundo Letchamo e Gosselin (1996), a água reduz a quantidade de cera epicuticular, podendo aumentar a volatilização do óleo, o que acreditamos ter ocorrido no presente trabalho.

Resultados obtidos por Letchamo et al. (1994); Letchamo e Gosselin (1995) e Letchamo e Gosselin (1996), com plantas de tomilho; e Ventrela e Ming (2000) com *Lippia alba*, demonstraram que plantas submetidas a um maior nível de irradiância tiveram aumentado o número de glândulas oleíferas, a carga de cera epicuticular, e conseqüente elevação no teor de óleo essencial. Isto demonstra que diferentes espécies respondem de maneira distinta ao nível de irradiância na produção de óleos essenciais.

Mesmo que não tivesse ocorrido tendência de aumento no teor de óleo com o acréscimo no nível de irradiância, o efeito altamente significativo na produção de biomassa, conseqüentemente o conteúdo de óleo, seria muito mais elevado nos maiores níveis de irradiância. Em uma tentativa de estimar o rendimento de óleo neste trabalho, considerando o espaçamento utilizado, teríamos 20.000 plantas/ha, que produziriam em torno de 3.332 kg/ha, rendendo 1,193 kg/ha de óleo essencial, no nível de irradiância de 20%, enquanto, a pleno sol, 13.815 kg/ha de biomassa seca, o que renderia aproximadamente 8,164 kg/ha de óleo essencial. Isto equivale a cerca de mais de 7 vezes o rendimento em óleo obtido de plantas a pleno sol, em relação às plantas submetidas a 20% de irradiância.

Análise por CG/MS do óleo essencial de *B.trimera*

Os resultados das análises químicas do óleo essencial de *B.trimera* estão mostrados nas Figuras 7, 8 e 9 e Tabela 2. A composição do óleo sofreu alterações quantitativas e qualitativas em função das variações de intensidade de irradiância.

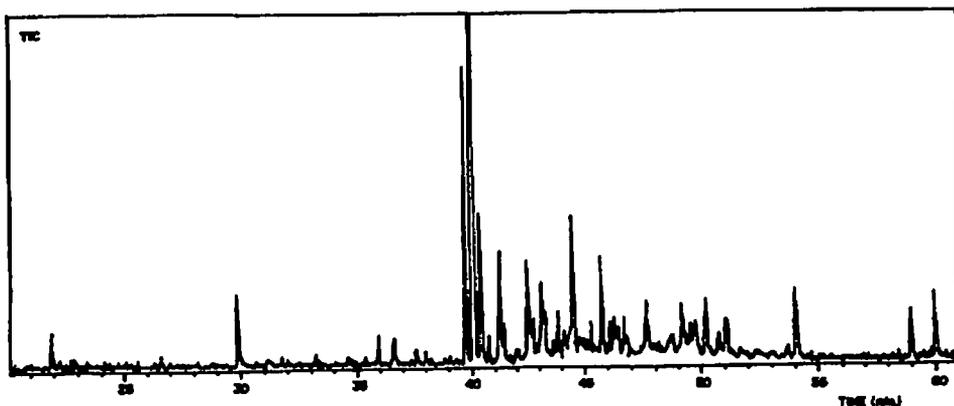


FIGURA 7- Espectro de massa obtido do óleo essencial de plantas de *B. trimera*, cultivadas a 20% de irradiância. UFLA, LAVRAS, 2001.

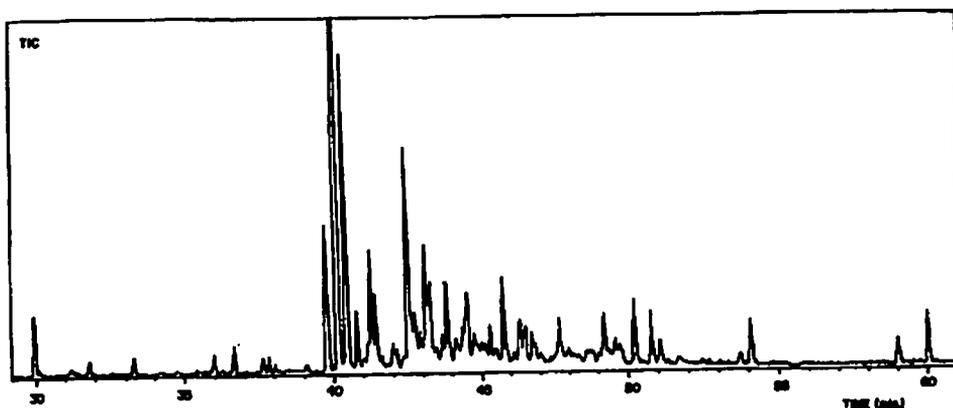


FIGURA 8- Espectro de massa obtido do óleo essencial de plantas de *B. trimera*, cultivadas a 50% de irradiância. UFLA, LAVRAS, 2001.

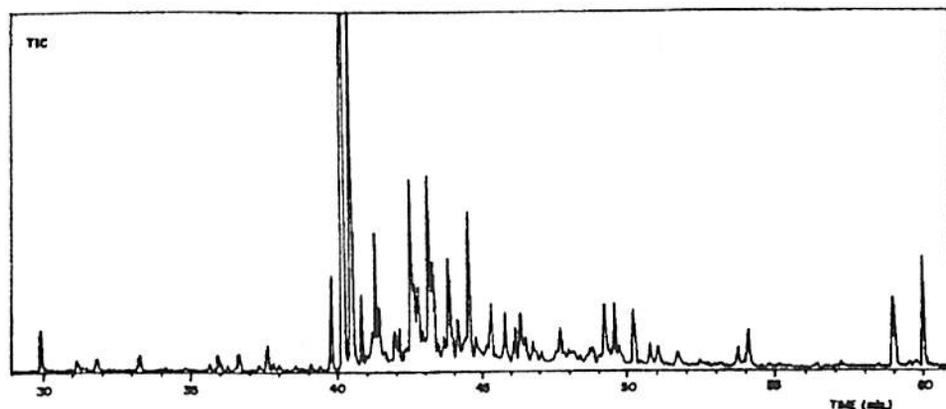


FIGURA 9-Espectro de massa obtido do óleo essencial de plantas de *B. trimera*, cultivadas a 100% de irradiância. UFLA, LAVRAS, 2001.

TABELA 2-Análise por CG do óleo essencial de *B. trimera* aos 257 dias de cultivo em diferentes intensidades de irradiância. UFLA, LAVRAS, 2001.

Substâncias encontradas	Tempo de retenção (min)	Irradiância (%)		
		20	50	100
		Teores (%)		
α -terpineol	21,98	1,00	---	---
Acetyl eugeniol	29,91	2,68	2,62	2,59
Palustrol [Ledum]	39,78	11,00	4,67	4,68
Spathulenol	40,121	28,47	27,40	27,45
Globulol	40,80	---	2,14	2,11
Epiglobulol	40,42	6,44	11,13	11,10
Veridiflorol	41,26	4,80	4,08	4,01
Aromadrennenepoxide [I]	42,49	4,77	8,25	8,26
Aromadrennenepoxide [II]	41,43	---	3,01	3,00
Guaiol	43,12	4,29	5,23	5,26
Phytol	58,97	3,50	---	---
Compostos totais identificados (%)		66,95	68,53	68,46

Os compostos majoritários encontrados foram spatulenol, palustrol [ledum] e epiglobulol. Os teores do spatulenol foram semelhante, 28,47%;

27,40% e 27,45%, para as diferentes irradiâncias, 20%, 50% e 100%, respectivamente. Os teores do palustrol variam com as diferentes intensidades de irradiâncias. O maior teor (11%) foi obtido na menor intensidade de irradiância, enquanto, para as maiores, foi observada uma significativa diminuição, 4,67% e 4,68%, a 50% e 100% de irradiância, respectivamente. O composto epiglobulol também sofreu variações devido às diferentes intensidades de irradiâncias. Valores semelhantes foram obtidos para as irradiâncias de 50% e 100%, sendo estes de 11,13% e 11,10%, respectivamente. No entanto, uma variação significativa no teor, 6,44% da composição do óleo, foi obtida para 20% de irradiâncias.

Foi também observada, nas maiores intensidades de irradiância, a presença de aromadrennenpoxide [I], com teores de 8,25% e 8,26%, e apenas 4,77% na menor irradiância. Já o composto aromadrennenpoxide [II] não foi encontrado na menor intensidade de irradiância, apenas nas maiores, 50% e 100%, apresentando teores de 3,01% e 8,26%, respectivamente. Resultados semelhante foram obtidos para o composto globulol, com teores de 2,14% e 2,11%, nas intensidades de 50% e 100% de irradiâncias, respectivamente, não sendo detectado na intensidade de 20%.

As presenças dos compostos α -terpineol e phytol só foram verificados na intensidade de 20%, com teores de 3,50% e 1,0%, respectivamente. Quanto aos compostos acetil eugenol, veridiflorol e guaiol, foram observadas poucas variações nas diferentes intensidades de irradiâncias. O acetil eugenol contribuiu com 2,68%; 2,62% e 2,59%; o veridiflorol com 4,80; 4,08 e 4,01; e o guaiol com 4,29; 5,23 e 5,26, a 20%, 50% e 100% de irradiância, respectivamente.

Outros compostos presentes no óleo não puderam ser identificados, todavia estes são minoritários.

Além das variações nos teores dos compostos da carqueja devido as variações das intensidades de irradiância, podemos observar alterações quando

comparamos diferentes espécies. As presenças de Spatulanol e globulol foram descritas em *B. salicifolia*, com teor de 1,19% e 0,33%, respectivamente (Loayza et al., 1995). O mesmo composto também foi detectado em concentrações de 2,0%, 3,5% e 0,1%, em *B. articulata*, *B. myrtilloides* e *B. rufescens*, respectivamente. Foi verificado também, nestas espécies, α -terpenol, mas apenas em quantidades traços, ou seja, menos que 0,1% (Zunino et al., 1998).

Os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios, através dos quais se pode observar que a carqueja demonstrou responder positivamente ao aumento no nível de irradiância com elevação no rendimento de óleo essencial. Portanto, para implantação de um cultivo comercial, as plantas de carqueja não devem ser cultivadas em sombreamento, e sim a pleno sol, para que ocorra a maximização do rendimento de óleo essencial por área plantada.

4. CONCLUSÕES

- As plantas cultivadas no maior nível de irradiância, comparadas às cultivadas a 20% de irradiância, apresentaram diferenças quanto à organização das células do mesófilo, aumentando a eficiência fotossintética, demonstrando grande plasticidade fenotípica desta espécie.

- O nível de irradiância influenciou significativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas. Foi demonstrado que a carqueja responde positivamente ao aumento de irradiância com redução da altura, aumento do número de ramos, nós, diâmetro e produtividade de biomassa da parte aérea e subterrânea.

- O aumento do nível de irradiância causou tendência de acréscimo no teor de óleos essenciais, e elevou consideravelmente o conteúdo por planta.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ★ ATROCH, E.M.A.C. Aspectos fisiológicos, anatômicos e biossíntese de flavonóides em plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link. Submetidas a diferentes níveis de irradiância. Lavras: UFLA, 1999. 62p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- AUKEN, O.W.V.; BUSH, J.K. Influence of light levels, soil nutrients, and competition on seedling growth of *Baccharis neglecta* (Asteraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, New York, v.117, n.4, p.438-444, 1990.
- BUKATSH, F. Beneskensgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v.61, p.255, 1972.
- ★ CASTRO, E.M.; ALVARENGA, A.A.; GOMIDE, M.B. Crescimento e distribuição de matéria seca de mudas de calabura (*Muntingia calabura* L.) submetidas a três níveis de irradiância. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.20, n.3, p.357-365, jul./set. 1996.
- 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.
- GILONI, P.C. Crescimento e produção de dois cultivares e três linhagens de soja sob três níveis de sombreamento, em Entre Rios – Guarapuava, PR.. Viçosa: UFV, 2000. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- HABERLANDT, G. *Physiological plant anatomy*. London: Macmillan and Company. 1928. 777p.
- JENSEN, W.A. *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408p.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

- ✱ LETCHAMO, W.; GOSELIN, A. Effects of supplemental lighting and soil water levels on growth, essential oil content and composition of two thyme (*Thymus vulgaris* L) clonal selections. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v.75, n.1, p.231-238, Jan. 1995.
- ✱ LETCHAMO, W.; GOSELIN, A. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. *Journal of Horticultural Science*, Kent, v.71, n.1, p.123-134, 1996.
- LETCAMO, W.; MARQUARD, R.; HOLZL, J.; GOSELIN, A. Effects of supply and light intensity on growth and essential oil of two *Thymus vulgaris* selections. *Angewandte Botanik*, Berlin, v.68, p.83-88, 1994.
- LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F. I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, Oxford, v.38, n.2, p.381-389, Feb. 1995.
- MAFFEI, M.; CANOVA, D.; BERTEA, C.M.; SCANNERINI, S. UV-A effects on photomorphogenesis and essential-oil composition in *Mentha piperita*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Lausanne, v.52, p.105-110, 1999.
- MAFFEI, M.; SCANNERINI, S. Photomorphogenic and chemical responses to blue light in *Mentha piperita*. *Journal Essential Oil Research*, Wheaton, v.11, p.730-738, 1999.
- ✱ NAVES, V.L. Crescimento, distribuição de matéria seca, concentração de clorofilas e comportamento estomático de mudas de três espécies florestais submetidas a diferentes níveis de radiação fotossinteticamente ativa. Lavras: UFLA, 1993. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- SCALON, S.P.Q.; ALVARENGA, A.A. Efeito do sombreamento sobre a formação de mudas de pau-pereira (*Platycyamus regnelli* Benth). *Revista Árvore*, Viçosa, v.17, n.3, p.x-y, set./dez. 1993.

- SILVA, J.B.; GROTTA, A.S. Anatomia e óleo essencial de *Baccharis retusa* D.C. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v.9, n.2, p.321-326, 1971.
- SIQUEIRA, N.C.S.; SILVA, G.A.A.B.; ALICE, C.B.; NITSCHKE M. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. e *Baccharis trimera* (Less.) DC (Compositae), espécies espontâneas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.36-39, 1985.
- SOUZA, M.M. de. Crescimento e metabolismo secundário em duas condições de luminosidade e cultura in vitro de *Plantago major* L. Viçosa: UFV, 1998. 106p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)
- VENTRELLA, M.C.; MING, L.C. Produção de matéria seca e óleo essencial em folhas de erva-cidreira sob diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.18, p.972-974, 2000. suplemento.
- WHATLEY, J.M.; WHATLEY, F.R. *A luz e a vida das plantas*. [tradução Gil Martins Felipe]. São Paulo: EPU: Ed. da Universidade de São Paulo, 1982. 101p.
- YAMAURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. *Phytochemistry*, Oxford, v.28, n.3, p.741-744, Mar. 1989.
- ZUNINO, M.P.; NEWTON, M.N.; MAESTRI, D.M.; ZYGADLO, J.A. Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Medica*, Stuttgart, v.64, n.1, p.86-87, 1998.

CAPÍTULO 4

CRESCIMENTO DA PLANTA E RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL EM [*Baccharis trimera* (Less.) DC.], EM CASA-DE-VEGETAÇÃO, COM ADUBAÇÃO ORGÂNICA E QUÍMICA.

RESUMO

SILVA, Fabiano Guimarães. Crescimento da planta e rendimento de óleo essencial em [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.], em casa de vegetação, com adubação orgânica e química. LAVRAS: UFLA, 2001. 100p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

Com o objetivo de avaliar a influência do esterco de curral e adubo químico no crescimento e rendimento de óleos essenciais, foi implantado experimento, em casa-de-vegetação, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais/DAG, utilizando seedlings com 95 dias após o plantio das sementes em substrato Plantmax®. As plantas foram cultivadas em 5 níveis de esterco de curral, 0%, 5%, 10%, 20% e 30%, em ausência e presença de adubo químico. Após 125 dias de implantação, o experimento foi avaliado através das características altura, número de ramos e nós, biomassa e teor de óleo essencial. Para avaliar o rendimento de óleo essencial, as partes aéreas foram trituradas, secas em estufa com ventilação forçada, à temperatura máxima de 35 °C, onde foi utilizado 70 g. O material através da destilação no aparelho de Clevenger modificado, no Laboratório de Química Orgânica, por arraste a vapor, foi extraído em 1 L de hidrolato, lavado com diclorometano, retirado o excesso da umidade com sulfato anidro de magnésio, levado ao evaporador rotatório, e o

* Comitê Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Drª. Maria das Graças Cardoso - UFLA, MSc. Sérgio Araújo Figueiredo - UFRRJ.

solvente foi completamente seco em estufa à temperatura máxima de 35 °C, e sua massa foi determinada. De acordo com o resultados, conclui-se que a carqueja responde positivamente à adubação em relação à produção de biomassa. Em relação ao teor de óleo essencial, quando não se utilizou nenhuma adubação, foi constatada tendência de maior teor, resultados estes que deverão ser confirmados em experimentos futuros. Entretanto, mesmos que estes resultados forem confirmados, este aumento foi superado pelo aumento altamente significativo de biomassa, causando um maior conteúdo de óleo, em plantas cultivadas sob maior nível de adubação orgânica.

ABSTRACT

SILVA, Fabiano Guimarães. Plant growth and yield of essential oil from [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] in greenhouse, with manure and chemical fertilization. LAVRAS: UFLA, 2001. 128p. (Dissertation - Plant Physiology)*

With a view to evaluating the influence of the content of manure and chemical fertilizer on growth and yield of essential oils, an experiment was established in greenhouse in the Plant Tissue Culture and Medicinal Plant Laboratory utilizing 95 days old seedlings after planting the seeds on Plantmax substrate. The plants were grown at 5 levels of manure fertilizer, 0%, 5%, 10%, 20% and 30% in the absence and presence of chemical fertilizer. After 125 days of establishment, those characteristics height, number of branches and nodes, biomass and essential oil content were evaluated. To evaluate the essential oil yield the shoots were, dried in air-forced oven at maximum temperature of 35 °C where 70g were utilized. Through distillation in the modified Clevenger apparatus, by stem draft, it was extracted in 1 L of hydrolate, washed with dichloromethane, the moisture excess removed with magnesium anhydrous sulfate, taken to the rotary evaporator and the solvent was completely dried in oven at the maximum temperature of 35 °C and its mass determined. As regards the essential oil content when no fertilization was utilized, trend to increased content was found, these results will have to be confirmed in future experiments but even they will, this increase was overcome by the highly significant increase of biomass causing a greater oil content in plants grown under higher level of manure fertilization.

* Guidance Committee: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Dr^a. Maria das Graças Cardoso - UFLA, MSc. Sérgio Araújo Figueiredo - UFRRJ.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Com a finalidade de avaliar a influência de esterco bovino sobre produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial em *Achillea millefolium*, Scheffer, Junior e Koehler (1993) verificaram aumentos altamente significativos com a aplicação de $3,0 \text{ kg/m}^2$ de esterco, de 2,85 vezes comparado à ausência deste. Quanto ao rendimento de óleo essencial, também verificou-se um aumento de 4,08 vezes, quando comparado à ausência. Verificaram também aumentos altamente significativos no teor de P das estruturas florais e de 150% no teor de P do solo adubado com $3,0 \text{ kg/m}^2$. Concluíram que o aumento na produção de biomassa e óleos essenciais foi provavelmente devido à maior quantidade de P no solo disponível para as plantas.

Pesquisas de Ming (1994) utilizando *Lippia alba*, mostraram que maiores doses de esterco resultaram em maiores rendimentos de biomassa, mostrando que a incorporação de matéria orgânica no solo resultou em melhoria nos aspectos químicos, físicos e biológicos, com grande resposta no crescimento e desenvolvimento vegetativo da cultura. Com relação ao teor de óleo essencial, verificou-se que não ocorreram diferenças entre as doses de 0, 1 e 2 kg.m^{-2} de esterco, e a dose de 4 foi estatisticamente igual à de 8 kg.m^{-2} . Os decréscimos de 4 a 8 kg.m^{-2} , inferiores às menores doses de esterco, mostraram uma relação inversa em relação à biomassa. Este aumento no teor de óleos essenciais produzidos por esta espécie, maior em plantas menos adubadas, apesar de apresentar uma contradição, refletiu uma resposta fisiológica a uma variação ambiental (nutrientes no solo), ou seja, o óleo cumpre um papel fundamental na defesa da planta, com maior sintetização quando em ambiente menos favorável. Quando em ambiente mais favorável, a planta não teria tanta necessidade de se defender, diminuindo a produção de óleo.

Estudando os efeitos de adubo orgânico e a combinação deste com fertilizantes NPK em plantas de *Vetiveria zizanioides* sobre produção de raiz, Dethier et al. (1997) constataram, em relação ao rendimento e qualidade (composição química e características deolfato), que tratamentos do solo aumentaram a produção de raízes de 1500 kg/ha, no controle, para 2400 kg/ha no tratamento com adubo orgânico, e a produção de raízes sempre aumentou com tratamento de adubo orgânico, associado ou não ao NPK. Em relação ao teor de óleo de raízes secas, foram observadas pequenas variações de 2,1 a 2,9%. O aumento significativo da produção de raízes propiciado pelo enriquecimento do solo levou a um maior rendimento de óleo expresso em L/ha, com uma produção máxima de 69 L/ha no tratamento com adubo orgânico e NPK. As características físico-químicas do óleo revelaram não haver diferenças significativas de acordo com os tratamentos nutricionais nas características de índice de refração, gravidade específica e valor ácido.

Em *Mentha arvensis* L, o teor de óleo apresentou tendência de redução com a aplicação de esterco, esterco e N P K, comparado à não aplicação deste. Rendimento de biomassa significativamente mais alto foi obtido com 40 t/ha de esterco e 120 kg de nitrogênio/ha. Visto que o teor de óleo não foi significativamente afetado pela aplicação de nitrogênio e esterco de curral, o aumento no rendimento de óleo poderia ser devido ao aumento na produtividade de biomassa (Singh, 1988).

A alta exigência em nitrogênio é conhecida para a cultura da menta (*Mentha piperita*). Para manter uma alta produtividade, são necessárias elevadas doses deste macronutriente, o que vem poluindo muito o solo; portanto, a fixação biológica de nitrogênio seria uma alternativa. Além da redução das pesadas adubações nitrogenadas, e a conseqüente redução dos custos de produção e poluição do lençol freático, o cultivo intercalar com uma leguminosa traria outras vantagens, como melhorar a sua capacidade química, física e

biológica do solo e reduzir pestes e doenças. Em menta, o consórcio com soja aumentou 90,91% o rendimento de óleo, alterou sua coloração de amarelo-pálido para amarelo-escuro no cultivo consorciado, comparado com a cultura sem adubação nitrogenada. Quanto à constituição química, nas plantas cultivadas com soja houve, em geral, aumentos nos teores de monoterpenos hidrocarbonados e compostos oxigenados, tais como 1,8-cineol, mentona e mentofurano, enquanto as porcentagens de mentol, isomentona e acetato de mentila diminuíram. Os resultados mostraram que esta prática aumenta os rendimentos de óleo, ficando, porém, abaixo dos cultivos com aplicações pesadas de nitrogênio. O incremento observado em menta não fertilizada, mas em consórcio com soja, é indicativo da disponibilidade melhorada de nitrogênio para plantas de menta (Maffei, 1999).

Estudando o efeito que o nitrogênio e o esterco de curral exercem sobre a produção de biomassa e óleos essenciais em davana (*Artemisia pallens*), (Asteraceae), Rao, Narayana e Rao, (1997) verificaram que o nitrogênio aumentou significativamente a produção de biomassa e óleos essenciais. A cultura respondeu à aplicação de esterco de curral apenas em uma localidade estudada. Quando comparada à não aplicação de esterco de curral, a dose de 15 MT/ha aumentou significativamente a produção de biomassa e óleos essenciais. A partir de 15 MT/ha, não houve diferenças para a dose de 30 MT/ha.

Mitchell & Farris (1996), estudando a taxa ótima do fertilizante nitrogênio em menta (*Mentha piperita*), concluíram que a adubação nitrogenada aumentou significativamente a produção de biomassa e óleo essencial. A temperatura também alterou a produção de biomassa e óleo essencial. No ano mais quente, produziu-se menos matéria seca e mais óleo. Este fenômeno não é raro em estudos sobre menta e pode ser atribuído à relação folha/caule da matéria seca influenciada pelo tempo.

Com o objetivo de estudar a resposta da *Mentha arvensis* L ao nitrogênio e fósforo sobre o potencial de rendimento e teor, incluindo a qualidade (teor de mentol), foi observado que o efeito do nitrogênio foi mais pronunciado que o do fósforo. O rendimento de biomassa aumentou com o aumento de nitrogênio e fósforo. O teor de óleo essencial da cultura aumentou significativamente com o aumento do nível de fósforo e nitrogênio. O rendimento de óleo essencial de menta se associou positivamente com a produção de biomassa e teor de óleo no caso de emprego dos nutrientes fósforo e nitrogênio. Embora os dados não tenham revelado diferenças significativas no teor de mentol devido à aplicação de nutrientes, ainda foi observado um aumento gradual com aumento das doses de nutrientes. O aumento de produção de biomassa seca sob altos níveis de fósforo pode ser atribuído à eficiência dos processos fisiológicos e metabólicos, resultando num intenso crescimento vegetativo da cultura (Munsi, 1992).

Udagawa (1995), estudando diferentes concentrações de N, P, K, Ca e Mg em solução nutritiva e o comportamento de plantas de dill (*Anethum graveolens*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), verificaram que a biomassa fresca e seca de folhas e a concentração de N, P, K, Ca e Mg em folhas e raízes de dill aumentaram com o aumento da concentração de nutrientes. A concentração total de óleos essenciais e de dois constituintes majoritários do óleo em folhas foram maiores em menores concentrações de solução nutritiva. Para o tomilho, a biomassa seca e fresca de folhas, concentração de N, P, K, Ca e Mg em folhas e raízes, e a concentração total de óleo essencial em folhas aumentaram com o aumento da concentração de nutrientes; porém, dois dos cinco constituintes majoritários deste óleo essencial, o γ -terpineno e timol, decresceram com o aumento da concentração de nutrientes na solução. Todavia, a concentração dos outros três constituintes majoritários, linalool, carvacrol e um constituinte desconhecido, foi aumentado com o aumento da concentração de nutrientes. Os

resultados sugerem que o teor e rendimento de óleos essenciais foram quase dependentes do crescimento da planta.

Com o objetivo de avaliar o efeito de fertilizantes sobre o rendimento e a variação dos constituintes do óleo essencial, em geranium (*Pelargonium graveolens* L' Hér. Ex Aiton), Rao et al. (1990) verificaram máximo rendimento de biomassa e óleo essencial com uma dose de nitrogênio de 120 kg/ha, enquanto a resposta de geranium ao P e K foi observada em uma localidade de altitude elevada; a resposta estava ausente nas outras duas localidades. Os teores de óleos essenciais não foram influenciados pela aplicação dos fertilizantes N, P e K. A resposta aos padrões de rendimento de biomassa à aplicação de N foi um reflexo da disponibilidade de nitrogênio presente no solo. Rendimento mais alto de biomassa, acoplado a uma melhor resposta de fertilizante nitrogenado adicionado, devido à baixa disponibilidade disponível no solo, produz um elevado rendimento total de biomassa em locais de elevada altitude. Rendimentos mais altos de óleo essencial em duas localidades foram devidos aos teores de óleo essencial mais elevados e aos rendimentos mais elevados de biomassa em tratamentos fertilizados com N.

Visando estudar taxas de aplicação de nitrogênio no rendimento da erva e óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martini*), foi constatado que aplicação de fertilizantes nitrogenados aumentou o rendimento de biomassa e óleo essencial em todas as colheitas. A planta parece comportar-se semelhantemente a outras culturas, para as quais o rendimento é o principal produto do crescimento vegetativo sob condições de competição da planta (Rao et al., 1985).

Em *mentha arvensis*, Maia (1994) verificou que a ausência de macronutrientes, como nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, reduziu significativamente a produção de biomassa fresca da planta inteira. Em relação ao óleo essencial, as proporções de limoneno, mentona, mentol e acetato de

metila do óleo foram totalmente alteradas pelas condições de nutrição da planta, evidenciando que o manejo de nutrientes pode ser utilizado para produção de óleos com diferentes proporções desses metabólitos.

O efeito de diferentes concentrações de zinco aplicado em menta (*Mentha arvensis*) foi estudado, verificando que a aplicação de zinco aumentou significativamente a produtividade de biomassa fresca e seca, partindo da ausência deste micronutriente até $0,05 \mu\text{g. mL}^{-1}$; a partir deste, houve decréscimo acentuado para as concentrações de $5,0$ e $10,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Em relação à concentração de óleo essencial, os maiores rendimentos foram obtidos nas duas maiores concentrações de Zn ($5,0$ e $10,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$); a concentração de mentol apresentou comportamento similar à produção de biomassa, com concentração ótima a $0,05 \mu\text{g. mL}^{-1}$; a partir desta, ocorreram decréscimos significativos. Houve uma forte correlação linear da concentração de Zn com a concentração de óleo, indicando influência da concentração de zinco foliar sobre a concentração do óleo (Misra e Sharma, 1991).

O objetivo de avaliar a influência do nível de nutrientes no crescimento e rendimento de óleo essencial em carqueja foi devido à inexistência de estudos neste sentido, uma vez que não existem cultivos comerciais desta planta, ficando toda a produção exclusivamente através do extrativismo, em que as plantas são coletadas em solos dos mais variados níveis de fertilidade. Pretende-se, com este trabalho, verificar se a planta responde a maiores níveis de nutrientes não apenas na produção de biomassa, mas também em rendimento e qualidade do óleo, a fim de maximizar o rendimento de óleo, de maior qualidade e com características mais homogêneas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo e material vegetal

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, no período de 28 de abril a 31 de setembro de 2000, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais/DAG da Universidade Federal de Lavras, situada a 918,87 metros de altitude, com latitude de 21° 14' sul e longitude de 45° oeste.

A partir de seedlings de 94 dias após o plantio das sementes em substrato Plantmax® em casa-de-vegetação, germinados em bandejas de isopor, com as seguintes características: 30,85 cm de altura, 1,25 ramos/planta, 8,75 nós/planta e massa fresca de 1,45 g, foi implantado experimento em vasos plásticos de 3 litros dentro de casa de vegetação.

O substrato utilizado foi um solo coletado no município de Itumirim, cuja análise química se encontra na tabela 1, sozinho ou com as diferentes doses de esterco de curral: 0, 5, 10, 20 e 30 % e presença e ausência de adubo químico (Tabela 2).

TABELA 1-Análise química do solo. LAVRAS, UFLA, 2001.

pH	P	K	Al	Ca	Mg	H + Al	SB	CTC	V	m	
								Efet. total			
H ₂ O	mg/dm ³			c molc/dm ³						%	
5,6	1,0	19,0	0,3	0,4	0,1	2,9	0,5	0,8	3,4	15,9	35,3

P e K: extrator Mehlich 1.

Tabela 2-Forma e quantidade de adubo químico utilizado. LAVRAS, UFLA, 2001.

NUTRIENTE	FONTE	CONCENTRAÇÃO
Nitrogênio*	Uréia	0,66 g/vaso
Fosforo	Super Fosfato Triplo	3,051 g/vaso
Potássio*	KCl	0,60 g/vaso
Cálcio	Calcário	1,8 g/Vaso
Magnésio	MgSO ₄ .5H ₂ O	1,82 g/vaso
Zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	65,85 mg/vaso
Boro	H ₃ BO ₃	8,58 mg/vaso
Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	17,15 mg/vaso
Molibidênio	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₃₄ .4H ₂ O	3,856 mg/vaso

*Dividido em 3 vezes, 0, 30 e 60 dias após implantação do experimento.

2.2 Características avaliadas

2.2.1 Crescimento

Ao final de 125 dias, o experimento foi colhido sempre no período de 7 às 10 da manhã, através das seguintes características:

Altura (ALT)- foi medida com trena, em cm, da região do colo até a porção apical do ramo mais alto.

Número de ramos (NRA)- na determinação do número de ramos, fez se a contagem de todos os ramos maiores que 1 cm de comprimento.

Número de nós (NNO)- o número de nós de cada planta foi contado verticalmente, iniciando-se na base do ramo principal até o ápice da planta, porém, quando um ramo lateral superava o ramo principal em altura, aquele era utilizado na contagem até ser atingida a máxima altura da planta.

Biomass fresca da parte aérea (BFPA)- foram colhidas as partes aéreas das plantas, realizadas as avaliações anteriores, trituradas e pesadas em balança com sensibilidade de 0,1 kg.

Biomassa seca da parte aérea (BSPA)- a parte aérea triturada foi acondicionada em sacos de papel, e colocada em estufas de ventilação forçada até peso constante e pesadas em balança com sensibilidade de 0,1 g.

Biomassa fresca da raiz (BFRA)- as raízes foram lavadas, colocadas entre folhas de papel toalha para absorver o excesso de água e pesadas em balança com sensibilidade de 0,1 kg.

Biomassa seca de raiz (BSRA)- as raízes foram acondicionadas em sacos de papel, colocadas em estufas de ventilação forçada até peso constante e pesadas em balança com sensibilidade de 0,1 g.

2.2.2 Extração e determinação do conteúdo de óleo essencial por arraste a vapor

A metodologia utilizada foi idêntica à descrita no capítulo 2, com exceção da massa utilizada para extrair o óleo, que foi 70 g seca.

2.2.3 Análise dos grupos químicos dos constituintes principais do óleo essencial

Os espectros no infravermelho, dos óleos essenciais, foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro modelo FTIR-8201 A-Shimadzu, utilizando-se janelas de NaCl como suporte.

2.4 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições, sendo os tratamentos dispostos em um esquema fatorial 2x5, constituído por adubo químico (ausência e presença) e doses de esterco (0, 5, 10, 20 e 30%). Cada parcela foi constituída por três plantas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado em ausência de adubo químico, que conforme se aumentou a dose de esterco de curral, ocorreram grandes diferenças de coloração das plantas; em ausência de matéria orgânica, estas se apresentaram verde-claros. Conforme aumentou a dose de matéria orgânica, a coloração ficou mais escura. Quando se utilizou adubo químico, estas diferenças na coloração foram bem menos acentuadas.

Grandes diferenças também foram verificadas na largura das alas; quando em maior disponibilidade de nutrientes, estas apresentaram-se bem maiores (Fig. 1 e 2).

Foi verificado que a arquitetura da planta também foi modificada pelo nível de nutrientes no solo. Devido a apresentarem maiores números de ramos e com maiores alas, o crescimento das plantas apresentou-se mais prostrado nos tratamentos mais adubados, ao passo que, em menor concentração de nutrientes, o crescimento foi ereto (Fig. 1 e 2).

Adubação química

Para todas as características avaliadas de parte aérea, houve médias significativas superiores em presença de adubação química. A produção de

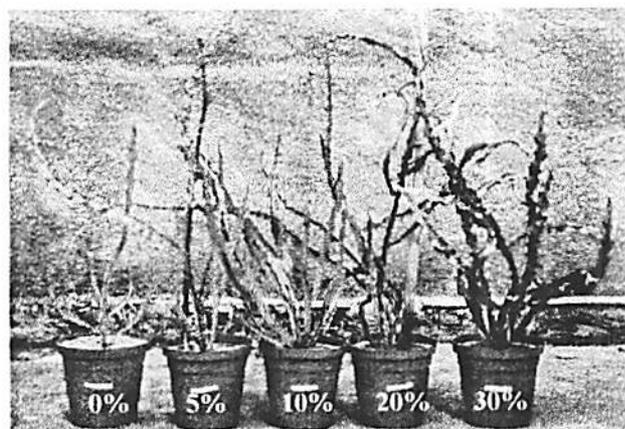


FIGURA 1-Efeito da dose de esterco de curral na ausência de adubo químico, no crescimento de *B. trimera*, em casa-de-vegetação. LAVRAS, UFLA, 2001.

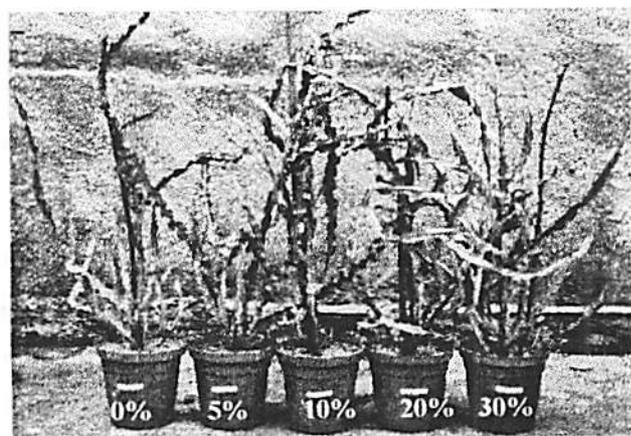


FIGURA 2-Efeito da dose de esterco de curral na presença de adubo químico, no crescimento de *B. trimera*, em casa-de-vegetação. LAVRAS, UFLA, 2001.

biomassa radicular não apresentou diferenças entre os diferentes níveis de nutrientes, causando redução na razão parte aérea/raiz, na ausência de adubo químico, mostrando que em menor disponibilidade de nutrientes, a planta investe mais em sistema radicular. Em Relação ao teor de óleo, a presença ou não de adubo químico não influenciou, mas como a presença de adubo químico aumentou significativamente a biomassa, tendeu a aumentar o rendimento por planta (conteúdo) (Tabela 1).

TABELA 1-Efeito do adubo químico na Altura (ALT), número de ramos (NRA), número de nós (NNO), biomassa fresca (BFPA) e seca da parte aérea (BSPA) e biomassa fresca (BFR) e seca de raízes (BSR), razão parte aérea/raiz (RPAR), teor (TOE) e conteúdo de óleo essencial (COE). LAVRAS, UFLA, 2001.

CARACTERÍSTICAS	ADUBO QUÍMICO	
	PRESENÇA	AUSÊNCIA
AVALIADAS		
ALT (cm)	91,09 A ^z	75,43 B
NRA	33,49 A	19,09 B
NNO	20,06 A	17,80 B
BFPA (g)	48,29 A	32,97 B
BSPA (g)	18,98 A	12,97 B
BFR (g)	51,18 A	50,09 A
BSR (g)	9,21 A	10,07 A
RPAR	2,41 A	1,41 B
TOE (%)	0,0624	0,0656
COE (g/planta)	1,1843	0,8508

^z Médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Adubação orgânica

Para a produção de biomassa, a medida que aumentou a dosagem de adubo orgânico, houve incrementos significativos, encontrando as maiores produções de biomassa em 20% e 30%, enquanto maiores produções de biomassa radicular foram obtidas nas doses de 5% e 10%. Ausência de adubo orgânico e doses elevadas apresentaram o mesmo efeito, reduzindo a biomassa radicular. Nos dois maiores níveis de matéria orgânica, a planta investiu mais em parte aérea, reduzindo a relação parte aérea/raiz (Tabela 2).

Observa-se, através dos dados da tabela 2, que o número de nós e altura foram pouco influenciados pelo nível de matéria orgânica; onde apenas na ausência de adubação este se apresentou inferior. Já o número de ramos/planta apresentou aumentos com o aumento de matéria orgânica até o nível de 20%, não diferindo de 30%.

Quanto ao teor de óleo, o efeito foi muito parecido com o da adubação química, apresentando poucas diferenças entre os diferentes níveis de matéria orgânica. Já o conteúdo foi um verdadeiro reflexo da produção de biomassa, apresentando maior conteúdo, nas duas maiores concentrações de adubação orgânica.

Adubação química e orgânica

A altura e o número de nós apresentaram muito pouca variação; na ausência de adubação química ou orgânica, produziram-se plantas mais baixas (Tabela 3).

O número de ramos, tanto em ausência quanto em presença de adubo químico, aumentou à medida que aumentou a dose de matéria orgânica. Foram encontrados os maiores números de ramos, em 20 e 30%, mas o maior número de ramos, na maior dose de matéria orgânica, foi inferior na ausência de adubo químico.

TABELA 2-Efeito do esterco de curral na Altura (ALT), número de ramos (NRA), número de nós (NNO), biomassa fresca (BFPA) e seca de parte aérea (BSPA), biomassa fresca (BFR), e seca de raízes (BSR), razão parte aérea/raiz (RPAR), teor (TOE) e conteúdo de óleo essencial (COE). LAVRAS, UFLA, 2001.

CARAC. AVALIADAS	ESTERCO DE CURRAL (%)				
	0	5	10	20	30
ALT (cm)	68,53 B ²	84,09 A	88,54 A	89,43 A	85,68 A
NRA	15,18 C	19,78 BC	23,06 B	36,89 A	36,55 A
NNO	16,42 B	18,52 AB	19,28 A	20,50 A	19,94 A
BFPA (g)	23,57 D	33,19 C	44,20 B	50,61 AB	51,58 A
BSPA (g)	9,09 B	13,19 B	16,71 B	20,43 A	20,44 A
BFR (g)	37,13 C	58,47 AB	59,98 A	49,35 B	48,26 B
BSR (g)	7,99 B	11,48 A	12,67A	8,53 B	7,52B
RPAR	1,14B	1,15 B	1,32 B	2,40 A	2,72 A
TOE (%)	0,0695	0,0565	0,0625	0,0660	0,0655
COE (g/planta)	0,6318	0,7452	1,0444	1,3484	1,3389

² Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de óleo essencial em ausência de qualquer adubação, apresentou-se mais elevado (0,09%) e no maior nível de adubo orgânico (0,064%), apresentando pouca diferença entre os outros tratamentos em maiores níveis de adubo. Já o conteúdo, como é em função da produção de biomassa, em ausência de qualquer adubação, apresentou o menor conteúdo, e em maiores níveis de adubação, maior conteúdo.

O pior resultado para biomassa seca de parte aérea foi observado na ausência de adubo químico e orgânico.

TABELA 3-Efeito do adubo químico (AQ) X esterco de curral na Altura (ALT), número de nós (NN), número de ramos (NR), biomassa fresca (BFPA) e seca da parte aérea (BSPA), biomassa fresca (BFR) e seca de raízes (BSR), razão parte aérea/raiz (RPAR), teor (TOE) e conteúdo de óleo essencial (COE). LAVRAS, UFLA, 2001.

CARA. AVAL.	AQ ^Z	ESTERCO DE CURRAL (%)				
		0	5	10	20	30
ALT (cm)	1	85,66 Aa ^Y	89,66 Aa	95,03 Aa	101,00 Aa	84,09 Aa
	0	51,41 Bb	78,52 Aa	82,06 Aa	77,87 Ba	87,28 Aa
NNO	1	18,29 Ab	19,14 Aab	20,78 Aab	22,22 Aa	19,88 Aab
	0	14,56 Bb	17,89 Aab	17,78 Bab	18,78 Ba	20,00 Aa
NRA	1	25,14 Ac	27,00 Ac	30,44 Abc	39,00 Aab	45,88 Aa
	0	5,22 Bc	12,56 Bbc	15,67 Bb	34,78 Aa	27,22 Ba
BFPA (g)	1	41,19 Ac	42,47 Ac	54,26 Aab	57,92 Aa	45,62 Bbc
	0	5,96 Bd	23,92 Bc	34,14 Bb	43,29 Bb	57,54 Aa
BSPA (g)	1	15,99 Ad	17,32 Acd	20,37 Aab	22,13 Aa	19,07 Bbc
	0	2,20 Be	9,07 Bd	13,04 Bc	18,72 Bb	21,81 Aa
BFR (g)	1	52,08 Aa	57,90 Aa	51,41 Ba	50,95 Aa	43,57 Aa
	0	22,18 Bc	59,03 Aab	68,56 Aa	47,74 Ab	52,94 Ab
BSR (g)	1	11,73 Aa	10,61 Aa	9,60 Bab	8,31 Aab	5,79 Bb
	0	4,26 Bc	12,34 Aab	15,74 Aa	8,74 Ab	9,24 Ab
RPAR	1	1,36 Ac	1,63 Abc	2,12 Aab	2,66 Aa	3,29 Aa
	0	0,51 Bb	0,73 Bb	0,82 Bb	2,14 Aa	2,36 Ba
TOE (%)	1	0,049	0,068	0,066	0,062	0,067
	0	0,09	0,045	0,059	0,07	0,064
COE (g/planta)	1	0,011	0,017	0,019	0,020	0,018
	0	0,003	0,006	0,011	0,019	0,020

^Y Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, por característica avaliada, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^Z 1- presença de adubação química e 0- ausência de adubação química.

Quando se utilizou adubo químico, houve respostas positivas à medida que aumentou a concentração de adubo orgânico até 10 e 20%, apresentando uma redução para o nível de 30%, mas quando não se utilizou adubo químico, houve resposta positiva até 30% de adubo orgânico. Para a produção de biomassa fresca ou seca, a dosagem de 30% de adubo orgânico pode substituir satisfatoriamente a adubação química. Em presença de adubo químico, quanto maior o nível de adubo orgânico, maior a tendência de redução da produção de biomassa seca radicular, mas quando não se utilizou adubo químico, a biomassa foi aumentada até níveis medianos (10%), a partir dos quais, houve redução de biomassa.

O efeito benéfico da maior disponibilidade de nutrientes (orgânico ou químico) disponíveis para as plantas na produção de biomassa da parte aérea é descrito por vários autores, para várias espécies. Entre elas, estão *Mentha arvensis* (Singh Singh e Ram, 1988; Munsu, 1992; Maia, 1994; Misra e Sharma, 1991); *Artemisia pallens* (Rao, Narayana e Rao, 1997); *Mentha piperita* (Mitchell e Farris, 1996); *Anethum graveolens* e *Thymus vulgaris*, (Udagawa, 1995); *Cymbopogon martini* (Rao et al., 1985); *Achillea millefolium* (Scheffer, Junior e Koehler, 1993) e *Lippia alba* (Ming, 1994).

Em relação ao rendimento de óleo essencial, a ausência do efeito de adubação química também foi descrita, por Singh, Singh e Ram (1988), em *Mentha arvensis*, segundo os quais a adubação química não influenciou no teor de óleo essencial e houve pequena tendência de redução, que foi superada pelo efeito benéfico, altamente significativo na produção de biomassa. Na maioria dos casos, a adubação química apresenta efeitos positivos no teor de óleos essenciais, que têm demonstrado ser um reflexo de um bom desenvolvimento das plantas, o que, por sua vez, é alcançado com níveis adequados de nutrientes disponíveis para as mesmas. (Rao, Narayana e Rao, 1997), em *Artemisia*

pallens; (Mitchell e Farris, 1996) em *Mentha piperita*; (Munsi, 1992; Maia, 1994; Misra e Sharma, 1991) em *Mentha arvensis*; (Udagawa, 1995) em *Thymus vulgaris*; (Rao et al., 1985) em *Cymbopogon martini*. Raramente se encontram efeitos negativos da adubação química no teor de óleos essenciais, e quando isto ocorre, como em *Anethum graveolens* (Udagawa, 1995), o grande aumento na produção de biomassa supera a redução no teor de óleo essencial. Portanto, há variação nas respostas à concentração de nutrientes entre as diferentes espécies, mas os fatores ambientais, como temperatura e umidade, também exercem grande influência. As plantas de carqueja, no presente trabalho, foram expostas a elevadas temperaturas e déficit hídrico, o que pode ter causado redução do efeito nutricional nos diferentes tratamentos.

Ghuenther (1948), citado por Munsi (1992), afirmou que o precursor do óleo essencial poderia ser obtido pela degradação de carboidratos e proteínas. Maiores níveis de nitrogênio e fósforo resultaram em aumento linear no rendimento de óleo, o que pode ser devido ao proeminente papel desempenhado pelos dois elementos essenciais nos processos metabólicos. Uma associação positiva entre o rendimento de óleo e estes atributos foi observada. Assim, é possível obter efetivos e benéficos resultados com a aplicação racional de nitrogênio e fósforo. Um efeito positivo do estresse nutricional, que acreditamos causar aumentos no teor de óleos em plantas, seria o cultivo em condições nutricionais otimizadas, favorecendo um bom desenvolvimento da planta. Após, este daria um estresse nutricional, elevando o teor e rendimento de óleo por área.

Em relação ao efeito da adubação orgânica, baseado em dados da literatura sobre o rendimento de óleo, o efeito é muito parecido com a adubação química, o que pode ser muito interessante, pois existe a possibilidade de substituir pesadas adubações químicas, principalmente as nitrogenadas, ou a redução destas, o que traria vantagens, como redução no custo de produção,

poluição de mananciais de água, melhoria das características químicas, físicas e biológicas do solo, entre outras (Rao, Narayama e Rao, 1997), em *Artemisia pallens*; (Scheffer, Junior e Koehler, 1993), em *Achillea millefolium*; (Maffei, 1999), em *Mentha arvensis*. A matéria orgânica pode também não influenciar no teor de óleo, como em *Vetiveria zizanioides* (Dethier et al., 1997), ou apresentar tendências de redução (Singh, Singh e Ram, 1988), como em *Mentha arvensis*, mas é altamente compensada pelo aumento na produção de biomassa. Em menor escala, a adubação orgânica pode apresentar efeitos negativos como em *Lippia alba* (Ming, 1994), concordando com nossos resultados. Na ausência de qualquer adubação, o teor de óleo apresentou-se mais elevado (Tabela 3), o que pode ser devido ao elevado estresse nutricional ao qual as plantas foram expostas. Mas estes resultados precisam ser confirmados em experimentos futuros, e mesmo que sejam confirmados, o maior teor de óleo em ausência de qualquer tipo de adubação, 1,4 vezes superior, renderia, por planta, 0,003 g, e em maior nível de matéria orgânica, 0,020 g/planta, o que não seria compensador, pois o rendimento/planta seria 6,67 vezes inferior ao tratamento em menor nível de matéria orgânica, concordando com os vários autores em trabalhos relacionados à matéria orgânica citados anteriormente.

Os espectros entre os diferentes tratamentos apresentaram grande similaridade, por isto optamos por não apresentar todos. Nas figuras 1 e 2, correspondentes aos espectros obtidos através dos diferentes tratamentos, podemos observar a grande similaridade entre os mesmos. Em todos, observamos a presença de um sinal forte, compreendido entre 2830-2990 cm^{-1} , que pode ser atribuído aos grupos metilas ($-\text{CH}_3$); metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$), presentes nos constituintes do óleo obtido. A presença do O-H alcoólico, característica do carquejol, componente majoritário do óleo em estudo, está bem evidenciada pelo sinal compreendido entre 3649-3500 cm^{-1} . Outra banda presente em todos espectros situa-se aproximadamente entre 1730-

1760 cm^{-1} , caracterizando o grupo carbonílico (C=O), de um éster, aldeído ou cetona. Através deste valor pode-se inferir a presença do acetato de carquejila, outro componente majoritário encontrado no óleo da carqueja. Duplas ligações características aparecem com os sinais encontrados em torno de 1600-1650 cm^{-1} , e a presença de um anel aromático trissubstituído é nítida com os harmônicos em 2000-1667 cm^{-1} e com os sinais em 864 e 800 cm^{-1} . As vibrações de deformação axial de C-O em álcoois e fenóis produzem uma banda forte na região compreendida entre 1260-1000 cm^{-1} do espectro. Nestes, os sinais estão presentes em todos, confirmando os dados da literatura sobre a presença de carquejol e outros álcoois não identificados (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994).

Portanto, os resultados obtidos em relação à produção de biomassa e rendimento de óleo essencial foram bastantes satisfatórios, pois verificou-se que em maior disponibilidade de nutrientes, podemos aumentar o rendimento de óleo/planta. Este aumento pode ser alcançado apenas com adubação orgânica, podendo, assim, reduzir custos de produção e contaminação do meio ambiente, e até mesmo obtendo um óleo de maior valor, uma vez que é originário do cultivo orgânico.

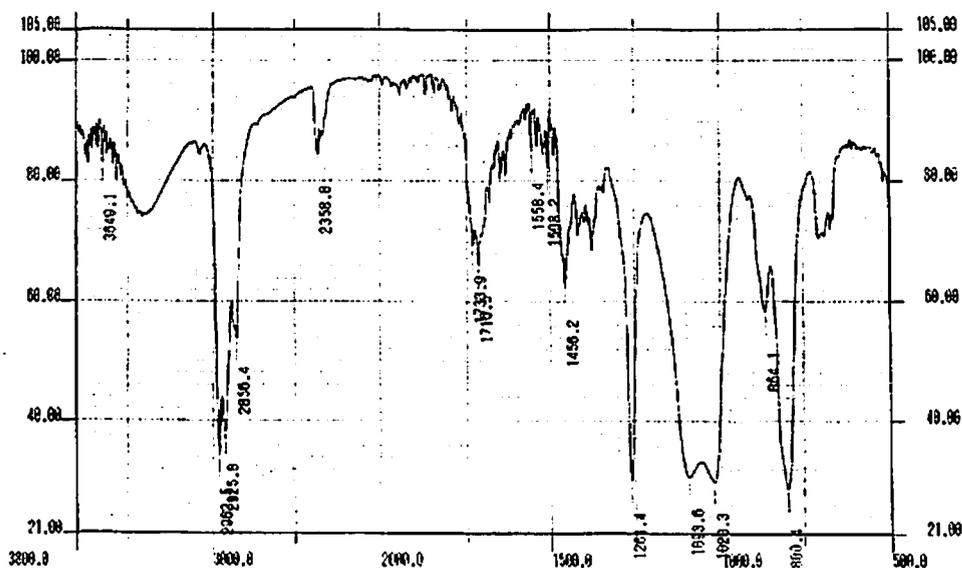


Figura 1-Espectro do óleo essencial proveniente do tratamento em ausência de adubo químico. LAVRAS, UFLA, 2001.

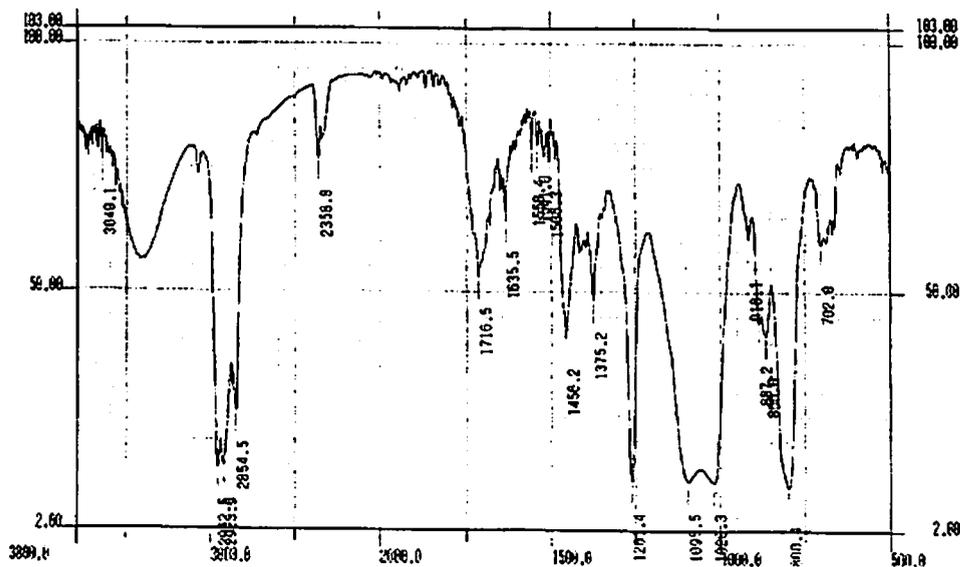


Figura 2-Espectro do óleo essencial proveniente do tratamento em presença de adubo químico. LAVRAS, UFLA, 2001.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem concluir que:

- No cultivo da carqueja, a adubação química pode ser totalmente substituída pela orgânica;
- Experimentos precisam ser implantados para confirmar o efeito da disponibilidade de nutrientes no teor de óleo essencial;
- Aumentos no conteúdo de óleo podem ser alcançados com a maior disponibilidade de nutrientes para as plantas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DETHIER, M.; SAKUBU, S.; CIZA, A.; CORDIER, Y.; MENUT, C.; LAMATY, G. Aromatic plants of tropical central africa. XXVIII. Influence of cultural treatment and harvest time on vetiver oil quality in Burandi. *Journal Essential Oil Reseach*, Wheaton, v.9, p.447-451, 1997.
- MAFFEI, M. Sustainable methods for a sustainable production of peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil. *Journal Essential Oil Research*, Wheaton, v.11, p.267-282, 1999.
- MAIA, N.B. **Nutrição mineral, crescimento e qualidade do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) cultivada em solução nutritiva.** Piracicaba: ESALQ, 1994. 69p. (Dissertação – Mestrado em solos e Nutrição de Plantas).
- MING, L. Influência da adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.12, n.10, p.x-y, maio 1994.

- MISRA, A.; SHARMA, S. Critical Zn concentration for essential oil yield and menthol concentration of Japanese mint. **Fertilizer Research**, The Hague, v.29, p.261-265, 1991.
- MITCHELL, A.R.; FARRIS, N.A. Peppermint response to nitrogen fertilizer in an arid climate. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.19, n.6, p.955-967, 1996.
- MUNSI, P.S. Nitrogen and phosphorus nutrition response in Japanese mint cultivation. **Acta horticulturae**, Wageningen, v.306, p.x-y, 1992
- RAO, B.R.R.; SASTRY, K.P.; RAO, E.V.S.; RAMESH, S.I. Variation in yields quality of geranium (*Pelargonium graveolens* L' Hér. Ex Aiton) under varied climatic conditions. **Journal Essential Oil Research**, Wheaton, n.2, p.73-79, 1990.
- RAO, E.V.S.P.; NARAYANA, M.R.; RAO, B.R.R. The effect of nitrogen and farm manure on yield nutrient uptake in davana (*Artemisia pallens* Wall. Ex D.C.). **Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants**, Birmingham, v.5, n.2, p.39-48, 1997.
- RAO, E.V.S.P.; SINGH, M.; RAO, R.S.G.; RAO, B.R.R. Effect of plant spacing and application of nitrogen fertilizer on herb and essential oil yields of palmarosa (*Cymbopogon martini* Stapf. Var. motia). **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.104, n.1, p.67-70, Feb. 1985.
- SCHEFFER, M.C.; JUNIOR, P.R.; KOEHLER, H.S. Influence of organic fertilization on the biomass, yield and composition of the essential oil of *Achillea millefolium* L. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.331, p.109-114, 1993.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387p.
- SINGH, K.; SINGH, V.; RAM, P. Effect of manure and fertilizers on herb, oil and yield of *Mentha arvensis* L. **Indian Journal of Agronomy**, New Delhi, v.33, n.3, p.287-289, Sept. 1988.

UDAGAWA, Y. Some responses of dill (*Anethum graveolens*) and thyme (*Thymus vulgaris*), grown in hydroponic, to the concentration of nutrient solution. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.396, p.x-y, 1995.

