



**ASPECTOS ANATÔMICOS, FISIOLÓGICOS
E FITOQUÍMICOS DE PLANTAS JOVENS
DE *Mikania glomerata* Sprengel (GUACO)
SUBMETIDAS A DIFERENTES REGIMES
HÍDRICOS**

CLÁUDIA FERREIRA DO NASCIMENTO

2003

56913
008486

CLÁUDIA FERREIRA DO NASCIMENTO

**ASPECTOS ANATÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS DE
PLANTAS JOVENS DE *Mikania glomerata* Sprengel (GUACO)
SUBMETIDAS A DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS**

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

Orientadora

Profa. Dra. Ângela Maria Soares

LAVRAS
MINAS GERAIS -
2003

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

Nascimento, Cláudia Ferreira do

Aspectos anatômicos, fisiológicos e fitoquímicos de plantas jovens de
Mikania glomerata Sprengel (guaco) submetidas a diferentes regimes
hídricos / Cláudia Ferreira do Nascimento. -- Lavras: UFLA, 2003.

68 p. : il.

Orientadora: Ângela Maria Soares.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Guaco. 2. Planta medicinal. 3. Estresse hídrico. 4. Característica anatômica.
5. Fitoquímica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.55044

-633.88355

CLÁUDIA FERREIRA DO NASCIMENTO

**ASPECTOS ANATÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS DE
PLANTAS JOVENS DE *Mikania glomerata* Sprengel SUBMETIDAS A
DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS**

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

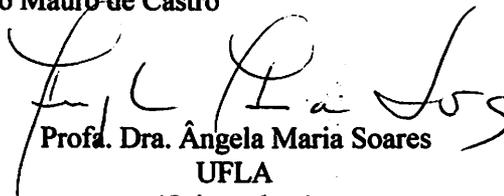
Aprovada em 20 de agosto de 2003

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

UFLA


Prof. Dra. Ângela Maria Soares
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, José Ferreira do Nascimento e Maria das Graças Nascimento,

Às minhas queridas irmãs Cristina e Malena e

ao meu lindo e carinhoso sobrinho Igor Vítor

DEDICO

À Beatriz Gonçalves Brasileiro e

minha tia Edna Martins Korn

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser toda minha inspiração, fonte de vida, força, energia, alegria e principal razão de toda minha existência.

À minha família pelo apoio constante, confiança, carinho, amor e dedicação em todos os momentos da minha vida, pois sem ela não seria possível minha permanência em nenhum lugar.

À minha orientadora de iniciação científica Beatriz Gonçalves Brasileiro, que além de amiga sempre me incentivou e muito me apoiou nos estudos e pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização do mestrado e por fazer parte de uma importante e boa fase de minha vida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Ângela Maria Soares por me ajudar a crescer, pela orientação, pelos ensinamentos e sempre disposição no atendimento.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro pela co-orientação, amizade, apoio e incentivo na pesquisa.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, Renato Paiva, pelos ensinamentos e carinho, Luiz Edson, pelo bom humor e lição de vida, Amauri e em especial ao professor Donizeti que foi o meu primeiro contato com o curso de Fisiologia Vegetal nesta universidade através do curso Lato Sensu e, portanto, o elo de ligação entre mim e este programa de pós-graduação.

Ao professor José Eduardo pelo apoio, fornecimento das mudas de guaco para o experimento e concessão do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura para extração do óleo essencial e à prof^a. Suzan Kelly pela pelos ensinamentos.

Ao professor Mário C. Guerreiro do Departamento de Química pela solicitude e grande contribuição e enriquecimento ao meu trabalho de dissertação através do grande auxílio na análise da composição química do óleo essencial.

Aos pesquisadores Marcelo Malta da EPAMIG-LAVRAS, no grande auxílio na quantificação da cumarina e Marcelo Murad pela ajuda em trabalhos.

Aos meus tios Edna, Hélia e Zito e primos, em especial ao Marcílio, que se encontram em outro país, mas nunca deixaram de me apoiar, principalmente nos momentos mais difíceis e delicados.

A profa. Rosane Freitas Schwan, pela concessão do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia-UFLA, para extração da cumarina.

Ao meu colega e amigo Marco Antônio que sempre me deu apoio, incentivo e muito me ajudou neste percurso do mestrado na amizade, companheirismo e por me ajudar também no preparo das amostras de óleo para análise química.

Ao Érico pela amizade, paciência e disposição em me ajudar nas análises estatísticas, figuras e extração da cumarina.

Ao Joel pela atenção, cuidado e dedicação na condução do experimento, principalmente nas condições de viveiro.

Ao Evaristo Guerra e Lena, pelo apoio, carinho e amizade e ao Izonel pelo trabalho e atenção.

Aos alunos de iniciação científica, Carlos Vinício, mais conhecido como "Espeto", Lucas, Guilherme, Su Ellen (Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia) e Ana Carolina M. Campos, pela competência e disposição nos estudos e pesquisa.

Muito em especial à minha amiga Ednabel Caracas, mais conhecida como "APG- APG", pela amizade sincera, força, apoio e paciência, sobretudo nos momentos mais difíceis de minha vida aqui.

À minha amiga e companheira de teto, madrugadas acordadas escrevendo, copos e festas, Sílvia Martim, mais conhecida como a “Promotor da Fisiologia”, pela amizade, compreensão, força, carinho e afeto.

À Evânia e Carmem pela amizade, afeto, grande companheirismo e cumplicidade.

À Cássia por me acolher quando aqui cheguei, pela amizade, carinho e apoio.

À Elisa Moura com quem muito aprendi em pouco tempo e muito me ajudou e me apoiou.

Aos meus colegas e amigos de curso, Andrea, Teresa, Grécia, Morbeck, Cristina, Márcio, Soami, Ana Hortência, Christiano, Ráirys, Alessandro, Aurélio e Paulo Cairo pelo apoio, carinho e empréstimos de material acadêmico.

À Anne, Daniela Duarte, Inês Angélica, Daniela Deitos, Gustavo, João Paulo, Breno, Guto, Giandrê, Patrícia, Léo (Leonardo Ferreira) e Mariana pela amizade e carinho.

Aos meus amigos Fábio e Cristiano do Departamento de Fitopatologia, pelo carinho, amizade, apoio e incentivo.

A todos os meus professores de graduação da Universidade Vale do Rio Doce - UNIVALE, em especial, Márcio Mendes, Walesca, Virgínia e Beatriz.

Aos meus amigos, que mesmo distantes não deixaram de me apoiar nem de se comunicarem comigo, Rizza, Adriana, Teila, Tatiana, Ederlaine, Léo, André, Jane, João Júlio (Governador Valadares), Rodrigo Faria (BH) e Heliomar Santana (Vitória-ES).

Aos funcionários do departamento de Biologia, Odorêncio, Dartanhã, Rafaela e Evaldo (Departamento de Agricultura).

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente pela conquista de mais uma etapa em minha vida profissional e acadêmica, meu muito obrigada e que Deus abençoe a todos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Respostas das plantas à deficiência hídrica	3
2.2 Síntese de compostos secundários, óleos essenciais e a deficiência hídrica ..	7
2.3 Cumarinas	10
2.4 O Guaco	14
2.4.1 A espécie.....	14
2.4.2 As propriedades terapêuticas.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Considerações gerais e condições experimentais	18
3.2 Características avaliadas	20
3.2.1 Potencial hídrico e trocas gasosas	21
3.2.2 Características anatômicas	22
3.3 Caracterização e quantificação de compostos químicos	23
3.3.1 Teor de óleo essencial e composição química	23
3.3.2 Extração e quantificação da cumarina	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Microclima.....	27
4.2 Potencial Hídrico	28
4.3 Trocas gasosas	31
4.4 Características anatômicas	36
4.4.1 Efeitos de diferentes regimes hídricos na anatomia foliar	36
4.4.2 Efeitos de diferentes regimes hídricos na estrutura primária de raiz.....	41
4.5 Caracterização e quantificação de compostos químicos	45
4.5.1 Teor de óleo essencial e composição química	45
4.5.2 Efeitos dos diferentes regimes hídricos no teor de cumarina.....	52
5 CONCLUSÕES.....	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ABSTRACT

NASCIMENTO, Cláudia Ferreira do. **Anatomical, physiological and biochemical aspects in *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) under different water regimes**. 2003. 65p. Dissertation (Master's Program in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Mikania glomerata Sprengel (guaco) is a medicinal plant which therapeutic properties were proved. Water stress affect the coumarin synthesis, a phenolic compound related to therapeutic proprieties. The aim of this work was to evaluate the water stress influence on gas exchanges, anatomical and biochemical characteristics of guaco young plants, obtained by assexual propagation. The plants were cultivated in pots in greenhouse conditions, and submitted to the following treatments: daily watering (control), watering each five days from three months old (moderated stress) and watering suspension (severe stress) from five months old. With the advance of water stress, in plants submitted to severe stress there was a marked reduction in the gas exchange due stomatal closure. This reduction was associated with the increase of intercellular carbon concentration. In general, the highest photosynthesis rates were observed on moderate stress. Leaves and roots anatomy alterations were observed due to water regimes. The highest gains of coumarin and essential oil content were observed on moderate stress. The essential oil chemical composition was not influenced by the different water regimes.

Guidance Committee: Ângela Maria Soares – DBI/UFLA (Adviser)
Evaristo Mauro de Castro – DBI/UFLA (Co-adviser)

RESUMO

NASCIMENTO, Cláudia Ferreira do. **Aspectos anatômicos, fisiológicos e fitoquímicos de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) submetidas a diferentes regimes hídricos.** 2003. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Mikania glomerata Sprengel (guaco) é uma espécie medicinal cujas propriedades terapêuticas, expectorantes e broncodilatadoras já foram comprovadas. A cumarina, o princípio ativo responsável por estas propriedades terapêuticas, é um composto fenólico, cuja síntese pode ser afetada pela deficiência hídrica. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do estresse hídrico nas trocas gasosas, características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de guaco. As plantas utilizadas neste estudo foram obtidas por meio de propagação vegetativa através do método de estaquia, cultivadas em vaso, sob condições de casa de vegetação e submetidas aos seguintes tratamentos: rega diária (controle), rega a cada cinco dias a partir dos três meses de idade (estresse moderado) e rega diária com suspensão total da rega até a observação de murcha acentuada das folhas (estresse severo), a partir dos cinco meses de idade. Diante dos resultados obtidos foi possível observar nas plantas submetidas ao estresse severo uma queda significativa na fotossíntese, condutância estomática e transpiração, sendo esta redução acompanhada pelo aumento da concentração de carbono intercelular a partir do oitavo dia após suspensão da rega. Em geral, as maiores taxas de fotossíntese foram observadas no estresse moderado. Foram observadas alterações na anatomia de folha e raiz em função dos diferentes tratamentos. Em relação ao teor de cumarina e óleo essencial foram observados os maiores rendimentos no estresse moderado e a composição química do óleo essencial não foi influenciada pelos diferentes regimes hídricos.

Comitê orientador: Ângela Maria Soares –DBI/ UFLA (Orientadora)
Evaristo Mauro de Castro – DBI/UFLA (Co-orientador)

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais vem atingindo um público cada vez maior, recebendo incentivo da própria Organização Mundial da Saúde, que recomendou aos países membros que desenvolvessem pesquisas visando o uso da flora com propósito terapêutico. É importante ressaltar que o estudo sistemático das plantas medicinais envolve conhecimentos em várias áreas como antropologia, botânica, fisiologia vegetal, química, farmácia, entre outras. Assim sendo, estudos de caráter interdisciplinar podem contribuir para uma recomendação de uso das plantas de interesse medicinal.

A eficácia terapêutica das plantas medicinais está relacionada ao teor de princípio ativo. Portanto, o conhecimento dos fatores que interferem na síntese dos compostos químicos nas plantas medicinais é de fundamental importância. Estudos com esse foco têm importância na tentativa de otimizar condições de cultivo, colheita e armazenamento, uma vez que podem contribuir para uma produção de matéria-prima de melhor qualidade. Entretanto, constata-se que há uma carência de conhecimento sobre como os diferentes fatores do ambiente influenciam na fisiologia do desenvolvimento, particularmente a síntese de compostos secundários, o que pode vir a contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na relação ambiente-planta-princípio ativo.

Mikania glomerata Sprengel é uma importante espécie medicinal do tipo subarbusto trepador, com folhas largas e pequenas e flores que exalam leve aroma de baunilha quando amassadas. O gênero *Mikania* é encontrado no Brasil desde a Bahia até Santa Catarina. Popularmente conhecida como guaco, *Mikania glomerata* Sprengel é um dos fitoterápicos de maior consumo, utilizada principalmente nas afecções respiratórias. Destacam-se ainda estudos que estão

verificando outros efeitos farmacológicos desta planta, como, por exemplo, sua atividade antibacteriana, fungicida e anticancerígena.

Diante das considerações feitas acima e tendo como hipótese que a deficiência hídrica influencia a síntese de óleos essenciais e compostos fenólicos, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a influência de diferentes regimes hídricos em características de trocas gasosas, relações hídricas, respostas anatômicas de folha e raiz e síntese de óleos essenciais e cumarina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Respostas das plantas à deficiência hídrica

As plantas são continuamente expostas a estímulos ambientais que influenciam seu desenvolvimento, crescimento e determinam a produtividade. O déficit hídrico é o fator ambiental de estresse mais comum que limita a produtividade das plantas, não apenas em condições de seca, devido a baixos índices pluviométricos, mas também em condições de baixas temperaturas e solo com alta concentração de íons.

De um modo geral, o estresse hídrico se desenvolve quando a perda de água excede a absorção em intensidade suficiente para causar o decréscimo no conteúdo de água da planta e a redução do turgor, resultando numa diminuição da expansão celular. Este fato pode também causar alterações de vários processos fisiológicos essenciais, modificar as características morfoanatômicas da planta, bem como seus componentes bioquímicos.

A capacidade das plantas de tolerar a deficiência hídrica é determinada por múltiplas vias bioquímicas que facilitam a retenção e/ou aquisição de água, proteção de estruturas funcionais e manutenção da homeostase de íons (Bohnert & Jensen, 1996). As respostas ao estresse hídrico podem variar em função da espécie e genótipo, a extensão e severidade da perda de água, a idade e estágio do desenvolvimento, o órgão, o tipo celular e o compartimento subcelular. Uma gradativa perda de água pode permitir uma aclimação para a deficiência hídrica, limitando assim a extensão de injúrias, enquanto uma rápida proporção de perda de água pode prejudicar sua aclimação (Bray, 1997).

A deficiência hídrica celular pode resultar numa concentração de solutos, mudanças no volume celular e adaptação de membranas, perda do gradiente de potencial da água e do turgor, decomposição da integridade de

membrana e desnaturação de proteínas. A capacidade da planta de responder e sobreviver à deficiência hídrica celular depende do mecanismo global de integração das respostas celulares. Estas respostas podem ocorrer dentro de poucos segundos, como, por exemplo, através de uma mudança no status de fosforilação de uma proteína, ou dentro de minutos e horas, por uma mudança na expressão gênica (Bray, 1997).

Em resposta ao estresse hídrico, as plantas regulam sua transpiração pela diminuição da condutância estomática, afetando também a difusão de CO₂ atmosférico para os sítios de carboxilação, como já demonstrado em diferentes estudos (Gomes et al., 1997; Chartzoulakis et al., 1999; França et al., 2000; Da Matta, 2003).

Observa-se que em condições de estresse hídrico moderado, o aparato fotossintético não é danificado continuando a funcionar graças à ligação com a fotorrespiração (Brestic et al., 1995), como confirmado por mensurações fotoquímicas (Sharkey & Badger, 1982) e estimativas de concentração interna de CO₂ (C_i) (Donavan & Ehleringer, 1994). Em condições de estresse hídrico severo, as plantas que atingem potenciais hídricos abaixo de um valor crítico, o que varia de acordo com cada espécie, apresentam uma perda na capacidade fotossintética que propicia um aumento na concentração de carbono intercelular (C_i), associada a uma menor atividade da rubisco (Brodribb, 1996; Medina et al., 1999). Em condições de altas temperaturas e altos valores de déficit de pressão de vapor na atmosfera (DPV), a fotossíntese pode ser mais afetada em condições de deficiência hídrica (Brakke & Allen, 1995; Medina & Machado, 1998).

Para Ruiz-Sánchez (2000), o fechamento estomático e a epinastia observada em plantas jovens de damasco em resposta ao estresse hídrico representaram mecanismos adaptativos à seca, permitindo à planta regular mais efetivamente a perda de água e prevenindo assim, o aumento da temperatura foliar. Outro mecanismo de tolerância à deficiência hídrica é associado ao

aumento da concentração de solutos. Analisando os efeitos da baixa disponibilidade de água no solo nas relações hídricas e trocas gasosas de quinóia (*Chenopodium quinoa* Willd.), Jensen et al. (2000) verificaram que durante o estresse hídrico severo houve manutenção de uma baixa pressão de turgor, atribuída ao ajustamento osmótico.

O estresse hídrico altera as características anatômicas que regulam a transmissão do efeito do déficit hídrico para as células. Sabe-se que mudanças nas características anatômicas podem alterar a difusão de CO₂, a partir de cavidades subestomáticas, aos sítios de carboxilação, e assim contribuir para manutenção das taxas de fotossíntese, mesmo com baixa condutância estomática (Evans et al., 1994).

Estudos realizados sobre as relações hídricas, taxas fotossintéticas e características anatômicas foliares em duas cultivares de oliveiras (*Olea europaea*) 'Koroneik' e 'Mastoidis' submetidas à deficiência hídrica revelaram que ambas as espécies apresentaram capacidade de manutenção da pressão de turgor (Chartzoulakis et al., 1999). Nestas cultivares a taxa de fotossíntese, a condutância estomática, o potencial hídrico antes do amanhecer, bem como o potencial osmótico diminuíram com o ciclo de estresse hídrico. Porém, sob condições de baixos valores de condutância estomática, 'koroneik' manteve maiores taxas fotossintéticas do que 'Mastoidis', um fato que foi atribuído à diferenciação de tecidos foliares, induzida por condições de estresse hídrico, especialmente associada a diferenças na espessura dos parênquimas paliádico e lacunoso.

As características anatômicas das raízes também são importantes para adaptação à deficiência hídrica no solo, pela manutenção da absorção de água do solo em condições de seca (Turner, 1979).

Durante o estresse hídrico a anatomia da raiz pode ser alterada amplamente, induzindo o desenvolvimento de barreiras apoplásticas ao fluxo de

água e íons (Stasovski et al., 1991; Taleisnik et al., 1999). Sua formação representa uma estratégia fundamental para a sobrevivência das plantas em ambientes adversos (North & Nobel, 1995; Peyrano et al., 1997; Zimmermann & Steudle, 1998; Sreiber et al., 1999).

Huang & Fry (1998), trabalhando com *Festuca arundinacea* Schreb observaram nítidos colapsos de células corticais evidenciados por formação de espaços intercelulares, após 14 e 28 dias de seca em cultivares de Kentucky-31 e MIC18, respectivamente, causando contração de extensões de raízes. Os espaços intercelulares corticais podem interromper o movimento de água nas raízes e reduzir o contato raiz/solo, limitando a absorção de água em solos com baixa disponibilidade hídrica. Assim, em solo muito seco, quando o potencial hídrico do solo cai abaixo do potencial hídrico da raiz, a formação de espaços intercelulares previne a perda de água da planta para o solo seco (Nobel & Huang, 1992).

Outras alterações anatômicas também importantes, as quais podem ocorrer sob diversos aspectos de respostas hídricas das plantas, são as mudanças no diâmetro dos vasos condutores e espessuras de parênquima clorofiliano, visto que um importante aspecto de resposta da planta à seca é que, quando a disponibilidade de água do solo declina, a tensão hidráulica do sistema continuum solo-planta-atmosfera aumenta até o ponto no qual a coluna de água no xilema é perdida pela cavitação e o transporte de água é reduzido ou interrompido (Tyree & Sperry, 1989; Higgs & Wood, 1995; Atkinson & Taylor, 1996). O limite para tensão do xilema antes da formação da cavitação depende, em parte, do tamanho do vaso (Atkinson & Taylor, 1996). Vasos com diâmetros largos são mais propensos à cavitação do que aqueles com diâmetros menores (Zimmerman, 1983; Carlquist, 1988). Assim, o embolismo nos vasos pode ocorrer mais facilmente em vasos com diâmetros mais largos (Tyree & Sperry, 1989; Atkinson & Taylor, 1996).

Desse modo, um xilema com vasos estreitos é fisiologicamente melhor protegido contra cavitação, já que vasos com diâmetros mais estreitos mantêm uma coluna d'água sob alta tensão devido a terem uma maior superfície para a razão do volume e a uma maior proporção de moléculas de água estar ligada à parede (Carlquist, 1989). Vasos estreitos podem também aumentar a resistência ao fluxo de água, o que pode ser vantajoso em condições de seca. O diâmetro dos vasos revelou estar estreitamente e positivamente correlacionado com o volume de água transportado e inversamente correlacionado com a “segurança” do sistema de condução (Carlquist, 1980; Salleo & Lo Gullo, 1986). A formação de vasos estreitos em lenhosas ocorre frequentemente em dicotiledôneas tolerantes a seca (Carlquist, 1985; Arnold & Mauseth, 1999).

Em plantas de *Paspalum dilatatum* foi observado que o diâmetro dos vasos xilemáticos da raiz diminuiu significativamente sob condições de seca. O valor adaptativo de produzir vasos estreitos diminui a susceptibilidade ao embolismo em capilares menores (Vasellati et al., 2001).

2.2 Síntese de compostos secundários, óleos essenciais e a deficiência hídrica

O comportamento dos seres vivos resulta da interação da sua constituição genética com o ambiente. Pesquisas recentes indicam grande variação na produção de metabólitos secundários nas plantas medicinais de acordo com suas relações ecológicas, que variam continuamente com o tempo e o espaço (Castro et al., 2001). A concentração dos compostos químicos nas plantas depende do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, que podem ativar genes, como por exemplo, em alguns casos de agressão por microrganismos ou pragas, em que ocorre uma superprodução de substâncias defensivas que têm, eventualmente, ação terapêutica (Brown Junior, 1988; Tetényi, 1983).

A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo, ocorrendo uma estreita relação entre essas rotas e aquelas responsáveis pela síntese de metabólitos primários. Essas rotas metabólicas são interconectadas, pois os metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras nas principais rotas de síntese de metabólitos secundários.

Nesse sentido, embora ocorra a divisão do metabolismo em primário e secundário, este deve ser considerado como um todo, com a produção de metabólitos primários e secundários. A divisão em metabólitos primários e secundários deve ser vista como uma forma de agrupar compostos com determinadas características em comum (Castro et al., 2001).

Por ser a água uma substância essencial para a vida e o metabolismo das plantas, supõe-se que onde não há restrição de oferta de água a produção de princípios ativos seja maior; porém, nem sempre isto é verdadeiro. Diversos estudos têm mostrado que a água reduz o teor de alcalóides. Pesquisas realizadas por Sokolov e por Evenari no final da década de 50 com solanáceas (*Datura*, *Atropa* e *Hyoscinus*), revelaram que essas espécies apresentaram maior teor de alcalóides quando mantidas sob estresse hídrico (Corrêa Júnior et al., 1994).

Em geral, o estresse hídrico também pode promover aumento na biossíntese de compostos fenólicos e formação de lignina (Matern & Grimmig 1994; Kurup et al., 1994) e diminuir a produção de glicosídeos, como verificado em *Digitalis* por Basso et al. (1998).

A maneira como o estresse hídrico é induzido pode afetar verdadeiramente a síntese de compostos químicos, como é mostrado no estudo de Nanasi et al. (1974). A suspensão da irrigação resultou em uma redução acentuada a produção de matéria seca e uma ligeira redução na produção de cardenolídeos, enquanto uma condição de estresse moderado induziu uma considerável perda de digitoxigenina e outros cardenolídeos que foram

ligeiramente reduzidos. Isto foi atribuído ao baixo turnover de cardenolídeos e a um restrito fluxo de metabólitos durante o estresse hídrico, o qual primeiro afeta o pool de metabólitos. Deve-se, entretanto, ressaltar que o estresse pode induzir mudanças nas atividades das enzimas do metabolismo secundário conduzindo ao uso intenso de alternativas rotas biossintéticas para síntese de glicosídeos, mantendo relativamente altos níveis de outros cardenolídeos (Stuhfauth et al., 1987).

Os óleos essenciais são comercialmente usados para conferir aromas e odores a diversos produtos alimentícios, na perfumaria e como medicamentos analgésicos, anti-sépticos, sedativos, expectorantes, estimulantes, estomáquicos, entre outros (Craveiro et al., 1981). Vários estudos sobre a atividade dos óleos essenciais permitiram a descoberta recente de compostos de ação antifúngica e antibacteriana, ou seja, substitutos essenciais de agrotóxicos.

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando a algumas centenas de compostos com diferentes funções orgânicas. Por outro lado, sua composição química tem sido usada na taxonomia e filogenia (Gottlieb & Salatino, 1987; Martins, 1996; Gonçalves, 2001). Os terpenos, derivados da rota do ácido mevalônico, e os fenil-propanos, derivados da rota do ácido chiquímico, são as classes mais comumente encontradas. Alterações em diversos fatores ambientais têm sido associadas à produtividade, à composição e à quantidade dos constituintes dos óleos essenciais (Clark & Menary, 1980; Gonçalves, 2001). Yani et al. (1993), estudando o efeito do estresse hídrico a longo prazo no metabolismo e emissões de terpenos em plantas de *Cupressus sempervirens*, observaram uma forte diminuição de todos os grupos de terpenos, acompanhada pela desidratação.

Penka (1978) estudando a produção dos óleos essenciais em diversas espécies medicinais, observou aumento na concentração dos mesmos em 15 espécies, em condições de cultivo sem irrigação.

Por outro lado, plantas irrigadas podem compensar o menor teor de princípios ativos com maior produção de biomassa, o que resultará em maior rendimento final de princípio ativo por área, entretanto, a irrigação por aspersão, principalmente nas plantas que possuem óleo essencial localizado em partes externas, como nas espécies da família Labiatae, provoca forte redução no teor de óleo quando essa prática é realizada próxima da colheita. (Corrêa et al., 1984).

De um modo geral, estudos realizados com a produção de óleo essencial evidenciaram que a sua produção aumentou com suprimento de água menos frequente, isto é, quando as plantas tinham sido irrigadas nas fases críticas do desenvolvimento (crescimento inicial e formação de gemas florais). Dessa forma, a irrigação em fases críticas do desenvolvimento parece ser o uso mais eficiente da água, sendo mais importante ainda nas regiões onde ocorrem períodos de seca mais prolongados (Franz, 1983).

Singh et al. (1997) observaram que em plantas de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) os níveis de irrigação não afetaram a qualidade do óleo em termos de seus conteúdos de geraniol e geraniol acetato. Em gramíneas aromáticas existem dois importantes fatores que determinam o teor de óleo: a) há uma correlação negativa entre a produção de erva e o conteúdo de óleo e b) plantas aromáticas sob condições de estresse parcial acumulam uma maior quantidade de óleo em comparação com aquelas crescidas em condições normais o que se confirmou neste estudo em plantas de palmarosa (*Cymbopogon martinii*).

2.3 Cumarinas

Em torno de 40% dos compostos fenólicos provêm da via do acetato, sendo os 60% restantes originados da rota do chiquimato. Devido à diversidade química e funcional, os compostos fenólicos têm grande interesse dos



pesquisadores em diversas áreas, como biologia, química, medicina, ecologia e agricultura (Siqueira et al., 1991).

Em relação à presença dos compostos fenólicos nas plantas, a maioria dos estudos relaciona esses compostos com estresses metabólicos, parede celular e exsudados de raízes e sementes. Contudo, eles servem também como pigmentos de flores, agem na proteção constitutiva contra pragas e doenças, funcionam como moléculas sinais e atuam como compostos alelopáticos, sendo componentes estruturais e funcionais da matéria orgânica do solo (Siqueira et al., 1991).

Entre os diversos compostos fenólicos existentes na natureza encontram-se as cumarinas. Abundantemente distribuídas no reino vegetal, de um modo geral, as cumarinas são derivadas da lactona do ácido o-hidroxicinâmico, usualmente conhecido como cumarina, sendo o representante mais simples a 1,2-benzapirona (cumarina).

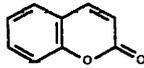
Com exceção da 1,2-benzapirona, todas as cumarinas são substituídas por um grupo hidroxila na posição 7. Esses grupos hidroxilas podem ser metilados ou glicosados. É também muito comum a prenilação em várias posições do esqueleto cumarínico, como, por exemplo, a prenilação no C₆ ou C₈ que origina as pirano ou furanocumarinas lineares e angulares, respectivamente. De acordo com Mann (1987), a biossíntese da cumarina e demais cumarinas se inicia com o ácido cinâmico, o qual provém da rota do ácido chiquímico.

Muitas pesquisas evidenciam que as cumarinas têm várias atividades biológicas. As mais comuns são atividades anti-neoplásica, efeito narcótico, hemostático, sedativo, espasmalítico, anticoagulante, analgésico, regulador hormonal (estrogênio) e vaso dilatador (Borges, 1987). As cumarinas também têm sido incluídas na lista de substâncias que têm efeito fitoregulador. A escopoletina é um exemplo de cumarina que, em concentrações diminutas, promove o crescimento vegetativo (Steward & Krikorian, 1971; Goren &

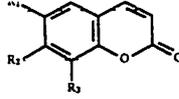
Tomer, 1971; Pereira, 1997). A Figura 1 mostra as principais classes de cumarina e alguns exemplos de seus derivados, enquanto a Figura 2 apresenta um esquema simplificado da rota de sua biossíntese.

Experiências com secagem revelaram que com o calor, mesmo à temperatura moderada de 40°C, a planta perde até 50% de seu teor de princípio ativo, a cumarina. A molécula de cumarina tem uma estrutura simples e o calor provoca a redução de seu teor na planta (GUACO-Biotecnologia – 21/06/2002).

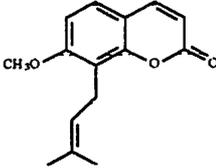
CUMARINAS SIMPLES



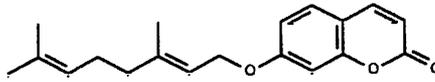
cumarina (1,2-benzopirona)



R1 = R3 = H, R2 = OH; umbeliferona
 R1 = R3 = H, R2 = OCH₃; hemiarina
 R1 = R2 = OH, R3 = H; esculetina
 R1 = OCH₃, R2 = OH, R3 = H; escopoletina
 R1 = OGlc, R2 = OH, R3 = H; esculina

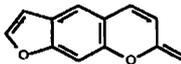


ostol (cumarina C-prenilada)

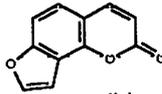


aurapteno (cumarina O-prenilada)

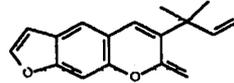
FURANOCUMARINAS



psoraleno
(linear)

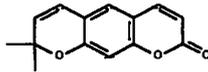


angelicina
(angular)

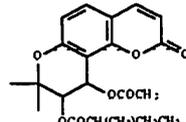


chalepensina
(linear, prenilada)

PIRANOCUMARINAS

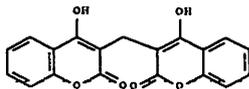


xantiletina (linear)



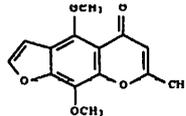
visnadina (angular)

CUMARINA DIMÉRICA



dicumarol

CROMONA



quelina (furanocromona)

FIGURA 1 – Tipos de cumarina. Adaptado de Simões & Spitzer (1999). UFLA, Lavras-MG, 2003.

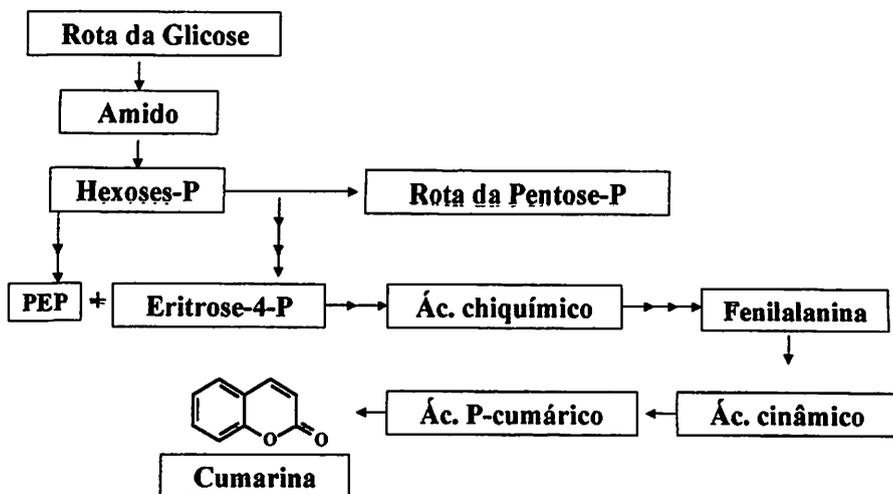


FIGURA 2 - Esquema de biossíntese de cumarina. UFLA, Lavras-MG, 2003.
Fonte: Castro, 2002.

2.4.O Guaco

2.4.1 A espécie

Mikania glomerata (guaco) é uma espécie medicinal pertencente à família das Asteráceas. O gênero *Mikania* é composto de aproximadamente 450 espécies distribuídas em regiões tropicais na América, África e Ásia. No Brasil a espécie é encontrada desde a Bahia à Santa Catarina (Veneziani et al., 1999). *Mikania glomerata* Sprengel é também conhecida como coração de Jesus, guaco liso, cipó caatinga e erva de cobra, além de guaco. É uma planta do tipo cipó-trepadeira, de ramos lenhosos, largas folhas pecioladas, cordiforme-deltóides, agudas no ápice e curto-cordiformes na base, 5-7 nervuras, margens 1-2 lobadas, lobos deltóides, glabras, panículas tirsoídes, capítulos sésseis reunidos em glomérulos glomosos ou oblongos no ápice dos ramúsculos; involuço de 3-4 mm, escamas pequenas liguladas, castâneas; corola infundibiliforme, limbo maior que o tubo; fruto aquênio cilíndrico e glabro; papus de 6 mm e 30 cerdas

vermelho-pálido flexuosas, flores brancacentas (Côrrea, 1984). Desenvolve-se bem em locais com clima ameno. Suas flores atraem abelhas e seu odor agradável, com leve aroma de baunilha, se torna mais intenso depois da chuva.

2.4.2 As propriedades terapêuticas

Há muito a medicina popular receita o guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*) para problemas respiratórios. Popularmente, o guaco é um dos fitoterápicos de maior consumo, utilizado principalmente nas afecções respiratórias. Entretanto, atualmente sabe-se que as propriedades fisioterápicas desta espécie nativa da Mata Atlântica vão muito além do seu uso popular (GUACO-Biotecnologia – 21/06/2002).

Estudos desenvolvidos no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp revelaram outros efeitos farmacológicos desta planta. Entre eles uma pesquisa iniciada em 1998 por uma equipe de professores da Unicamp. A pesquisa foi realizada com duas espécies de guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*) e dividida em três etapas, sendo que a primeira consistiu do cultivo controlado e em grande escala desta espécie, a segunda foi a extração e purificação do extrato, com o objetivo de identificar quimicamente suas substâncias ativas, e a terceira teve a finalidade de comprovar suas propriedades farmacológicas e toxicológicas.

Foi constatado, em animais de laboratório, que os extratos de guaco diminuíram as lesões ulcerativas resultante do uso prolongado de antiinflamatórios, abuso de bebidas alcoólicas e estresse, que respondem pela maioria dos casos de úlcera gastroduodenal. A atividade do guaco foi muito superior à de outras plantas utilizadas contra úlcera, como espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). Segundo os pesquisadores, isto é uma consequência da diminuição da liberação de ácido estomacal, provocada pela cumarina, princípio ativo responsável pelo odor de baunilha do guaco. Esta diminuição é

consequência do bloqueio dos receptores do neurotransmissor acetilcolina. Estes mesmos receptores estão presentes no sistema respiratório e sua estimulação, pela acetilcolina, produz broncoconstrição e aumento de secreção. Assim, o bloqueio desses receptores pelos princípios ativos do guaco provoca a broncodilatação e a diminuição da secreção brônquica. Portanto, o mesmo mecanismo envolvido na atividade antiulcerogênica do guaco é considerado responsável pela atividade broncodilatadora e anti-secretora que ele exerce no sistema respiratório.

Outras pesquisas, realizadas ainda pela Unicamp, revelaram que os extratos de guaco provocaram inibição do crescimento e a morte dos microrganismos responsáveis pela formação da placa bacteriana. Além disso, demais pesquisas revelaram que os extratos de guaco também inibiram o crescimento de fungos responsáveis pela candidíase.

A fase atual é de estudo de outras substâncias, como ácidos diterpênicos, nos princípios ativos do guaco que atuam contra o câncer. Tem sido testado também o extrato de guaco *in vitro* em cinco linhagens tumorais – mama, mama resistente a medicamentos conhecidos, melanoma, leucemia e pulmão. Os resultados apontaram uma forte ação inibidora do crescimento e morte das células tumorais humanas. Sua ação foi mais eficiente no melanoma, com 78% de morte de células. Nos demais tumores, o índice ficou entre 40% e 50%. Neste estudo, o pesquisador ressalta que a ação poderosa do guaco na morte de células cancerosa faz surgir uma preocupação quanto a uma possível toxicidade para as células normais, o que ainda não foi avaliado (GUACO-Biotecnologia, 21/06/2202). Outra etapa dessa pesquisa expande para quatro outros tipos de tumor – próstata, ovário, rim e cólon – e também envolve a utilização de modelos de teste *in vivo* com animais de laboratório.

Outros estudos também têm sido realizados com o objetivo de avaliar a atividade dos extratos de guaco como regulador de fertilidade. Sá et al. (2003)

analisaram o efeito de altas doses do extrato de *Mikania glomerata* administrados durante o ciclo espermato gênico de ratos, sugerindo um possível papel desta planta como um potente agente na regulação da fertilidade masculina.

Como exposto acima, a espécie apresenta um grande potencial terapêutico, entretanto, a carência de estudos sobre as condições mais favoráveis para a síntese dos compostos de interesse justifica o desenvolvimento de pesquisas que visem compreender como os diferentes fatores do ambiente afetam a síntese desses compostos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais e condições experimentais

O presente trabalho foi conduzido de setembro de 2002 a fevereiro de 2003, em condições de casa de vegetação no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia na Universidade Federal de Lavras – UFLA, Minas Gerais localizada na região sul do estado de Minas Gerais a 918 m de altitude, latitude 21° 14' S e longitude 45°00 GRW. A média anual de temperatura do ar é de 19,4°C e as médias anuais de temperatura do ar máxima e mínima são, respectivamente, de 26,1°C e 14,8°C, sendo a precipitação total anual de 1529,7 mm (Brasil, 1992). De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima regional é do tipo Cwa, apresentando duas estações bem definidas: seca, com temperaturas mais baixas, de abril a setembro, e chuvosa, com temperaturas mais elevadas de outubro a março.

As mudas de guaco foram obtidas a partir de propagação vegetativa por meio de estacas com 15 cm, retiradas do terço médio dos ramos com um par de folhas e colocadas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) e mantidas por 55 dias no viveiro do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras – UFLA. O substrato utilizado foi o de PLANTMAX.

Após este período as plantas de guaco foram levadas para o viveiro do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia-UFLA e as estacas foram transplantadas em vasos de PVC com diâmetro de 20 cm e capacidade para 6 litros de substrato e tutoradas por meio de estacas de bambu. O substrato utilizado para o transplante em vasos foi composto de vermiculita, esterco bovino e terra de subsolo (Latosolo Vermelho Escuro-LVE), na proporção de 20:30:50. A vermiculita utilizada foi a de granulometria fina, com densidade

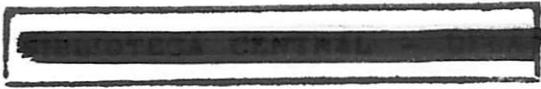
aparente de 125 kg/m³; o esterco bovino foi curtido e peneirado. A análise mineral do solo utilizado na composição do substrato encontra-se na tabela 1.

TABELA 1. Análise química do solo utilizado como substrato para transplante das mudas de guaco para os vasos.

PARÂMETROS	SUBSTRATO
pH em Água	6,2
P (mg/dm ³)	29,9
K (mg/dm ³)	222
Ca (cmolc/dm ³)	5,7
Mg (cmolc/dm ³)	1,9
Al (cmolc/dm ³)	0
H + Al (cmolc/dm ³)	1,1
SB (cmolc/dm ³)	8,2
t (cmolc/dm ³)	8,2
T (cmolc/dm ³)	9,3
V (%)	88,1
MO (dag/Kg)	0
P-rem (mg/L)	11,2

Análises realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo, do Departamento de Ciências do Solo da UFLA, 2003.

Nestas condições de viveiro, sob tela tipo sombrite, com redução de 50 % da radiação solar, as plantas de guaco permaneceram por 40 dias. Durante este período as plantas foram regadas diariamente, mantendo-se, assim, o substrato próximo à capacidade de campo. Após este período as plantas de guaco foram transferidas para casa de vegetação do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia-UFLA e submetidas a três regimes hídricos: rega diária (controle), rega a cada 5 dias a partir dos 3 meses de idade (estresse



3.2.2 Características anatômicas

Ao final do experimento, que correspondeu a 13 dias de suspensão total da rega para o estresse severo, foram retiradas amostras de raiz e folha de plantas de todos os tratamentos, para o estudo comparativo da estrutura anatômica de folha e raiz. Tal estudo foi realizado no Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia da UFLA.

A estrutura anatômica foliar foi estudada a partir de um par de folhas retiradas no terço médio da planta do quarto ao sétimo internó. Foram utilizadas para estas avaliações, 6 plantas de cada tratamento, perfazendo um total de 12 folhas por tratamento. As folhas assim coletadas foram fixadas em álcool etílico 70% e armazenadas até a realização dos cortes.

De cada folha foram extraídos fragmentos de 0,5 cm² da região mediana e com os quais foram efetuados os estudos anatômicos com base no exame microscópio de seções obtidas a mão livre. As seções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio, sendo, em seguida lavadas em água destilada, neutralizadas em água acética 1% e montadas em glicerina a 50%. O corante usado foi à mistura azul de astra-safranina seguindo os métodos descritos por Bukastsh (1972).

Para as avaliações relativas ao número médio de estômatos por mm², diâmetro polar e equatorial e número de células (epiderme da face abaxial), foram realizados cortes paradérmicos manuais. Os cortes foram realizados na região mediana das folhas, colocados sobre uma lâmina com safranina mais água glicerinada e observados com o auxílio de câmara clara, em microscópio Olympus CBB, segundo a técnica de Labouriau et al. (1961). As observações foram realizadas com 10 lâminas, sendo 4 campos de cada uma, totalizando 40 repetições por cada tratamento. O índice estomático (Si) foi calculado da seguinte maneira: $Si(\%) = [Sn / (Sn + Em)] \times 100$, sendo Sn o número de estômatos e o Em o número de células epidérmicas.

3.2.1 Potencial hídrico e trocas gasosas

Durante o período de indução do estresse severo, cuja duração foi de 13 dias, medições de trocas gasosas foram realizadas periodicamente com o uso de um analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA), modelo ADC-LCA-4 (Hoddesdon, UK), em todos os tratamentos. Foram avaliadas as seguintes características: taxa de fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), concentração de CO₂ intercelular (C_i), densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), temperatura da folha (T_f) e da cubeta (T) e umidade relativa (UR). A partir dos dados de umidade relativa e temperatura da cubeta, foram obtidos os valores de déficit de pressão de vapor da atmosfera da cubeta.

As avaliações foram feitas nos horários de 9 e 12 horas (hora solar), sempre nas mesmas folhas adultas e saudáveis, previamente escolhidas e marcadas no terço médio de cada planta. As avaliações seguiram-se a cada 3 dias a partir do dia de suspensão total da rega das plantas submetidas ao estresse severo, entretanto o primeiro dia de avaliação correspondeu ao segundo dia após a indução do estresse severo.

A avaliação do estado hídrico das plantas durante o período experimental foi realizada através de medidas do potencial hídrico foliar máximo, medido antes do amanhecer, nos mesmos dias de avaliação das trocas gasosas. Para isso, utilizaram-se folhas completamente expandidas, retiradas na mesma posição de cada planta, ou seja, no terço médio das mesmas. O potencial hídrico foliar máximo foi medido com auxílio de uma bomba de pressão (Soil Moisture – Modelo 3005). As características de trocas gasosas e potencial hídrico foram realizadas em 4 plantas, utilizando-se uma folha por planta.

3.2.2 Características anatômicas

Ao final do experimento, que correspondeu a 13 dias de suspensão total da rega para o estresse severo, foram retiradas amostras de raiz e folha de plantas de todos os tratamentos, para o estudo comparativo da estrutura anatômica de folha e raiz. Tal estudo foi realizado no Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia da UFLA.

A estrutura anatômica foliar foi estudada a partir de um par de folhas retiradas no terço médio da planta do quarto ao sétimo internó. Foram utilizadas para estas avaliações, 6 plantas de cada tratamento, perfazendo um total de 12 folhas por tratamento. As folhas assim coletadas foram fixadas em álcool etílico 70% e armazenadas até a realização dos cortes.

De cada folha foram extraídos fragmentos de $0,5 \text{ cm}^2$ da região mediana e com os quais foram efetuados os estudos anatômicos com base no exame microscópio de seções obtidas a mão livre. As seções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio, sendo, em seguida lavadas em água destilada, neutralizadas em água acética 1% e montadas em glicerina a 50%. O corante usado foi à mistura azul de astra-safranina seguindo os métodos descritos por Bukastsh (1972).

Para as avaliações relativas ao número médio de estômatos por mm^2 , diâmetro polar e equatorial e número de células (epiderme da face abaxial), foram realizados cortes paradérmicos manuais. Os cortes foram realizados na região mediana das folhas, colocados sobre uma lâmina com safranina mais água glicerinada e observados com o auxílio de câmara clara, em microscópio Olympus CBB, segundo a técnica de Labouriau et al. (1961). As observações foram realizadas com 10 lâminas, sendo 4 campos de cada uma, totalizando 40 repetições por cada tratamento. O índice estomático (S_i) foi calculado da seguinte maneira: $S_i(\%) = [\text{Sn}/(\text{Sn} + \text{Em})] \times 100$, sendo Sn o número de estômatos e o Em o número de células epidérmicas.

Para medições das espessuras das epidermes abaxial e adaxial e dos parênquimas paliádico e lacunoso foram feitos cortes transversais, os quais foram submetidos ao processo de dupla coloração com safranina – azul de astra na proporção 7:3, segundo Bukastsh (1972). As observações foram realizadas através do preparo de 5 lâminas com visualização de 3 medições em cada lâmina perfazendo um total de 15 repetições por tratamento.

Para o estudo da anatomia de raiz, foram utilizadas raízes de 3 plantas de cada tratamento escolhidas aleatoriamente, as quais foram previamente lavadas em peneiras, acondicionadas e fixadas com soluções de FAA-70 (formaldeído + ácido acético + álcool etílico 70%) por 48 horas e depois conservadas em solução álcool 70%.

As técnicas para confecção das lâminas para os cortes de raiz seguiram as mesmas utilizadas para os cortes transversais de folhas. Os cortes foram feitos na região da raiz em estrutura primária de crescimento. As características avaliadas nas raízes foram: espessura da epiderme, espessura do córtex, diâmetro do cilindro vascular e diâmetro de elementos de vaso.

Para medição de espessura da epiderme, espessura do córtex e diâmetro do cilindro vascular foram feitas 6 lâminas, sendo duas medições por lâmina, totalizando um total de 12 repetições por tratamento; para medição de diâmetro de elementos de vaso foram utilizadas 3 lâminas com 4 medições por tratamento resultando um total de 12 repetições por tratamento.

3.3 Caracterização e quantificação de compostos químicos

3.3.1 Teor de óleo essencial e composição química

Para extração dos componentes voláteis das folhas de guaco, foram utilizadas duas plantas de cada tratamento. A coleta do material foi feita entre 7:30 e 9:00 hs da manhã.

Foram utilizados 50 gramas de folhas frescas de guaco para 700 mL de água destilada, as quais foram submetidas à técnica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por uma hora. Esta técnica consiste em promover o aquecimento, até a ebulição, de um balão contendo a planta e a água destilada. Desse modo, a mistura de vapores produzida é conduzida através do aparelho de Clevenger modificado, onde ocorre a condensação dos vapores, sendo o hidrolato (mistura água/óleo essencial) recolhido em um tubo coletor do aparelho. Tal procedimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da UFLA.

Cerca de 100 mL de hidrolato, recolhidos de cada hidrodestilação, foram então submetidos à extração do óleo com 3 porções de 25 mL de diclorometano em funil de separação. Os extratos orgânicos provenientes deste fracionamento foram reunidos e secos com uma pequena porção de sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples e o solvente evaporado em rotavapor.

Os produtos obtidos da rotaevaporação foram transferidos para frascos de vidro de 30 mL e levados à estufa a 30°C até a completa evaporação do solvente, sendo então determinado o teor percentual do óleo. A seguir os frascos contendo o óleo foram recobertos por papel alumínio e mantidos em geladeira até o momento da sua análise química.

Para análise química do óleo de guaco, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) em cromatógrafo HP-5890, sob as seguintes condições de operação: coluna HP Ultra 2 (25 x 0,2 mm x 0,33 µm), temperatura do injetor 250°C, gás de arraste hélio (1mL/min), razão de split 1:20, energia de impacto eletrônico 70 eV com programação de temperatura : 45°C/2 min, 5°C/min até 280°C. Para a caracterização, os espectros obtidos foram comparados com a biblioteca Wiley 275 PBM Format e os padrões de similaridades estruturais foram relacionados.

3.3.2 Extração e quantificação da cumarina

A extração da cumarina foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia - UFLA e a quantificação na Estação da EPAMIG-UFLA. Para extração e quantificação da cumarina foram utilizadas 3 plantas por tratamento. As folhas de toda a planta foram coletadas entre 7:30 e 9:00 da manhã. As folhas foram armazenadas em sacos de papel, devidamente identificadas e colocadas para secar em estufa a 35°C até peso constante. Em seguida, a matéria seca foi triturada em moinho até o diâmetro de 48 mesh.

A metodologia de quantificação da cumarina em *Mikania glomerata* (Figura 4) foi desenvolvida por Celeghini et al. (1996). Amostras de um grama de matéria seca foram submetidas à extração em 10 mL de solução etanol/água (1:1 v/v) por 10 minutos, utilizando-se ultra-som. O extrato foi filtrado em papel de filtro e posteriormente, analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo usado foi da marca Shimadzu, modelo LC-10 AD com detector espectrofotométrico de absorbância UV e visível (arranjo de dados SPDM-M10A). Foi utilizada uma coluna de fase reversa metasil 5 u C18 ODS, partícula de 5µm (250 x 4.6 mm d.i.). A acetonitrila/água (40:60 v/v) foi usada como fase móvel e o fluxo foi de 1 mL/minuto, sendo 254 nm o comprimento de onda máximo empregado na análise.

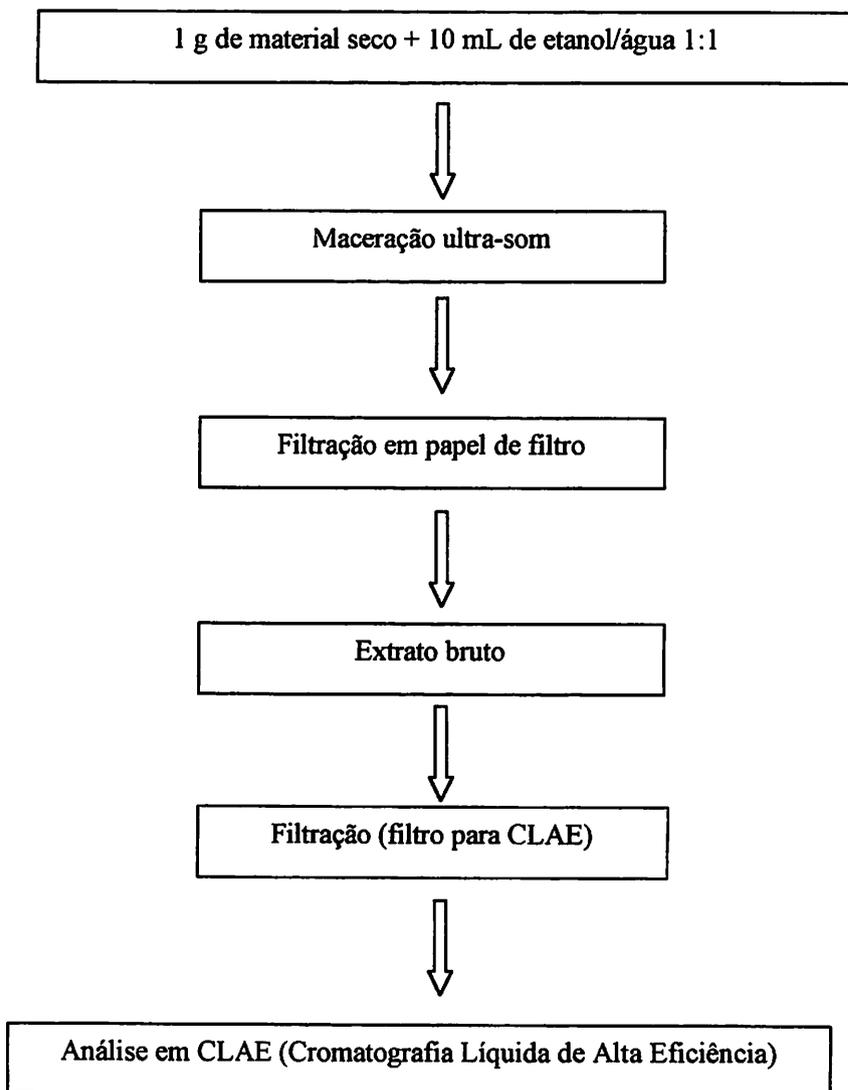


FIGURA 4. Esquema da metodologia usada para análise de cumarina em *Mikania glomerata*. UFLA, Lavras-MG, 2003. Fonte: Castro, 2002.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microclima

Conforme pode ser observado na Figura 5, durante o período de avaliação experimental de trocas gasosas, caracterizado por dias após a suspensão da rega (DASR) das plantas submetidas ao estresse severo, a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) situou-se na faixa de $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pela manhã (nove horas), enquanto ao meio dia variou entre 1200 a $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O déficit de pressão de vapor (DPV) permaneceu praticamente constante durante a manhã, em torno de 2 kPa. Ao meio-dia as oscilações foram mais acentuadas, variando de 2,5 a valores próximos de 4 kPa. Estes dados indicam que os dois horários de observação eram típicos de diferentes demandas evaporativas da atmosfera.

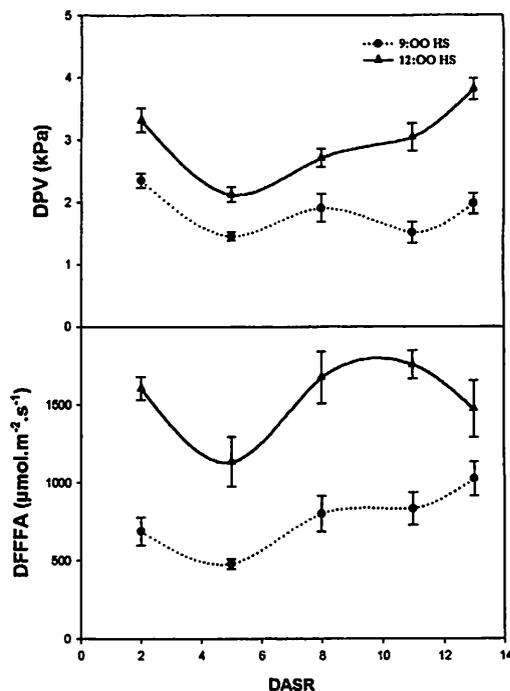


FIGURA 5. Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) e déficit de pressão de vapor (DPV) durante o período experimental, caracterizado por dias após a suspensão da rega (DASR) de plantas de *Mikania glomerata* Sprengel, submetidas ao estresse hídrico severo. Cada ponto representa a média de 12 repetições \pm erro padrão. UFLA, Lavras-MG, 2003.

4.2 Potencial Hídrico

As avaliações de potencial hídrico foliar máximo das plantas de guaco (Figura 6) indicaram um comportamento distinto entre os tratamentos submetidos aos diferentes regimes hídricos. Foi observado que as plantas submetidas à rega diária (controle) apresentaram valores médios de potenciais hídricos aproximadamente constantes em torno de $-0,25$ MPa durante todo o decorrer do período de avaliação das trocas gasosas, enquanto para as plantas submetidas ao estresse hídrico moderado, foram observados valores de potenciais hídricos que variaram entre $-0,75$ a $-0,35$ MPa. As oscilações

observadas neste tratamento são associadas ao efeito da rega realizada com intervalos de 5 dias com subsequente recuperação. Já para as plantas submetidas à suspensão total da rega (estresse hídrico severo), verifica-se um decréscimo contínuo do potencial hídrico, atingindo um valor médio de $-1,5$ MPa no final do experimento, indicando que não houve nesse período indução de mecanismos que contribuíssem para a manutenção do estado hídrico, como por exemplo, um ajustamento osmótico, como foi observado em quinóia (*Chenopodium quinoa*) (Jensen et al., 2000) sob condição de estresse hídrico severo.

Nota-se nas plantas submetidas ao estresse hídrico severo, que a redução do potencial hídrico é mais acentuada a partir do oitavo dia após a suspensão total da rega. Estes resultados indicam que o regime hídrico afetou o estado hídrico das plantas, sendo que no tratamento estresse hídrico moderado, a frequência da rega permitiu uma manutenção do potencial hídrico das plantas em valores acima de $-0,8$ MPa, que não caracteriza uma condição de murcha severa, como foi observado nas plantas do estresse hídrico severo ao atingirem valores médios de potenciais em torno de $-1,5$ MPa.

Plantas submetidas a um estresse hídrico moderado geralmente apresentam um ajustamento osmótico como resposta de adaptação a um estresse hídrico, como relatado em estudos com trigo (*Triticum* sp), copaiba (*Copaifera langsdorffii*) e acerola (*Malpighia emarginata*) (Vilela & Moraes, 1986; Prado, 1991 e Nogueira et al., 2001). O ajuste osmótico é uma resposta adaptativa das plantas e tem grande importância na manutenção do crescimento, aumentando a sobrevivência das plantas durante períodos de seca (Begg & Turner, 1976; Nogueira, 2001).

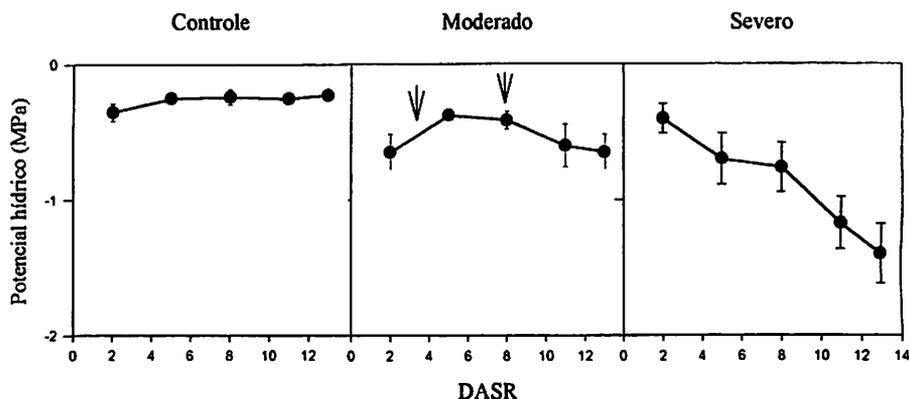


FIGURA 6. Potencial hídrico foliar antes do amanhecer dias após a suspensão (DASR) total da rega de plantas de *Mikania glomerata* Sprengel, submetidas a diferentes regimes hídricos. A seta indica o dia de rega no tratamento estresse hídrico moderado. Cada ponto representa a média de 4 repetições \pm erro padrão. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Observa-se também, na Figura 6, que plantas submetidas ao estresse hídrico moderado (rega a cada 5 dias) no segundo dia de avaliação recuperaram o potencial hídrico com níveis próximos do tratamento com rega diária (controle). Este dia de avaliação corresponde a 48 horas após a última rega deste tratamento. Entretanto, entre o terceiro e o quarto dias de avaliação das trocas gasosas, quando as plantas submetidas ao estresse hídrico moderado foram novamente irrigadas, as mesmas não apresentaram recuperação do seu potencial hídrico, o que pode ter sido devido a maiores níveis de radiação e elevados valores de DPV, registrados neste período (Figura 5). Estes dados mostram os efeitos do DPV e altos níveis de radiação sobre o estado hídrico destas plantas, o que sugere que o nível de irrigação neste período não foi suficiente para compensar as perdas de água através da transpiração neste período. Outro aspecto a ser destacado é que, sob condições de casa de vegetação, à medida que a radiação solar aumenta, a temperatura se eleva e a umidade atmosférica

diminui. Assim, as respostas dos diversos processos metabólicos da planta refletem a integração de todos estes fatores, e cada um deles, individualmente, tem sua ação sobre o processo considerado (Medina et al., 1999).

4.3 Trocas gasosas

A Figura 7 ilustra os resultados obtidos para trocas gasosas nos horários de 9 e 12 horas ao longo do período de suspensão da rega para as plantas submetidas ao estresse severo. A condutância estomática para os tratamentos com rega diária (controle) e rega a cada 5 dias (estresse hídrico moderado), em geral apresentaram valores mais elevados no horário das 9 horas do que no horário de 12 horas, indicando assim um comportamento de resposta estomática em função da demanda evaporativa da atmosfera, níveis de radiação e temperatura do ar. Diversos autores relatam comportamento semelhante em condições em que não há restrições de oferta de água (Tenhuen et al., 1987; Quick et al., 1992; Machado et al., 1994; Syvertsen & Lloyd, 1994; Brakke & Allen, 1995; Tognetti, 1998; Medina & Machado, 1998; Medina et al., 1999). O fechamento parcial dos estômatos em resposta ao aumento do DPV e da temperatura é considerado uma adaptação evolutiva para a conservação da água, principalmente em regiões onde há alta demanda evaporativa da atmosfera (Quick et al., 1992; Syvertsen & Lloyd, 1994; Bohnert & Jensen, 1996; Oliveira, 2002). Em relação ao estresse severo, embora no período inicial de indução do estresse (até 5 DASR) seja observado um comportamento semelhante aos outros tratamentos em resposta à variação da demanda evaporativa da atmosfera, nota-se a partir do quinto dia após a suspensão total da rega, que a condutância reduz gradativamente, atingindo valores próximos de zero em ambos os horários de avaliação, em função dos dias sem irrigação.

Com relação à transpiração, os maiores valores foram observados para as plantas submetidas à rega diária, sendo que, em geral, as condições

microclimáticas não alteraram a taxa transpiratória. As plantas submetidas ao estresse hídrico severo apresentaram taxas de transpiração praticamente nulas no final do experimento, provavelmente devido aos baixos valores de potencial hídrico nestas plantas. Por esses resultados pode-se inferir que o comportamento estomático ao longo desse estresse hídrico severo dependeu mais do potencial da água da folha e de sua relação com o potencial da água do solo do que de outros fatores do ambiente, tais como luz e umidade relativa, concordando com resultados encontrados em Sivukumar & Shaw (1978) e Nogueira et al. (2001).

As plantas submetidas ao regime de rega diária apresentaram valores médios de fotossíntese entre 2 e 7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no horário das 9 horas e 2,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no horário de 12 horas, uma queda que pode ser atribuída a um fechamento estomático no horário de maior demanda evaporativa da atmosfera, como observado também por diversos autores em outros estudos (Medina Machado, 1998; Medina et al., 1999).

No estresse hídrico moderado, observaram-se valores médios de fotossíntese com variações mais acentuadas em ambos os horários de avaliação. No horário de 9 horas, os valores variaram de 4 a 7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e no horário de 12 horas de 1 a 7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para o estresse hídrico moderado as taxas fotossintéticas não apresentaram grandes diminuições para o horário de maior demanda evaporativa da atmosfera, revelando, portanto, uma manutenção de uma taxa fotossintética geralmente superior em relação ao controle. Este comportamento foi verificado também em estudos realizados por Medina et al. (1999), que sugeriram que o fechamento parcial dos estômatos e a alta disponibilidade de radiação e de água resultam em uma diminuição da fotossíntese, com implicações sobre a produção.

Observa-se também que os maiores valores médios de fotossíntese encontrados nas plantas submetidas ao estresse moderado coincidiram com o dia subsequente a rega, sugerindo uma possível relação positiva entre o potencial

hídrico foliar e a recuperação da fotossíntese. Este comportamento de fotossíntese em plantas submetidas ao estresse hídrico moderado foi constatado também por Brestic et al. (1995). Pode ser que as plantas submetidas ao estresse hídrico moderado desenvolvam mecanismos de adaptação à seca permitindo-lhes uma melhor estruturação de tecidos do mesófilo adquirindo assim, uma maior capacidade fotossintética, principalmente no horário de maior demanda evaporativa da atmosfera. Esta condição pode ser um resultado de diferenciações nas características anatômicas foliares desenvolvidas ao longo do período de estresse hídrico moderado, fato também observado por Chartzoulakis et al. (1999).

Já as plantas submetidas ao estresse hídrico severo apresentaram um acentuado declínio nas taxas de fotossíntese a partir do oitavo dia após a suspensão da rega, atingindo valores próximos de zero em ambos os horários de avaliação das trocas gasosas, coincidindo também com uma forte diminuição do potencial hídrico foliar. Medina et al. (1999) explicaram o comportamento da fotossíntese durante períodos de seca em função do balanço hídrico, ou seja, com a intensificação de um balanço hídrico cada vez menor, o potencial hídrico da planta torna-se também cada vez menor e o aparato estomático progressivamente mais fechado, principalmente durante a 2ª metade do dia.

A diminuição nas taxas de fotossíntese foi associada ao fechamento estomático devido às alterações ocorridas no estado hídrico das plantas submetidas à deficiência hídrica. Com a evolução do estresse hídrico, tanto a fotossíntese quanto a condutância estomática decaíram progressivamente com o ciclo de estresse hídrico juntamente com o potencial hídrico medido antes do amanhecer. Também Brakke & Allen (1995) e Medina & Machado (1998) associaram as quedas nas taxas de fotossíntese com elevadas temperaturas e altos déficits de pressão de vapor com intensificação desses efeitos quando houve deficiência hídrica no solo.

Em geral, sob deficiência hídrica a queda na taxa de fotossíntese inicialmente é devida ao fechamento dos estômatos, o que minimiza a perda de água pela transpiração (Chaves, 1991; Regina & Carbonneau, 1996; Medina et al., 1999; Moriana et al., 2002). No entanto, o fechamento estomático tem conseqüências complexas, requerendo ajustamento nos níveis de fotossíntese e respiração, alterando fluxo de íons, nutrientes e mudanças na alocação de carbono e nitrogênio. Reduzindo ou anulando a transpiração, o sistema de conversão de energia nos cloroplastos é afetado, devido ao CO₂ tornar-se um fator limitante e às reações dependentes da água tornarem-se menos efetivas. A condição resultante chamada fotoinibição pode levar a prejuízos irreversíveis nos compartimentos do cloroplasto (Bohnert & Jensen, 1996). Além disso, baixos valores de potencial hídrico impedem imediatamente o processo fotossintético, principalmente devido ao prejuízo causado ao transporte eletrônico e a fosforilação oxidativa (Chartzoulakis et al., 1999, Chartzoulakis et al., 2002).

Nas plantas submetidas ao regime de rega diária e estresse hídrico moderado, a concentração de CO₂ intercelular apresentou-se relativamente constante em ambos os horários de avaliação de trocas gasosas respondendo a variações de condutância estomática. De um modo geral, quando a condutância estomática diminui, aumenta a concentração de C_i. Este comportamento foi observado com acentuada nitidez nas plantas submetidas ao estresse hídrico severo nas plantas de guaco, principalmente a partir do oitavo dia após a indução do estresse severo. Oliveira et al. (2002) verificaram aumento de C_i sob baixos valores de condutância estomática quando o potencial de água da folha diminuiu para -1,9 MPa em plantas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunt). Machado et al. (1999) sugeriram que o aumento da concentração interna de CO₂, sob baixos valores de potencial de água na folha, pode estar relacionado à queda na atividade de enzimas envolvidas no processo de fixação de CO₂, concordando

com Brodribb (1996), o qual atribuiu este fato a uma diminuição da atividade da rubisco devido a efeitos diretos de desidratação nas funções do cloroplasto.

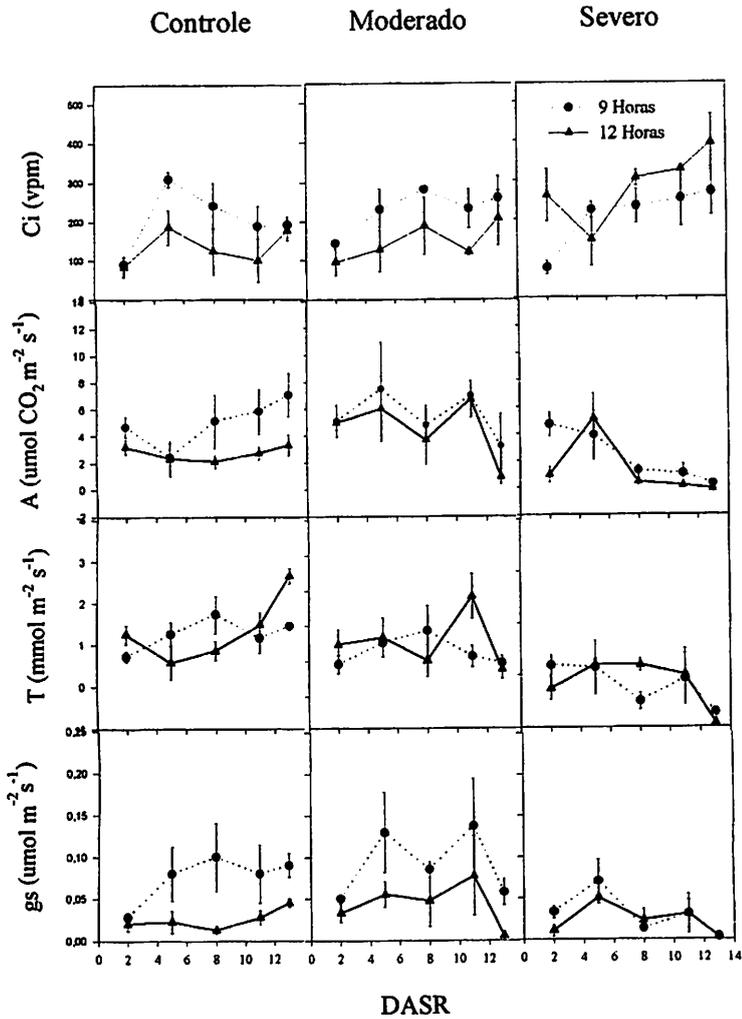


FIGURA 7. Condutância estomática (gs), transpiração (T), Fotossíntese (A) e concentração de CO₂ intercelular (Ci) avaliados durante o período experimental, caracterizado por dias após a suspensão total da rega (DASR) no tratamento do estresse severo de plantas de *Mikania glomerata* Sprengel, submetidas a diferentes regimes hídricos. Cada ponto representa a média de 4 repetições ± o erro padrão. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Em todos os tratamentos, também foi observada uma estreita relação entre a assimilação de CO₂, a transpiração e a condutância estomática em ambos os horários de avaliação, ou seja, uma maior condutância estomática correspondeu a uma maior transpiração nas plantas de guaco submetidas aos diferentes regimes hídricos e, conseqüentemente, a uma maior taxa de assimilação de CO₂. A forma como a taxa de assimilação de CO₂ relaciona-se com a condutância estomática tem importância ecológica, pois se a assimilação e a condutância variam proporcionalmente, numa relação linear, é possível que a concentração interna de CO₂ e a eficiência no uso da água (razão entre assimilação de CO₂ e transpiração) se mantenham constantes, no sentido de otimização das trocas gasosas (Schulze & Hall, 1982).

4.4 Características anatômicas

4.4.1 Efeitos de diferentes regimes hídricos na anatomia foliar

Para as características número de células e índice estomático, foram verificadas diferenças entre os tratamentos (controle, estresse moderado e estresse severo), sendo encontrado o maior número de células nas folhas das plantas submetidas ao estresse hídrico moderado e maior índice estomático nas plantas submetidas ao estresse severo (Tabela 2). Estes resultados demonstram que na folha de guaco é possível sugerir que, além da alteração na expansão celular, a taxa de diferenciação dos estômatos seja influenciada pelos diferentes regimes hídricos.

Para o número de estômatos, os maiores valores foram verificados nas plantas submetidas ao estresse moderado e severo, o que pode ter contribuído para uma rápida redução das taxas de transpiração em ambos os horários de avaliação das trocas gasosas destas plantas. Além disso, um maior número de estômatos pode favorecer a difusão de CO₂ da atmosfera, aumentando, assim, a

taxa fotossintética em condições em que os estômatos encontram-se parcialmente fechados. Com relação ao diâmetro polar e equatorial dos estômatos não foram verificadas diferenças entre os tratamentos das plantas de *Mikania glomerata* Sprengel (Tabela 2).

TABELA 2. Número de células, número de estômatos e índice estomático, diâmetro polar e equatorial dos estômatos de plantas de guaco submetidas a diferentes regimes hídricos. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Tratamento	Número de células /mm ²	Número de estômatos /mm ²	Índice estomático %	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)
Controle	1022,310 c	162,801 b	13,809 c	2,890 a	2,317 a
Moderado	1255,410 a	216,450 a	14,819 b	2,891 a	2,320 a
Severo	1164,020 b	226,070 a	16,288 a	3,011 a	2,330 a

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste de Tukey à nível de 5% de probabilidade.

A Figura 8 apresenta fotomicrografias de seções paradérmicas da epiderme abaxial das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) submetidas a diferentes regimes de rega. Nota-se, então, que as plantas submetidas aos diferentes regimes de rega não apresentaram diferenças com relação às características de células epidérmicas em todos os tratamentos. Estas células apresentaram forma poligonal variável, com paredes sinuosas espessadas, como também observado por Castro (2002), trabalhando com guaco sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento.

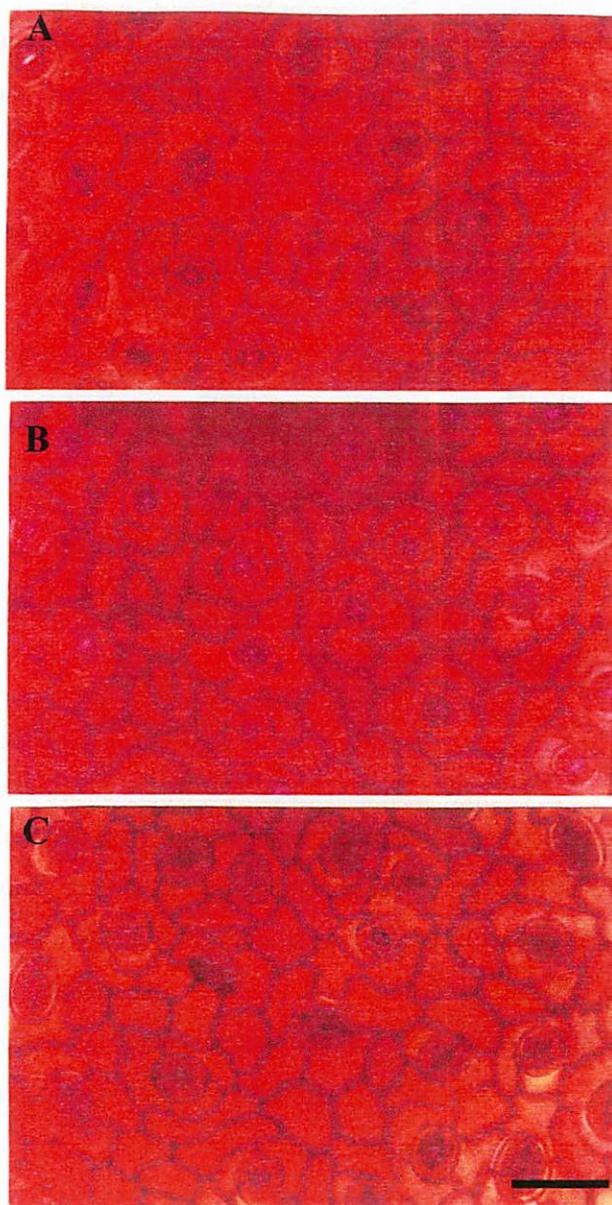


FIGURA 8. Vista frontal da epiderme abaxial da folha de *Mikania glomerata* Sprengel submetida a diferentes regimes hídricos: controle (A), moderado (B) e severo (C). A barra corresponde a 50 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2003.

TABELA 3. Espessuras da epiderme abaxial, parênquima lacunoso, parênquima paliçádico, epiderme adaxial e limbo foliar das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel submetidas a diferentes regimes hídricos.

Tratamento	Epiderme Abaxial (μm)	Parênquima Lacunoso (μm)	Parênquima Paliçádico (μm)	Epiderme Adaxial (μm)	Limbo Foliar (μm)
Controle	12,688 ab	121,728 ab	69,776 a	23,152 ab	227,344 ab
Moderado	11,568 b	134,832 a	72,048 a	22,608 b	241,056 a
Severo	13,632 a	118,256 b	55,552 b	24,688 a	212,128 b

Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Como apresentado na Tabela 3, as plantas de guaco apresentaram diferenças nas características de espessuras de parênquima paliçádico, lacunoso e espessura total do limbo. Embora estatisticamente não tenham ocorrido diferenças entre as plantas submetidas ao regime de rega diária (controle) e regime de rega a cada 5 dias (estresse moderado), as plantas submetidas ao estresse moderado apresentaram valores superiores de espessuras de parênquima paliçádico e esponjoso e espessura total do limbo. Isto pode ter ocorrido devido a uma aquisição de um mecanismo adaptativo desenvolvido a longo prazo de um estresse moderado, conferindo-lhe alterações anatômicas foliares, às quais propiciaram uma estrutura de tecido adequada para uma maior capacidade fotossintética, sobretudo sob condições de altas temperaturas e elevados déficits de pressão de vapor na atmosfera.

De acordo com Bray (1997), uma gradativa perda de água pode permitir uma aclimação para a deficiência hídrica e limitar a extensão de injúrias, enquanto uma rápida proporção de perda de água pode prejudicar sua aclimação. Estas plantas submetidas ao estresse hídrico moderado podem apresentar uma vantagem sobre as plantas submetidas ao regime de rega diária com relação à tolerância a seca.

Já as plantas submetidas ao estresse severo obtiveram os menores valores de espessuras do parênquima paliçádico, lacunoso e espessura total do limbo, provavelmente devido à perda do volume celular como resultado da perda excessiva de água e desidratação. Se as plantas murcham, suas células se contraem com a diminuição proporcional do volume celular. Esta diminuição do volume celular e consequente redução de espessuras do limbo foliar podem ter refletido também uma baixa assimilação de CO₂, contribuindo assim para uma baixa taxa de condutância estomática e fotossíntese.

Chartzoulakis et al. (1999) também verificaram alterações anatómicas em oliveiras (*Olea europaea*) no mesofilo de cultivares de 'Mastoidis' e 'Koroneik', provocadas, provavelmente, pela deficiência hídrica à qual foram submetidas, resultando em distintos comportamentos de trocas gasosas entre essas cultivares. Na Figura 9 são apresentadas fotomicrografias de seções transversais das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel submetidas a diferentes regimes de rega. Também podem ser observadas diferenças na espessura do limbo foliar entre os tratamentos.

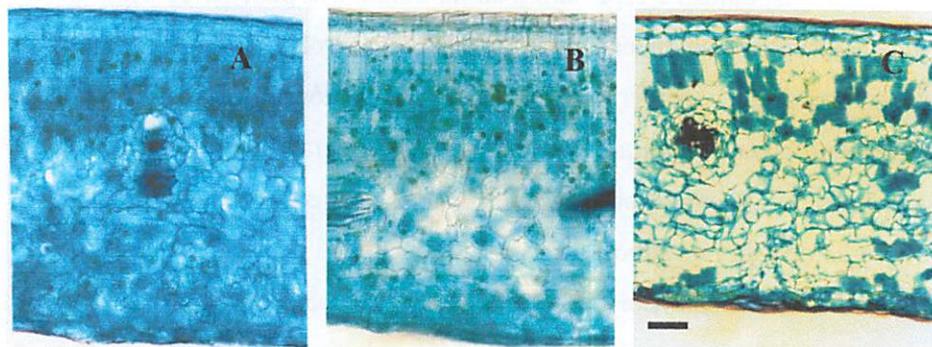


FIGURA 9. Seções transversais da folha de *Mikania glomerata* Sprengel, sob diferentes regimes hídricos: controle (A), moderado (B) e severo (C), apresentando alterações na espessura do mesofilo. A barra corresponde a 50 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2003.

As plantas submetidas ao estresse hídrico severo apresentaram maiores valores de espessura de epiderme adaxial quando comparadas às plantas controle e estresse moderado (Tabela 4). Observou-se também um maior espessamento da cutícula, principalmente na face adaxial (Figura 9), para uma maior proteção dos tecidos foliares, podendo levar a uma diminuição das injúrias causadas pela dessecação devido à suspensão total da rega. A espessura da cutícula é variável, sendo mais espessa nas plantas de ambiente seco, na maioria dos casos. Plantas que se desenvolvem sob deficiência hídrica tendem a apresentar cutícula mais espessa e pubescente. Em relação à epiderme abaxial, as plantas submetidas ao estresse moderado apresentaram uma menor espessura quando comparadas ao controle e ao estresse severo.

4.4.2 Efeitos de diferentes regimes hídricos na estrutura primária de raiz

A caracterização dos três sistemas de tecidos, dérmico, fundamental e vascular da raiz, em estrutura primária das plantas, pode fornecer importantes informações a partir da epiderme, córtex e cilindro vascular sobre mecanismos de adaptação à baixa disponibilidade hídrica do solo. Com relação às espessuras de epiderme da raiz, não foi verificada diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

TABELA 5. Médias de espessuras da epiderme, córtex e cilindro vascular de raiz de *Mikania glomerata* Sprengel, submetida a diferentes regimes hídricos. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Tratamentos	Espessura da epiderme (μm)	Córtex (μm)	Cilindro vascular (μm)
Controle	33,588 a	343,239 a	336,427 a
Moderado	34,797 a	269,005 b	275,675 b
Severo	36,344 a	220,095 b	295,054 ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Diferenças de espessuras de córtex e cilindro vascular foram observadas nas plantas de guaco entre os tratamentos submetidos ao estresse hídrico moderado e severo quando comparadas ao regime de rega diária.

As plantas submetidas ao regime de rega diária apresentaram as maiores espessuras tanto de córtex como de cilindro vascular em relação ao estresse moderado e severo. A redução na espessura do córtex observada nas raízes das plantas submetidas ao estresse hídrico moderado e severo pode ser devido à diminuição do potencial hídrico nas raízes, conduzindo a uma contração das células corticais, provocada pela diminuição do volume celular, como observado por Huang & Fry (1998) em cultivares de *Festuca arundinacea*, submetidas ao estresse de seca. As plantas submetidas ao estresse severo além de apresentarem diminuição na espessura do córtex, também desenvolveram a formação de espaços intercelulares. Isto pode favorecer para uma maior prevenção de perda de água da planta para o solo quando este tem diminuído o seu potencial hídrico abaixo do potencial hídrico da raiz (Huck et al., 1970).

As Figuras 10 e 11 apresentam as fotomicrografias com destaque para córtex e cilindro vascular das raízes de *Mikania glomerata* Sprengel submetida a diferentes regimes hídricos.

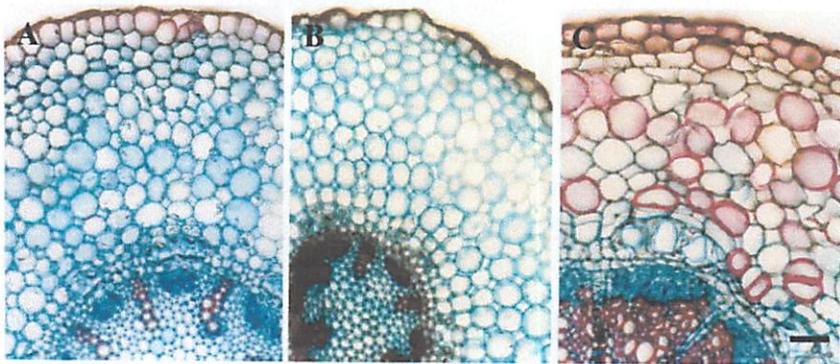


FIGURA 10. Seções transversais da raiz de plantas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), submetidas a diferentes regimes hídricos: controle (A), moderado (B) e severo (C) com destaque para espessura do córtex nos diferentes tratamentos. A barra corresponde a 50 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2003.

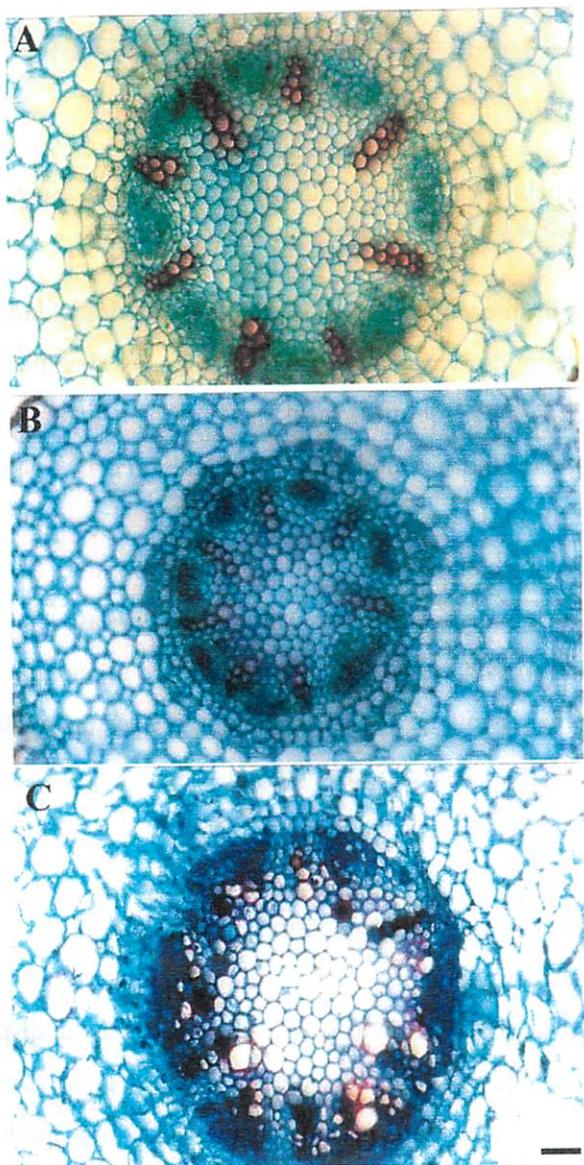


FIGURA 11. Seções transversais da raiz de plantas de guaco, submetidas a diferentes regimes hídricos: controle (A), moderado (B) e severo (C) apresentando alterações no diâmetro do cilindro vascular. A barra corresponde a 50µm. UFLA, Lavras-MG, 2003.

TABELA 6. Diâmetro do vaso do metaxilema da raiz de *Mikania glomerata* Sprengel, submetida a diferentes regimes hídricos. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Tratamento	Diâmetro do elemento de vaso (μm)
Controle	16,8 a
Moderado	13,0 b
Severo	15,3 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 6 apresenta as médias do diâmetro dos elementos de vaso e espessura de parede do vaso observadas nas raízes das plantas de guaco, submetidas a diferentes regimes hídricos. Foi verificado que as plantas submetidas ao estresse hídrico moderado apresentaram o menor valor médio em relação ao diâmetro dos elementos de vaso. Como observado por Vasellati et. al (2001), o diâmetro dos elementos de vaso do xilema diminuiu significativamente sob condições de deficiência hídrica. O diâmetro do vaso está positivamente correlacionado com o volume de água transportado e inversamente relacionado com a segurança do sistema de condução. Segundo Carlquist (1989), vasos com diâmetros mais estreitos mantêm uma coluna d'água sob alta tensão devido a terem uma maior superfície de contato para a razão do volume d'água e uma maior proporção de moléculas estarem ligadas à parede.

As plantas submetidas ao estresse hídrico moderado podem ter desenvolvido vasos com diâmetros mais estreitos ao longo de repetidos ciclos de seca, como aquisição de um mecanismo de adaptação à baixa disponibilidade de água do solo, mantendo, assim, um melhor uso da água sob condições de estresse hídrico. Isto contribuiu, provavelmente, para uma melhor resposta de tolerância à seca, possibilitando-lhes um sistema de condução de água mais eficiente.

4.5 Caracterização e quantificação de compostos químicos

4.5.1 Teor de óleo essencial e composição química

A Tabela 7 apresenta os dados dos rendimentos percentuais do óleo essencial de plantas de guaco, submetidas a diferentes regimes hídricos. A análise de variância revelou diferenças entre os tratamentos. Foi verificado que as plantas submetidas ao estresse hídrico moderado apresentaram os maiores rendimentos percentuais de óleo entre os tratamentos e as plantas submetidas ao estresse hídrico severo, os menores valores.

TABELA 7. Teor de óleo essencial para plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel submetida a diferentes regimes hídricos. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Tratamento	Rendimento de óleo essencial (%)
Controle	0,044 b
Moderado	0,077 a
Severo	0,036 c

As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De um modo geral, as plantas submetidas a um estresse hídrico tendem a aumentar o teor de óleos essenciais, como verificado por Penka (1978) em 15 espécies medicinais.

Comparando as plantas de guaco, submetidas aos diferentes regimes hídricos, foi verificado que as plantas submetidas ao estresse hídrico moderado obtiveram os maiores teores de óleo essencial, como observado em gramíneas por Singh et al. (1997), os quais também encontraram estes resultados em plantas de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). As plantas submetidas ao estresse hídrico severo tiveram os menores teores de rendimento de óleo, o que pode ter ocorrido provavelmente, devido à diminuição total do pool de metabólitos, em consequência também dos valores de fotossíntese próximos de zero atingidos por estas plantas, como resultado de uma deficiência hídrica

severa. Charles et al. (1990) também observaram que altos níveis de estresse hídrico reduziram fortemente a produção total de óleo das folhas de hortelã-pimenta. É provável que as plantas sob condições de regime de rega diária tenham tido um efeito diluidor do seu conteúdo de óleo.

Foi observado que a composição química do óleo das plantas de guaco, não variou nos diferentes regimes hídricos em relação aos seus constituintes químicos majoritários. As plantas de guaco submetidas aos diferentes regimes hídricos apresentaram a mesma composição química em relação aos compostos majoritários de acordo com a análise realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, independentemente do tipo do regime hídrico (Tabela 8). Este resultado também foi observado por Patumi et al. (2002) e Singh et al. (2002) segundo os quais os diferentes regimes de irrigação não afetaram a qualidade do óleo essencial em plantas de oliveiras (*Olea europaea*) e patchouli, respectivamente, além de estudos de Clark & Menary (1980) e Boira & Blanquer (1998).

A Figura 12 apresenta o cromatograma do óleo essencial de plantas de guaco submetidas ao regime de rega diária e a Figura 13 compara o espectro da amostra, no tempo de retenção de 23,52 a 23,62 minutos, amostra com o espectro de massa da biblioteca para inferir o percentual de semelhança entre o espectro da amostra e o espectro da biblioteca, que nesse tempo corresponde a 97% de semelhança em relação ao espectro da cumarina.

As Figuras 14 e 15 apresentam os cromatogramas das plantas de *Mikania glomerata* Sprengel submetidas ao regime de rega a cada 5 dias (estresse hídrico moderado) e suspensão total da rega (estresse severo), respectivamente.

Pode-se observar a partir das Figuras 12, 14 e 15 que os cromatogramas foram bastantes semelhantes entre si, não diferindo, portanto, a composição química do óleo essencial das plantas de *Mikania glomerata* Sprengel, entre os

diferentes regimes hídricos. Entre estes compostos caracterizados no óleo essencial do guaco, a cumarina, o ácido láurico e germacrene-D já foram confirmados também em outras pesquisas, como de Veneziani et al. (1999).

TABELA 8: Compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel, submetida a diferentes regimes hídricos analisados por CG/EM (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas). UFLA, Lavras-MG, 2003.

Composto	Tempo de retenção (min)	% de semelhança entre espectros	Fórmula molecular
Cumarina	23,52-23,62	97	C ₉ H ₆ O ₂
Germacrene-D	24,44-24,52	98	C ₁₅ H ₂₄
Biciclogermacrene	24,86-24,92	97	C ₁₅ H ₂₄
Ácido láurico	26,41-26,52	98	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Espatulanol	26,96-27,05	99	C ₁₅ H ₂₄ O

Como se pode observar, a maioria dos compostos caracterizados no óleo essencial das folhas de guaco são sesquiterpenos, como germacrene-D, biciclogermacrene e espatulanol, como também observado por Silva et al. (1984), sendo a cumarina um composto fenólico e o ácido láurico, um ácido graxo.

4.5.2 Efeitos dos diferentes regimes hídricos no teor de cumarina

A presença de cumarina (1,2-benzapirona) nas amostras de folhas de guaco foi mais uma vez confirmada pela comparação entre o padrão e a amostra sendo o tempo de retenção da cumarina de aproximadamente 7,3 minutos, como pode ser observado na Figura 16 e constatado em outros estudos com plantas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) (Castro, 2002; Veneziani et al., 1999 e Fierro et al., 1999).

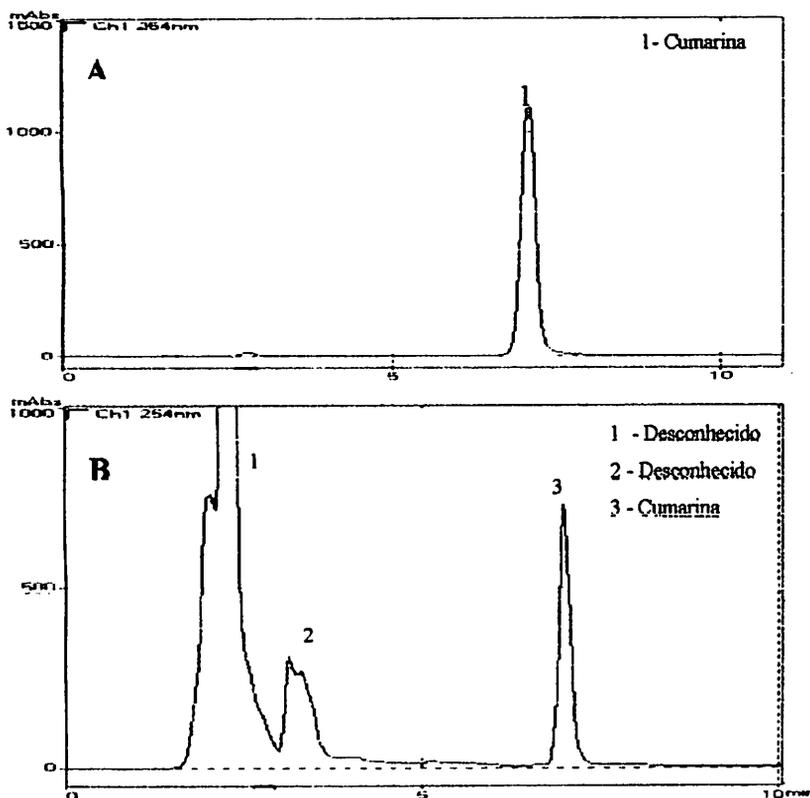


FIGURA 16: Cromatograma do padrão de cumarina (A) e da amostra de *Mikania glomerata* Sprengel (B). UFLA, Lavras-MG, 2003.

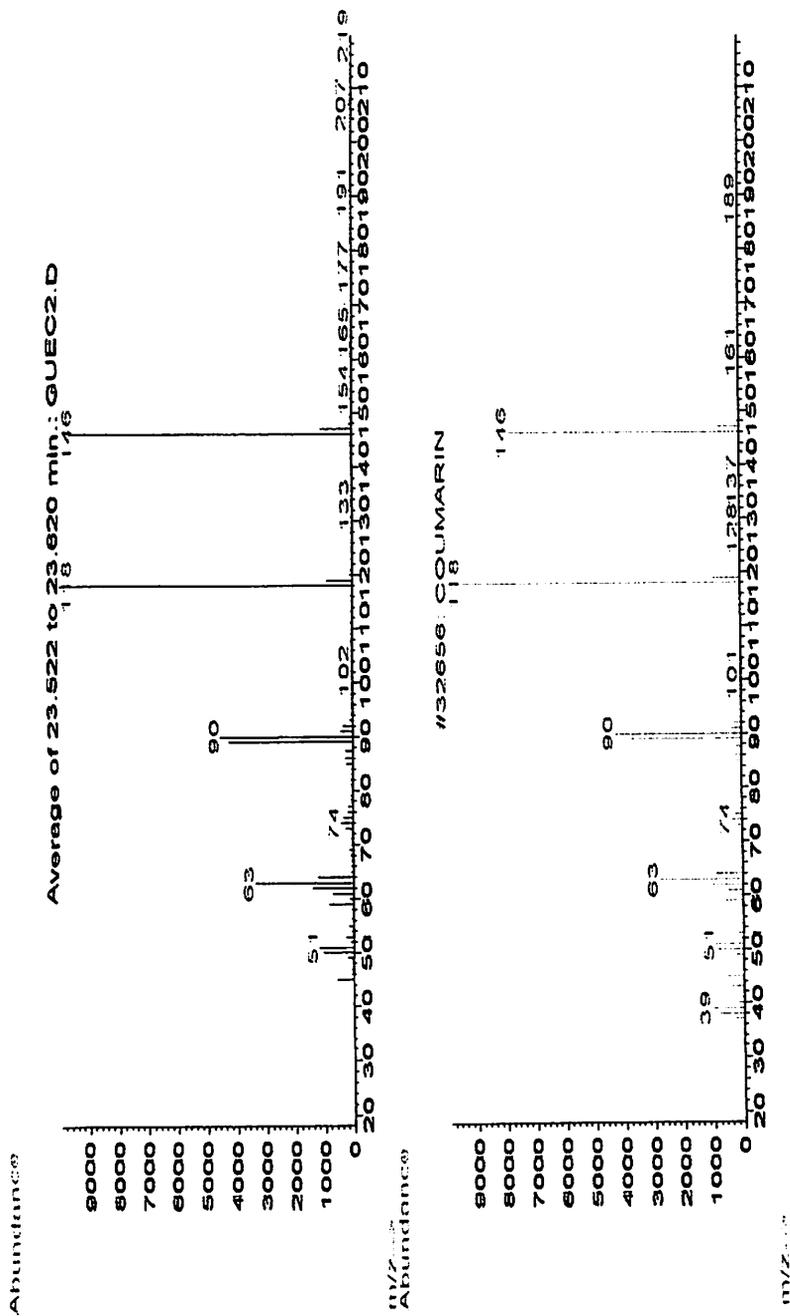


FIGURA 13: Comparação entre o espectro de plantas de *Mikania glomerata* Sprengel submetidas ao regime de rega diária e o espectro da biblioteca eletrônica no tempo de retenção de 23,52 a 23,62 minutos. UFPA, Lavras-MG, 2003.

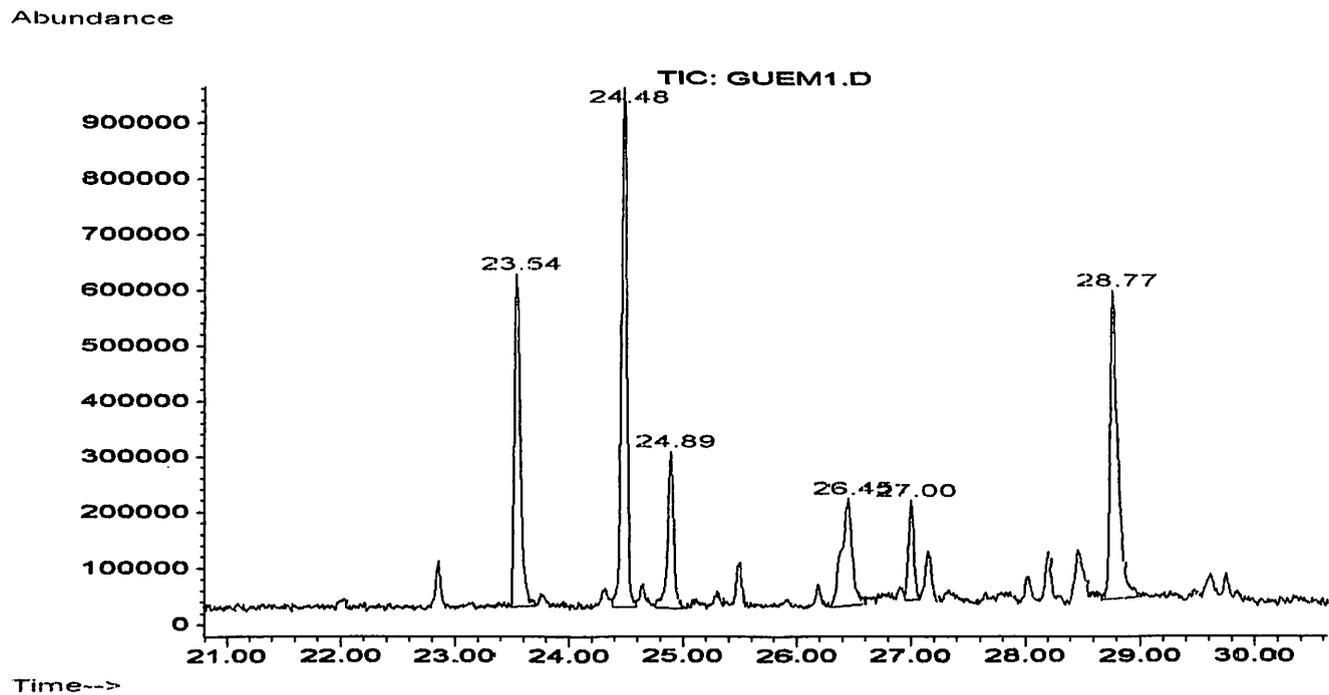


FIGURA 14: Cromatograma do óleo essencial de plantas de *Mikania glomerata* Sprengel submetidas ao regime de rega a cada 5 dias (estresse hídrico moderado). UFLA, Lavras-MG, 2003.

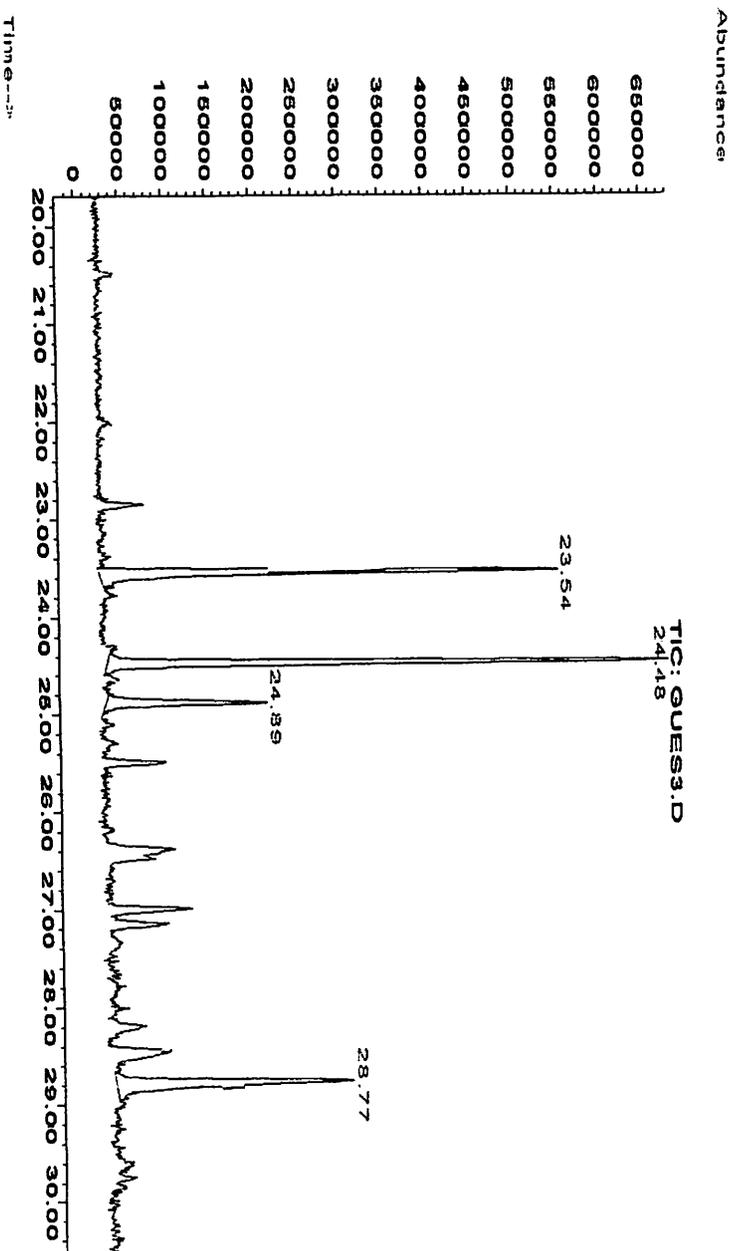


FIGURA 15: Cromatograma do óleo essencial das plantas de *Mikania glomerata* Sprengel submetidas ao regime de suspensão total da rega (estresse hídrico severo). UFPA, Lavras-MG, 2003.

4.5.2 Efeitos dos diferentes regimes hídricos no teor de cumarina

A presença de cumarina (1,2-benzapirona) nas amostras de folhas de guaco foi mais uma vez confirmada pela comparação entre o padrão e a amostra sendo o tempo de retenção da cumarina de aproximadamente 7,3 minutos, como pode ser observado na Figura 16 e constatado em outros estudos com plantas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) (Castro, 2002; Veneziani et al., 1999 e Fierro et al., 1999).

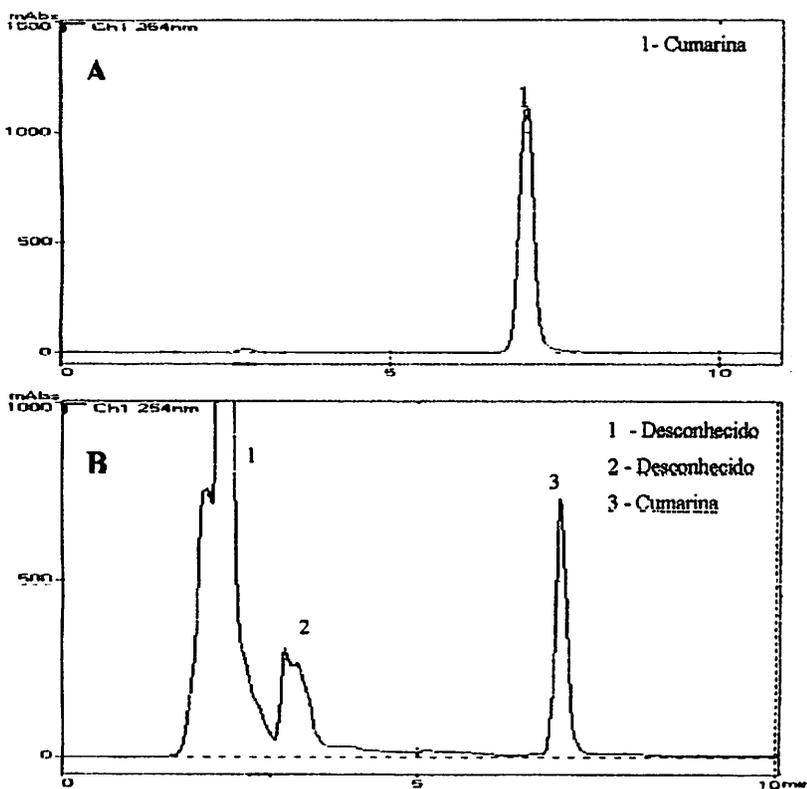


FIGURA 16: Cromatograma do padrão de cumarina (A) e da amostra de *Mikania glomerata* Sprengel (B). UFLA, Lavras-MG, 2003.

Um aumento nas áreas dos picos das amostras após a adição do padrão foi indicador da presença de cumarina no material analisado. As condições cromatográficas empregadas possibilitaram uma boa reprodutibilidade das áreas dos picos. Os teores de cumarina nas amostras foram calculados a partir da equação da reta, obtida através da curva de calibração (Figura 17). Uma relação linear entre a área do pico e a concentração de cumarina foi verificada para as diferentes soluções padrão testadas (0,0-0,6 mg/mL).

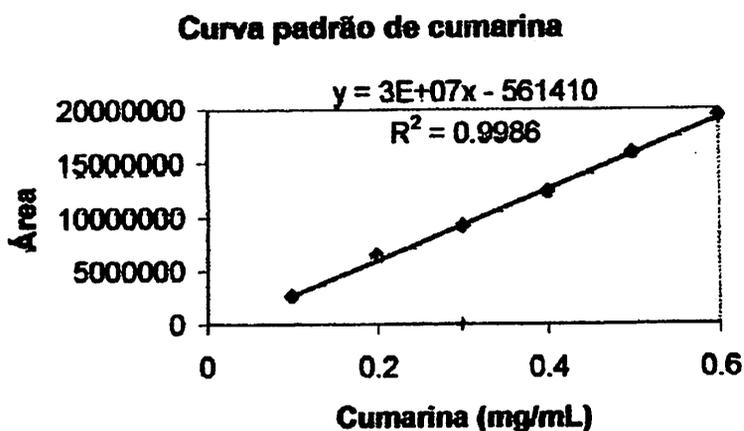


FIGURA 17. Representação da curva de calibração para quantificação da cumarina em plantas de *Mikania glomerata* Sprengel. UFLA, Lavras-MG, 2003.

A Tabela 9 apresenta os teores de cumarina obtidos das folhas de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel, submetidas a diferentes regimes hídricos. Apesar de estatisticamente não haver diferença entre as plantas submetidas ao regime de rega diária (controle) e regime de rega a cada 5 dias (estresse hídrico moderado), verificou-se uma tendência de o estresse moderado apresentar um maior rendimento no teor de cumarina na planta, enquanto as plantas submetidas ao regime de suspensão total da rega (estresse hídrico severo) apresentaram os menores teores de cumarina.

Embora não se tenha localizado, na literatura, informação sobre o efeito da deficiência hídrica no teor de cumarina, sabe-se que, de um modo geral, o estresse hídrico tende a aumentar os níveis de compostos fenólicos nas plantas (Matern & Grimmig, 1994). A partir destes dados, sugere-se que, antes da coleta do material para fazer extração de cumarina, seja imposto um estresse hídrico moderado nas plantas de guaco com o objetivo de atingir maiores teores do seu princípio ativo, a cumarina.

TABELA 9: Teor de cumarina em folhas de plantas de *Mikania glomerata* Sprengel, sob diferentes condições de regime de rega. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Tratamentos	Cumarina (mg/g de matéria seca)
Controle	3,06 ab
Moderado	3,26 a
Severo	2,55 b

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

Existe uma íntima relação entre deficiência hídrica e biossíntese de princípios ativos das plantas. Estes resultados indicam uma tendência a favor do estresse hídrico moderado, confirmando resultados obtidos por Patumi et al. (2002). Existe uma possível relação entre nível de cumarina e fotossíntese, a qual também atingiu os maiores valores nas plantas submetidas ao regime de rega a cada 5 dias e obteve os melhores resultados em relação às características anatômicas.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- De um modo geral, a maneira como o estresse hídrico é induzido pode alterar os mecanismos de tolerância à seca das plantas de *Mikania glomerata* Sprengel.
- O estresse hídrico moderado favoreceu as trocas gasosas em horário de maior demanda evaporativa da atmosfera, principalmente em relação à fotossíntese; adaptações às condições de seca, sobretudo na diminuição no diâmetro do elemento de vaso, e melhores resultados no teor de óleo e cumarina. Assim, o regime hídrico caracterizado por rega intermitente pode levar a planta ao desenvolvimento de mecanismos que contribuam para um melhor desempenho de suas atividades metabólicas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, D. H.; MAUSETH, J. D. Effects of environmental factors on development of wood. **American Journal of Botany**, Ames, v. 86, n. 3, p. 367-371, Mar. 1999.

ATKINSON, C. J.; TAYLOR, J. M. Effects of elevated CO₂ on the stem growth, vessel area and hydraulic conductivity of oak and cherry seedlings. **New Phytologist**, Oxford, v. 133, n. 1, p. 191-198, May 1996.

BASSO, F.; PISANTE, M.; BASSO, B. Agronomical aspects of officinal plant cultivation. **Phytoterapy Research**, Sussex, v. 12, p. S5131-5134, 1998. Supplement, 1.

BEGG, J. E.; TURNER, N. C. Crop water deficits. **Advance in Agronomy**, New York, v. 28, p. 161-217, 1976.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends Biotechnology**, Oxford, v. 14, p. 89-97, Mar. 1996.

BOIRA, H.; BLANQUER, A. Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 811-822, Dec. 1998.

BORGES, M. F. M. Cumarinas: químicas e ações biológicas. **Revista Portuguesa de Farmácia**, Lisboa, v. 37, n. 1, p. 47-48, 1987.

BRAKKE, M.; ALLEN JR., L. H. Gas exchange of Citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil water content. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 497-504, Mar. 1995.

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

BRAY, E. A. Plant response to water deficit. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 48-54, Feb. 1997.

BRESTIC, M.; CORNIC, G.; FRYER, M. J.; BAKER, N. R. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from

photoinhibition during drought stress? **Planta**, Berlin, v. 196, n. 3, p. 450-457, June 1995.

BRODRIBB, T. Dynamics of changing intercellular CO₂ concentration (Ci) during drought and determination of minimum functional Ci. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 1, p. 179-185, May 1996.

BROWN JÚNIOR, K. S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, n. 1, p. 291-303, Mar. 1988.

BUKASTSH, F. Benerkungren zur doppelfärbung astrablausafranina. **Microkosmos**, Stuttgart, v. 61, p. 255, 1972.

CARLQUIST, S. Adaptive wood anatomy of chaparral shrubs. In: KEELEY, S. C. (Ed.). **The California chaparral: paradigms reexamined**. Natural History Museum of Los Angeles County. Los Angeles: Springer-Verlag, 1989. (Sciences Series, 34).

CARLQUIST, S. **Comparative wood anatomy**. Belin: Springer-Verlag, 1988.

CARLQUIST, S. Further concepts in ecological wood anatomy, with comments on recent work wood anatomy and evolution. **Aliso**, Clarenmont, v. 9, p. 459-553, 1980.

CARLQUIST, S. Wood anatomy of Begoniaceae with comments on raylessness, paedomorphosis, relationships, vessel diameter and ecology. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 112, n. 1, p. 59-69, 1985.

CASTRO, E. M. de. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002. p. 221. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASTRO, G. C.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais**. 20. ed. Viçosa, 2001. 104 p.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. HPLC Quantitative analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts from *Mikania glomerata*. CONGRESSO LATINOAMERICANO DE CROMATOGRAFIA, 11., 1996, Caracas. **Resumos...** Caracas-Venezuela, 1996. p. 24-37.

CHARLES, D. J.; JOLY, R. J.; SIMON, J. E. Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2837-2840, Sept. 1990.

CHARTZOULAKIS, K.; PATAKAS, A.; BOSABALIDIS, A. M. Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 113-120, Oct. 1999.

CHARTZOULAKIS, K.; PATAKAS, A. KOFIDIS, G.; NASTOU, A. Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, n. 1/2, p. 39-50, Aug. 2002.

CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 234, p. 1-16, Jan. 1991.

CLARK, R. J.; MENARY, R. C. Environmental effects on Peppermint (*Mentha piperia* L.) I. Effects of daylength, photon flux density, night temperature and day temperature on the yield and composition of peppermint oil. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 7, n. 6, p. 685-692, 1980.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ed. Ministério da Agricultura: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 3, p. 518..

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: EUFC, 1981. 210 p.

DA MATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; PINHEIRO, H. A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance of field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Clark, v. 164, n. 1, p. 111-117, Jan. 2003.

DONAVAN, L. A.; EHLERINGER, J. R. Potential for selection on plants for water-use efficiency as estimated by carbon isotope discrimination. **American Journal of Botany**, Ames, v. 81, n. 7, p. 927-935, July 1994.

EVANS, J. R.; VON CAEMMERRER, S.; SETCHELL, B. A.; HUDSON, G. S. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. **Australian Journal of Plant physiology**, Collingwood, v. 21, n. 4, p. 475-479, 1994.

FIERRO, I. M.; SILVA, A. C. B.; LOPES, C. S.; MOURA, R. S.; BARJA-FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 66, p. 19-24, 1999.

FRANÇA, M. G. C.; THI, A. T. P.; PIMENTEL, C.; ROSSIELLO, R. O. P.; ZUILY-FODIL, Y.; LAFFRAY, D. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 227-237, June 2000

FRANZ, C. H. Nutrient and water management for medicinal and aromatic plants. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 132, p. 203-215, 1983.

GOMES, M. M. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; MACHADO, E. C.; FURLANI, P. R. Trocas gasosas e quantificação do ácido abscísico em duas cultivares de arroz de sequeiro submetidas a deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 177-183, dez. 1997.

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

GOREN, R.; TOMER, E. Effects of seselin and coumarin on growth, indole acetic acid oxidase and peroxidase with special reference to cucumber (*Cucumis sativa* L.) radices- **Plant Physiology**, Maryland, v. 47, n. 2, p. 312-316, Feb. 1971.

GOTTLIEB, O. R.; SALATINO. A Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 39, n. 8, p. 707-716, ago. 1987.

GUACO também é útil contra o câncer e na prevenção da cárie. Disponível em: <www.biocologia.com.br/noticias/noticias_guaco.htm+cumarina+irriga%C3%A3o&pt&ie=UTF-8>. Acesso em: 30 mar. 2003.

HIGGS, K. H.; WOOD, V. Drought susceptibility and xylem dysfunction in seedlings of 4 European oak species. **Annales des Sciences Forestieres**, Paris, v. 52, n. 5, p. 507-513, 1995.

HUANG, B.; FRY, J. D. Root anatomical, physiological and morphological responses to drought stress for Tall Fescue cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 4, p. 1017-1022, July/Aug. 1998.

HUCK, M. G.; KLEPER, B. L.; TAYLOR, H. M. Diurnal variations in root diameter. **Plant physiology**, Rockville, v. 45, n. 4, p. 529-530, Apr. 1970.

JENSEN, C. R.; JACOBSEN, S. E.; ANDERSEN, M. N.; NÚÑEZ, N.; ANDERSEN, S. D.; RASMUSSEN, L.; MOGENSEN, V. O. Leaf gas exchange and water relation characteristics of field quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.) during soil drying. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 11-25, July 2000.

KURUP, S. S.; NALWADI, U. G.; BASARKAR, P. W. Phenolic biosynthesis in relation to moisture stress in marigold (*Tagetes erecta* L.). **Acta horticulturae**, Amsterdam, n. 381, p. 488-493, 1994.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 237-257, jun. 1961.

MACHADO, E. C.; GUAGIO, J. A.; LAGÓA, A. M. M. A.; TICELLI, M.; FURLANI, P. R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia vegetal**, São Carlos, v. 6, n. 1, p. 53-57, jan./jun. 1994.

MACHADO, E. C.; MEDINA, C. L.; GOMES, M. M. A. Teor de água no substrato de crescimento e fotossíntese em laranjeira 'valência'. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 217-226, 1999.

MANN, J. Secondary metabolism and ecology In: _____. **Secondary metabolism**. Oxford: Caredon Press, 1987. Cap. 7, p. 325.

- MARTINS, E. R. **Morfologia interna e externa, caracterização izozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** 1996. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- MATERN, U.; GRIMMIG, B. Natural phenols as stress metabolites. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 381, p. 448-462, 1994.
- MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira ‘Valência’ enxertada sobre limoeiro ‘Cravo’ e ‘Trifoliata’ e submetida à deficiência hídrica. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 15-22, 1998.
- MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira “Valencia” deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 29-34, abr. 1999.
- MORIANA, A.; VILLALOBOS, F. J.; FERERES, E. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* l.) leaves to water deficits. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 395-405, Mar. 2002.
- NANASI, P.; LENKEY, B.; TETENY, P. Investigation of Biosynthesis of Lanatoside glycosides by means trifium labled genis. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 26, n. 4, p. 359-363, 1974.
- NOBEL, P. S.; HUANG, B. Hydraulic and structural changes for lateral roots of two desert succulents in response to soil drying and rewetting. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 153, n. 3, pt. 2, p. S163-S170, Sept. 1992.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; NETO, E. B. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 75-87, abr. 2001.
- NORTH, G. B.; NOBEL, P. S. Hydraulic conductivity of concentric root tissues of *Agave desertii* Engelm under wet and drying conditions. **New Phytologist**, Oxford, v. 130, n. 1, p. 47-57, May 1995.
- OLIVEIRA, M. A. J. de; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A.; HABERMANN, G.; RODRIGUES, J. D. Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 59-63, jan./mar. 2002.

PATUMI, M.; d'ANDRIA, R.; MARSILIO, V.; FONTANAZZA, G.; MORELLI, G.; LANZA, B. Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea europea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 27-34, May 2002.

PENKA, M. Influence of irrigation on the contents of effective substances in officinal plants. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 73, p. 181-198, 1978.

PEREIRA, A. M. S. **Propagação e co-cultivo de células como fatores predisponentes à produção de cumarina em *Mikania glomerata* Sprengel (guaco)**. 1997. 82 p. Tese (Doutorado em Agricultura) - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP.

PEYRANO, G.; TALEINSK, E.; QUIROGAGA, M.; de FORCHETTI, S. M.; TIGIER, H. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 35, n. 5, p. 387-393, May 1997.

PRADO, C. H. B. A. **Trocas gasosas em planta jovem de *Copaifera langsdorfii*, Desf., durante estresse hídrico induzido artificialmente por ausência de rega**. 1991. 93 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

QUICK, W. P. CHAVES, M. M.; WENDLER, R.; DAVID, M. RODRIGUES, M. L.; PASSARINHO, J. A.; PEREIRA, J. S. ADCOCK, M. D. LEEGOOD, R. C.; STITT, M. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1992.

REGINA, M. A.; CARBONNEAU, A. Trocas gasosas em *Vitis vinifera* sob regime de estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 31, n. 12, p. 869-876, dez. 1996.

RUIZ-SÁNCHEZ, M. C.; DOMINGO, R.; TOREECILLAS, A.; PÉREZ-PASTOR, A. Water stress preconditioning to improve drought resistance in young apricot plants. **Plant Science**, Clare, v. 156, n. 2. p. 245-251, July 2000.

SÁ, R. C. S.; LEITE, M. N.; REPOREDO, M. M.; ALMEIDA, R. N. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on males Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level. **Contraception**, Stoneham, v. 67, n. 3, p. 327-331, Mar. 2003.

SALLEO, S.; LO GULLO, M. A. Xylem cavitation in nodes and internodes of whole *Chorisia insignis* H. B. et K. Plants subjected to water stress: relations between xylem conduit size and cavitation. **Annals of Botany**, London, v. 58, n. 4, p. 431-441, Oct. 1986.

SCHREIBER, L.; HARTMANN, K.; SKRABS, M.; ZEIER, J. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 1267-1280, 1999.

SCHULZE, E. D.; HALL, A. E. Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Physiological plant ecology II**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p. 181-230. (Encyclopedia of Plant Physiology, v. 12B).

SHARKEY, T. D.; BADGER, M. R. Effects of water stress on photosynthetic electron transport, photophosphorylation and metabolite level of *Xanthium strumarium* cells. **Planta**, Berlin, v. 156, n. 3, p. 199-206, Dec. 1982.

SILVA, M. L. da; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S. Essential oils of some Amazonian *Mikania* Species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 10, p. 2374-2376, Oct. 1984.

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. (Org.). **Farmacologia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 1999. p. 101-121.

SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 101-107, Sept. 2002.

SINGH, S.; RAM, M. RAM, D. SHARMA, S.; SINGH, D. V. Water requirement and productivity of palmarosa on sandy loam soil under a subtropical climate. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 35, n. 1/2, p. 14-10, Dec. 1997.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R. E. SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 10, n. 1, p. 63-121, Jan. 1991.

SIVUKAMAR, M. V. K.; SHAW, R. H. Relative evaluation of water stress indicators of soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 70, n. 4, p. 619-623, July/Aug. 1978.

STASOVSKY, E.; PETERSON, C. A. The effects of drought and subsequent rehydration on the structure and vitality of *Zea mays* seedling roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 6, p. 1170-1178, June 1991.

STEWART, F. C.; KRIKORIAN, A. D. The range of biologically active compounds. In: STEWART, F. C. (Ed.). **Plant chemicals and growth**. London: Academic Press, 1971. Cap.7, p. 100-107.

STUHLFAUTH, T.; KLUG, K.; FOCK, H. P. The production of secondary metabolites by *Digitalis lanata* during CO₂ enrichment and water stress. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, n. 10, p. 2735-2739, Oct. 1987.

SYVERTSEN, J. P.; LHOYD, J. J. Citrus. In: SCHAFFER, B.; ANDERSON, P. C. (Ed.). **Handbook of environmental physiology of fruits crops: sub-tropical crops**. Florida: CRC Press, 1994. v. 11, p. 65-99.

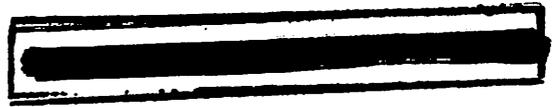
TALEISNIK, E.; PEYRANO, G.; CORDOBA, A.; ARIAS, C. Water retention capacity in root segments differing in the degree of exodermis development. **Annals of Botany**, London, v. 83, p. 19-27, 1999.

TENHUNEN, J. D.; PEARCY, R. W.; LANGE, O. L. Diurnal variations in leaf conductance and gas exchange in natural environments. In: ZEIGER, E.; FARQUHAR, G. D.; COWAN, I. R. (Ed.). **Stomatal function**. Stanford: Stanford University Press, 1987. p. 323-351.

TETÉNYI, P. Biological preconditions of aromatic and medicinal plant cultivation. **Acta Horticulturae**, Amsterdam. n. 132, p. 15-22, 1983.

TOGNETTI, R.; LONGOBUCCO, A.; MIGLIETTA, F.; RASCHI, A. Transpiration and stomatal behaviour of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 613-622, Sept. 1998.

TURNER, N. C. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In: MUSSELL, H.; STAPLES, R. C. (Ed.). **Stress physiology in crop plants**. New York: Wiley Interscience, 1979. p. 343-372.



TYREE, M. T.; SPERRY, J. S. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 19-38, 1989.

VASELLATI, V.; OESTERHELD, M.; MEDAN, D.; LORETI, J. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 3, p. 355-360, Sept. 2001.

VENEZIANI, R. C. S.; OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 99-102, Jan. 1999.

VILELA, E. de A.; MORAES, J. A. P. V. Ajustamento osmótico em folhas de trigo em função de níveis de água no solo e estádios de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 11, p. 1129-1137, nov. 1986.

YANI, A.; PAULY, G.; FAYE, M.; SALIN, F.; GLEIZES, M. The effects of long-term water stress on the metabolism and emission of terpenes of the foliage of *Cupressus sempervirens*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 975-981, Nov. 1993.

ZIMMERMANN, M. H. Hydraulic architecture of some diffuse porous trees. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, n. 18, p. 2286-2295, Sept. 1983.

ZIMMERMANN, M. H.; STEUDLE, E. Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 1, p. 7-19, Sept. 1998.