



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA/FITOTECNIA**

MARIA ELANE DE CARVALHO GUERRA

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS ACESSOS DE *Ocimum*

FORTALEZA

2013

MARIA ELANE DE CARVALHO GUERRA

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS ACESSOS DE *Ocimum*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do grau de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Fitotecnia

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Medeiros Filho

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

G964c

Guerra, Maria Elane de Carvalho.

Caracterização de dois acessos de *Ocimum*. / Maria Elane de Carvalho Guerra. – 2013.
182 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, 2013.

Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientação: Prof. Dr. Sebastião Medeiros Filho.

1. Alfavaca – crescimento. 2. *Ocimum*. 3. Germinação. 4. Sementes - morfologia. I. Título.

CDD 631

MARIA ELANE DE CARVALHO GUERRA

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS ACESSOS DE *Ocimum*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do grau de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia.

Aprovada em 04/12/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Medeiros Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato Innecco
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alek Sandro Dutra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Itayguara Ribeiro da Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a Dra. Maria Clarete Cardoso Ribeiro
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

A Deus

Ofereço

Ao meu pai João Rebouças,

À minha mãe Zuleida (*in memoriam*).

Ao meu marido João Lobo e aos nossos
filhos Mateus, Caroline, Stephanie e João
Neto.

Aos meus irmãos João Francisco,
Fernando, Elizabeth, Eneida e Eleuda.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua imensa bondade e sabedoria;

À Universidade Federal do Ceará- UFC, pela minha formação desde o curso de graduação; tenho orgulho de ter feito parte dessa Instituição;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da UFC pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e, agora, de Doutorado;

Ao orientador Prof. Sebastião Medeiros Filho, pelos ensinamentos, pela confiança e por mais esse trabalho em conjunto;

Aos professores da banca examinadora, Prof. Renato Inneco, Prof. Aleksandro Dutra, Prof. Itayguara Ribeiro da Costa e Prof^a Maria Clarete Cardoso Ribeiro, pelo profissionalismo e pelas valiosas considerações e sugestões;

Ao pesquisador João Batista Santiago, do Laboratório de Análise de Sementes, pelas sábias sugestões; muito me impressiona sua perfeita interação com as plantas;

Ao Professor Antonio Marcos Esmeraldo Bezerra, pela orientação na escolha do delineamento experimental;

Aos professores do Departamento de Agronomia/Fitotecnia pelos ensinamentos ao longo do curso, muito os admiro;

Ao Professor Márcio Cleber de Medeiros Correia, coordenador do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia-UFC;

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, Deocleciano, por sempre nos atender com gentileza;

À Pesquisadora Dr^a Elizita Maria Teófilo, do Laboratório de Análise de Sementes, pelas sugestões e principalmente pelo apoio e incentivo;

À Agrônoma Salete Rafael, pela disponibilidade em ajudar, e por ser essa pessoa tão tranquila; muitas vezes o estresse ia embora só em conversarmos um pouco;

Aos queridos Cássia e Jonathas, pela ajuda nos experimentos;

Aos amigos Selma e Wendney, pela ajuda nos experimentos e na análise estatística;

Aos demais colegas, Carlos Henrique, Wener, Ana Paula e Jonas, Felipe, Neurilan, Denise, Rodrigo, Thiago, Magnum, Haynna, Geovanna, Karla, Carlos;

Aos colegas de curso, em especial ao Renato pela ajuda na análise do solo;

Aos amigos, Beatriz, Andrea Becco, Érika, Márcia, Daniel Cassiano, Nilson, Isabel Higino, Viviane, Alana, Vaneicia, Conceição, Brisa, Maria do Carmo, Mishela, Andrea Alves, Aurilene, Alexandre Oliveira;

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia;

Ao Prof. Itayguara Ribeiro da Costa e à Prof^a Aparecida Oliveira Alves, do Departamento de Biologia da UFC, pela grande contribuição na parte de Citogenética;

À Raísa e Raquel, bolsistas do Laboratório de Citogenética pela contribuição;

À professora Dra. Nilce Viana Gramosa, do Departamento de Química da UFC pela análise química do óleo essencial e pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H); e ao CENAUREMN, pela disponibilidade dos equipamentos;

Ao laboratório de Bioquímica da UFC pela disponibilidade de uso do integrador de área foliar;

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências e Tecnologia;

Aos meus alunos do Centro de Educação, Ciências e Tecnologia CECITEC/UECE em Tauá, principalmente aos queridos José Carlos, Rutielle, Samira, e aos professores Alexandre, Jurisvânia, Pedro, Maria Rodrigues, que compartilharam comigo muitos momentos desses 4 anos de doutorado, já que não me afastei do trabalho;

Ao Professor Charles Silvério, Diretor do CECITEC (gestão 2008/2012), pelo apoio;

À Fundação Cearense de Meteorologia-FUNCEME, e Estação Meteorológica no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, por disponibilizar os dados climáticos;

Enfim, a todos que, de alguma forma, ajudaram para que esse trabalho fosse realizado, muito obrigada!

“[...] Assim, enterrada, soterrada ou abandonada

Como milagre completa-se o ciclo da vida
Germinação toma lugar, surge a plântula
A espécie tem nova chance de sobrevivida

Podendo ser pequena, delicada, muito leve

Ou grande, rústica e muito pesada
A semente guarda inúmeros segredos
Revelados um pouco quando pesquisada”.

Ismar Sebastião Moscheta (2007)

RESUMO GERAL

Lamiaceae (=Labiatae) é uma família botânica que abriga vários representantes com propriedades medicinais, entre eles o gênero *Ocimum* que consiste de 50 a 150 espécies de ervas e subarbustos amplamente distribuídas nas regiões tropical e subtropical da Ásia, África, América Central e do Sul. Alfavaca-cravo (*O. gratissimum* L) é utilizada na medicina popular como febrífugo, diurético e são vários os trabalhos na literatura que comprovam a bioatividade do óleo essencial da espécie como antibacteriano, antifúngico e antiparasitário. A alfavaca-roxa (*Ocimum* sp), assemelha-se à alfavaca-cravo, porém, é capaz de reverter sua coloração arroxeada para verde, dependendo da condição de sombreamento. O objetivo geral desse trabalho consiste em determinar as características morfológicas, agrônômicas, químicas e citogenéticas de exemplares de alfavaca. Foi realizado um estudo para avaliar os efeitos da temperatura, luz e KNO_3 em sementes das espécies, seguindo delineamento inteiramente casualizado (DIC) dispostos em um arranjo fatorial $2 \times 2 \times 5$, sendo duas condições de luminosidade (luz; escuro constante); dois níveis de KNO_3 (0%; 0,2%); e cinco temperaturas (20°C; 25°C; 30°C; 35°C; 20-35°C). Objetivando analisar o crescimento das plantas cultivadas em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), foi realizado um experimento com duração de 90 dias, DIC, com quatro repetições, sendo duas plantas por repetição. As coletas ocorreram em intervalos de 15 dias e as variáveis analisadas foram: diâmetro do caule, altura, nº de folhas, área foliar, comprimento da raiz, peso da matéria seca e teor de óleo. Realizou-se identificação preliminar da composição química do óleo essencial dos exemplares de alfavaca aos 90 dias após transplântio através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN^1H). Em uma proposta de protocolo para extração de DNA, visando detectar polimorfismos, foram utilizados 19 *primers* por meio da técnica RAPD com as espécies. Na caracterização citogenética foi determinado o número de cromossomos a partir de raízes jovens pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2mM e coradas com Giemsa 2%. A viabilidade dos grãos de pólen e das tétrades foi verificada através do método de coloração com Carmim acético a 2%. As sementes de alfavaca-cravo são fotoblásticas positivas, enquanto alfavaca-roxa é fotoblástica positiva preferencial. A germinação das espécies não excedeu 24%, sendo que a temperatura de 30°C na luz favoreceu a germinação de alfavaca-cravo, enquanto para alfavaca-roxa, foram favoráveis as condições de temperatura 20-35°C, com KNO_3 e no escuro. A

germinação das espécies é epígea fanerocotiledonar. A maior produção de matéria seca e acúmulo de óleo essencial foram observados nas plantas cultivadas em pleno sol. Os espectros de RMN¹H mostraram a presença no óleo de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, de eugenol, β -cariofileno, 1,8- cineol. O número de cromossomos mitóticos encontrado para os exemplares foi $2n = 40$, o que está de acordo com o número registrado previamente na literatura. Foram observadas altas porcentagens de grãos de pólen viáveis nas espécies estudadas.

Palavras-chave: Germinação, análise de crescimento, óleo essencial.

GENERAL ABSTRACT

Lamiaceae (= Labiatae) is a botanical family with several species with medicinal properties, including the genus *Ocimum* consisting of 50 to 150 species of herbs and subshrubs widely distributed in tropical and subtropical regions of Asia, Africa, Central America and South. *O. gratissimum* L. (alfavaca-cravo) is used as febrifuge, diuretic, and several studies in the literature show that the bioactivity of the essential oil of the species as antibacterial, antifungal and antiparasitic. Alfavaca-roxa is able to reverse its color purple to green, depending on the condition of shading. The objective of this work was to evaluate the morphological, agronomic, chemical and cytogenetic characteristics of alfavaca-cravo and alfavaca-roxa. A study was conducted to evaluate the effect of temperature, light and KNO_3 on seed of species. Experiment was carried out using a completely randomized design in a $2 \times 2 \times 5$ factorial arrangement: two different light expositions; KNO_3 (0%; 0,2%) and five temperatures (20°C; 25°C; 30°C; 35°C; 20-35°C). Growing the crop was carried out in two environments: 50% shading in a greenhouse; in the sun with no shade. Aiming to analyze the growth of plants grown at two different environmental conditions, an experiment was conducted with a duration of 90 days, using a completely randomized design with four replications and two plants per replication. The variables analyzed were: stem diameter, height, number of leaves, leaf area, root length, dry weight and oil content. To evaluate the essential oil yield of medicinal plants in different environmental conditions, an experiment was performed with duration of 90 days, using a randomized design with four replications and two plants per replicate. The preliminary chemical composition of the essential oils was determined by Nuclear Magnetic Resonance ^1H analyses. In a proposed protocol for extraction of DNA polymorphisms were used to detect 19 primers by RAPD. In cytogenetics was determined the number of chromosomes of the specimens studied from young roots pretreated with 2 mM 8-hydroxyquinoline, were stained with Giemsa 2%. The viability of pollen grains was checked by the method of staining with acetic carmine. Alfavaca-cravo is positive photoblastic and alfavaca-roxa, photoblastic preferential. Germination did not exceed 24% in all treatments. Temperature of 30°C was the best condition for seed germination for alfavaca-cravo and 20-35°C for alfavaca-roxa with KNO_3 , darkness. Germination is epigeous. For both species, higher yields were obtained in samples from the environmental conditions in the sun. The essential oil

the species presented β -caryophyllene, 1,8 – cineole, eugenol. The number of mitotic chromosomes found for the samples was $2n = 40$, which is in agreement with the number recorded previously in the literature. The species showed a high percentage of pollen viability.

Keywords: Germination, growth analysis, essential oil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grau de umidade e peso de mil sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa	78
Tabela 2. Médias de porcentagem de germinação de sementes de alfavaca-cravo na interação entre luz alternada e escuro constante, KNO ₃ e temperatura	79
Tabela 3. Médias de porcentagem de germinação de sementes de alfavaca-roxa na interação entre luz alternada e escuro constante, KNO ₃ e temperatura	79
Tabela 4. Características físico-químicas do substrato utilizado no experimento. UFC/ Fortaleza, CE, 2012	95
Tabela 5. Quadrados médios das variáveis diâmetro do caule, altura, número de folhas, comprimento da raiz, área foliar, massa seca do caule, das folhas e da raiz de alfavaca-cravo, em função de luminosidade e idade. Fortaleza, CE, 2012	98
Tabela 6. Quadrados médios das variáveis diâmetro do caule, altura, número de folhas, comprimento da raiz, área foliar, massa seca do caule, das folhas e da raiz de alfavaca-roxa, em função de luminosidade e idade. Fortaleza, CE, 2012	98
Tabela 7. Rendimentos (%) de óleo essencial das partes aéreas de alfavaca-cravo em dois ambientes (pleno sol; 50% sombra). Fortaleza, CE, 2012	121
Tabela 8. Rendimentos (%) de óleo essencial das partes aéreas de alfavaca-cravo em dois ambientes (pleno sol; 50% sombra). Fortaleza, CE, 2012	121
Tabela 9. Médias dos rendimentos (%) de óleo essencial das partes aéreas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa em dois ambientes (pleno sol; 50% sombra). Fortaleza, CE, 2012	122
Tabela 10. Composição do tampão de extração utilizado no estudo.....	145
Tabela 11. Complementos cromossômicos e cariótipos de <i>Ocimum gratissimum</i> L	154
Tabela 12. Número de cromossomos de espécies e variedades do gênero <i>Ocimum</i>	156
Tabela 13. Viabilidade média e grãos de pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa	171
Tabela 14. Viabilidade média das tétrades de pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa	171

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações. Fonte: PERES, 2004	31
Figura 2. Inflorescência, alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b); flor isolada, alfavaca-cravo (c) e alfavaca-roxa (d). Fortaleza, CE, 2012	39
Figura 3. Estrutura química de compostos presentes nos óleos essenciais. (a) Eugenol (b) Timol (c) Geraniol. Fonte: FREITAS, 1999; JAKIEMIU, 2008. ROSADO et al., 2011	50
Figura 4. Cultivo das plantas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa no NEPAU/ UFC. Fortaleza, CE, 2012	75
Figura 5. Estágios de germinação e desenvolvimento da plântula de alfavaca-cravo. Fortaleza, CE, 2012	83
Figura 6. Semente e plântula (a) Alfavaca-cravo; (b) Alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012	83
Figura 7. Estágios de germinação e desenvolvimento da plântula de alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012	84
Figura 8. Comportamento diário da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) nos dois tratamentos estudados, na área do experimento	96
Figura 9. Diâmetro do caule de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	100
Figura 10. Altura de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	102
Figura 11. Nº de folhas de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	103
Figura 12. Área foliar de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	104
Figura 13. Comprimento da raiz de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	106

Figura 14. Peso seco do caule de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	107
Figura 15. Peso seco das folhas de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	109
Figura 16. Peso seco da raiz de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) em dois ambientes (pleno sol; casa de vegetação), nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012	111
Figura 17. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol. (amostra 1)	124
Figura 18. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol. (amostra 2)	124
Figura 19. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol. (amostra 3)	125
Figura 20. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol. (amostra 4)	125
Figura 21. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em casa de vegetação. (amostra 1)	126
Figura 22. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em casa de vegetação. (amostra 2)	126
Figura 23. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em casa de vegetação. (amostra 3)	127
Figura 24. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em casa de vegetação. (amostra 4)	127
Figura 25. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol. (amostra 1)	128
Figura 26. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol. (amostra 2)	128
Figura 27. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol. (amostra 3)	129
Figura 28. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol. (amostra 4)	129

Figura 29. Espectro de RMN ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em casa de vegetação	130
Figura 30. Plântulas de alfavaca-cravo. Fortaleza, CE, 2012	142
Figura 31. Plântulas de alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012	143
Figura 32. Esquema de extração de DNA de plantas de alfavaca	145
Figura 33. Eletroforese em gel de agarose mostrando polimorfismo para genótipos de alfavaca-cravo (L1) e alfavaca-roxa (L2) utilizando diferentes <i>primers</i> . Fortaleza, CE, 2012	146
Figura 34. Cromossomos metafásicos de Alfavaca-cravo. Fortaleza, CE, 2012	157
Figura 35. Cromossomos metafásicos de Alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012	157
Figura 36. Observações de grãos de pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012	170
Figura 37. Pólens corados com carmim acético 2% de alfavaca-cravo. Fortaleza, CE, 2012.....	173
Figura 38. Grão de pólen e tétrade corados com carmim acético 2% de alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012	173

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBO - Congresso Brasileiro de Olericultura

CDCI₃ - Clorofórmio Deuterado

CENAUREMN – Centro Nordeste de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear

CG- EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CTAB - *Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

DNA - *Deoxyribonuclei Acid*

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

KNO₃ – Nitrato de potássio

Na₂SO₄ – Sulfato de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde

ppm – Partes por milhão

PVP - Polivinilpirrolidona

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

UV- Raios ultravioleta

µm - Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Plantas Medicinais	24
3.2 Óleos essenciais: produtos do metabolismo secundário	29
3.3 Diversidade de espécies de <i>Ocimum</i> (Lamiaceae)	33
3.3.1 Caracterização geral de alfavaca-cravo	36
3.3.2 Considerações sobre a alfavaca-roxa	38
3.4 Estudos de germinação e caracterização morfológica de espécies vegetais	39
3.4.1 Biologia reprodutiva e germinação de sementes	40
3.4.2 Morfologia da germinação e da plântula	45
3.5 Aspectos agrônômicos e químicos	47
3.6 Análise molecular e citogenética em estudos de identificação de espécies vegetais	51
REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO 1- ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO E INFLUÊNCIA DA LUZ, TEMPERATURA E KNO ₃ NA GERMINAÇÃO DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA	70
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1 Material botânico e local do experimento	75
2.2 Determinação do grau de umidade e peso de mil sementes	76
2.3 Teste de germinação	76

2.4 Morfologia da germinação e plântula	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1 Influência da temperatura, luz e do KNO ₃	78
3.2 Morfologia da germinação e plântula	82
4. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
CAPÍTULO 2- CRESCIMENTO DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA CULTIVADAS EM DOIS AMBIENTES (PLENO SOL; CASA DE VEGETAÇÃO)	90
1. INTRODUÇÃO	92
2. MATERIAL E MÉTODOS	94
2.1 Material botânico e descrição do local do experimento	94
2.2 Produção das mudas	95
2.3 Transplântio	95
2.3.1 Teste de irradiância	96
2.3.2 Determinações efetuadas durante o período do experimento ..	96
2.3.3 Análise Estatística	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4. CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS	113

CAPÍTULO 3- RENDIMENTO E ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN ¹ H) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA EM DOIS AMBIENTES	115
1. INTRODUÇÃO	117
2. MATERIAL E MÉTODOS	119
2.1 Material botânico e cultivo	119
2.2 Extração, rendimento e análise espectroscópica por RMN dos óleos essenciais	119
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
4. CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS	132
CAPÍTULO 4- PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA E USO DE MARCADORES RAPD EM ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA	136
1. INTRODUÇÃO	139
2. MATERIAL E MÉTODOS	142
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
4. CONCLUSÃO	148
REFERÊNCIAS	149

CAPÍTULO 5- NÚMERO CROMOSSÔMICO DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA OBTIDO POR ANÁLISE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	150
1. INTRODUÇÃO	152
2. MATERIAL E MÉTODOS	155
2.1 Material botânico	155
2.2 Contagem dos cromossomos metafásicos	155
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	156
4. CONCLUSÃO	159
REFERÊNCIAS	160
CAPÍTULO 6- ESTUDOS DE VIABILIDADE DE TÉTRADES E DE GRÃOS-DE-PÓLEN DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA POR COLORAÇÃO COM CARMIM ACÉTICO	164
1. INTRODUÇÃO	166
2. MATERIAL E MÉTODOS	169
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	171
4. CONCLUSÃO	174
REFERÊNCIAS	175
APÊNDICES	178

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo da história do desenvolvimento das populações humanas percebe-se uma crescente evolução do uso de plantas medicinais para tratamento de problemas de saúde. O que, de início, baseava-se apenas na observação e experiência, foi progredindo em direção a novas tecnologias de fabricação de medicamentos contendo princípios ativos extraídos dos vegetais. A situação ideal consiste em unir o que se sabe a respeito das plantas medicinais - fruto da cultura popular - com o saber científico, resultando em comprovação da eficácia terapêutica do material vegetal. É com base nesse princípio que a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda aos órgãos de saúde de seus países membros o desenvolvimento de programas que permitam cultivar e utilizar as plantas cuja eficácia, segurança e qualidade sejam estabelecidas em bases científicas.

O Brasil é detentor de uma flora com uma grande variedade genética, entre espécies nativas e introduzidas, possuindo muitos representantes com propriedades medicinais; além disso, o país tem tradição no uso de plantas medicinais, uma prática amplamente transmitida oralmente por gerações. Dentre as famílias botânicas com representantes que apresentam propriedades terapêuticas, destaca-se Lamiaceae, composta por diversas espécies de *Ocimum*, produtoras de óleos essenciais, de grande importância econômica (COSTA et al., 2010). Esses compostos são produtos do metabolismo secundário e são constituídos, em sua maioria, por substâncias terpênicas e eventualmente por fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas (SIANI et al., 2000).

É relevante citar que além da importância medicinal, os óleos essenciais possuem importância ecológica na atração de polinizadores e proteção contra predadores, atuam como inibidores da germinação e na proteção contra perda de água e aumento da temperatura (SOUZA et al., 2011a). Afinal, a importância dos compostos produzidos pela planta deve-se à interação com os outros seres vivos em função de seu crescimento vegetativo e reprodutivo, e não necessariamente em suprir as necessidades humanas; e foi com essa visão de natureza como um provedor inerte e passivo de bens e serviços que se legitimou sua exploração por diversos séculos sem preocupações com sua preservação e restauração (SILVA; REIS; FERREIRA, 2012).

Partindo do princípio que “o mercado de óleos essenciais é próspero para países que dispõem de uma grande biodiversidade, como o Brasil, e possuem condições de agregar valor às suas matérias-primas, transformando-as em produtos beneficiados” (JAKIEMI, 2008), pesquisas envolvendo a obtenção e aproveitamento de recursos naturais vêm sendo impulsionadas pela crescente demanda por produtos naturais; isso remete à necessidade de estudos para obtenção da melhor forma de produção desses recursos (CANSIAN et al., 2010), sem comprometer a diversidade vegetal.

Dentre as várias espécies de Lamiaceae que são largamente utilizadas pelas populações por suas propriedades terapêuticas, destaca-se *O. gratissimum* L., popularmente conhecida como alfavaca-cravo. Trata-se de um subarbusto aromático, com cerca de 1,0 m de altura, que possui flores de pequeno tamanho, reunidas de maneira característica em inflorescências do tipo racemo.

A alfavaca-roxa é muito semelhante à alfavaca-cravo, porém sua coloração arroxeada reverte para verde, em condições de sombreamento, enquanto a alfavaca-cravo possui estabilidade na cor verde. Ocorre com frequência a hibridização e a poliploidização de espécies do gênero, o que causa dificuldades na classificação e na determinação do relacionamento entre os táxons. Existem muitas variedades e tipos químicos dentro das espécies, o que dificulta ainda mais a identificação taxonômica dos indivíduos.

Apesar da riqueza da diversidade de plantas com propriedades medicinais no Brasil, e da ampla utilização da medicina natural pelas populações, há necessidade de mais estudos sobre o tema.

Devido à relevância das práticas corretas de coleta, manuseio e preparo dos princípios ativos das plantas medicinais para a saúde da população, estudos devem ser realizados para melhorar os conhecimentos sobre a correta identificação e as práticas de cultivo de plantas de interesse medicinal.

O presente trabalho está organizado em seis capítulos. O primeiro capítulo contém um estudo sobre a influência de fatores (temperatura, luz e nitrato de potássio) na germinação e a caracterização morfológica da germinação e da plântula da alfavaca-cravo e alfavaca-roxa. No capítulo seguinte abordou-se a análise de crescimento de duas populações de alfavaca cultivadas em dois ambientes (pleno sol e casa de vegetação).

No terceiro capítulo avaliou-se o rendimento e a análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H) dos óleos essenciais das espécies cultivadas em dois ambientes.

Uma proposta de protocolo para extração de DNA e uso de marcadores moleculares RAPD para a alfavaca-cravo e alfavaca-roxa foram abordados no quarto capítulo, enquanto no quinto capítulo é apresentada a análise citogenética da alfavaca-cravo e da alfavaca-roxa, mais especificamente a contagem dos cromossomos dos espécimes. Por fim, no sexto capítulo, faz-se uma abordagem da viabilidade das tétrades e dos grãos de pólen das espécies.

Pretende-se com esse estudo, disponibilizar informações para fornecer subsídios que possam contribuir para o melhor entendimento de espécies da família Lamiaceae, devido à significativa importância econômica e medicinal que representam.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar as características morfológicas, agronômicas, químicas e citogenéticas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.

2.2 Objetivos Específicos

- estudar os efeitos da temperatura, luz e do nitrato de potássio (KNO_3) na germinação de sementes das espécies;
- descrever e ilustrar os caracteres morfológicos da germinação e da plântula das espécies.
- analisar o crescimento das espécies cultivadas em dois ambientes, em pleno sol e em casa de vegetação, através de medições do diâmetro do caule, comprimento da raiz, da altura da planta, área foliar; número de folhas e massa seca;
- determinar o rendimento, bem como a composição química preliminar por RMN¹H do óleo essencial das espécies cultivadas em dois ambientes;
- propor um protocolo para extração de DNA e detectar polimorfismos utilizando-se 19 *primers* através da técnica RAPD;
- caracterizar, através de análise citogenética convencional, o número de cromossomos da alfavaca-cravo e alfavaca-roxa;
- estimar a viabilidade dos grãos de pólen e das tétrades das espécies de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

Diante da grande diversidade de seres vivos, as populações humanas, desde os tempos mais antigos, tiveram a necessidade de classificar as plantas e os animais de seu entorno. No caso das plantas, diferenciavam-se as comestíveis das venenosas, bem como se tinha conhecimento dos exemplares que poderiam ser usados no tratamento de moléstias.

As propriedades terapêuticas das plantas eram descobertas de maneira intuitiva, mas inferir que determinada planta teria capacidade de curar, poderia também se dar através da observação do comportamento de animais, que quando doentes buscavam nas ervas a cura de seus males (JORGE, 2009; OLIVEIRA; SILVA, 1994).

Uma erva capaz de induzir sonolência, em dosagens parcimoniosas seria também capaz de acalmar. Plantas cujos frutos usualmente tinham efeito laxante poderiam ser usadas para regular o intestino. Este conhecimento foi sendo passado oralmente ao longo das gerações que, juntamente com mitos e rituais, formavam parte importante das culturas locais (LORENZI; MATOS, 2008).

No Brasil, o uso de plantas medicinais teve relevante influência das práticas culturais indígenas, bem como das contribuições dos escravos que utilizavam plantas trazidas da África, muitas, originalmente, usadas em rituais religiosos, mas também utilizadas por suas propriedades medicinais descobertas empiricamente (REBOUÇAS, 2009; MARINHO et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008; MARTINS et al., 2003).

Quanto aos índios, a utilização da fitoterapia seguia uma visão mística, onde o pajé ou feiticeiro da tribo fazia uso de plantas entorpecentes para sonhar com o espírito que revelaria a erva ou o procedimento a ser seguido para cura do enfermo (MARINHO et al., 2007); enquanto para os africanos, o adoecimento era associado à possessão por espíritos e o curandeiro se encarregava de expulsar o mal por meio de exorcismo e uso de drogas (JORGE, 2009).

Essas influências e os conhecimentos sobre a flora local associados àqueles trazidos pelos europeus que chegaram ao Brasil na época da colonização “constituíram a base da medicina popular que vem sendo retomada pela medicina natural, apresentando caráter científico e integrando-as num conjunto de princípios que visam não apenas curar algumas doenças, mas restituir o homem à vida natural” (MARINHO et al., 2007).

O território brasileiro, em sua vastidão e diversidade de biomas, abriga inúmeras espécies que apresentam propriedades medicinais, sendo que muitas dessas plantas são comumente utilizadas pelas populações para tratamento de diversos tipos de moléstias. A biodiversidade vegetal do Brasil compreende algo entre 350.000 a 550.000 espécies, sendo que dessas, 55.000 espécies foram catalogadas (BRASIL, 2006a). Além da grande diversidade vegetal, a utilização de plantas medicinais no Brasil tem como facilitadores o baixo custo associado à terapêutica (SANTOS et al., 2011) e a “ampla tradição do uso de plantas medicinais, vinculada ao conhecimento popular, transmitido oralmente por gerações” (BRASIL, 2006a).

O uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica para a população de baixa renda deve ser estimulada, porém, de modo correto, por profissionais amparados em sólida bibliografia, detentores do conhecimento popular e científico capaz de unir essas duas vertentes do saber (BENDAZZOLI, 2002).

Os princípios ativos presentes nas plantas medicinais, quando manipulados e empregados corretamente, provocam reações no organismo que podem resultar na recuperação da saúde da mesma forma que o medicamento industrial. Com base nesse conceito, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda aos órgãos responsáveis pela saúde pública de cada país que procedam a levantamentos e identificação botânica das plantas usadas na medicina popular e desenvolvam programas para trabalhar as plantas que tenham sua eficácia terapêutica comprovada. Por isso a planta medicinal, quando utilizada de maneira adequada, só difere do medicamento industrial feito com a substância isolada pela embalagem e substâncias corantes, aromatizantes, flavorizantes, encorpantes e conservantes que acompanham o princípio ativo do medicamento (LORENZI; MATOS, 2008).

O Brasil, no sentido do interesse popular e institucional, vem crescendo no fortalecimento da fitoterapia na atenção básica do sistema público de saúde (SEVERO, 2010). Com o intuito de valorizar e estimular as práticas do uso de fitoterápicos, mas, ao mesmo tempo, visando a conservação da flora medicinal do país, duas importantes políticas foram estabelecidas no ano de 2006: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006b) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006c).

Ambas as políticas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com qualidade, segurança e eficácia, priorizando a biodiversidade do país (REBOUÇAS, 2009).

A aplicação pelo SUS do uso de plantas medicinais configura-se como o evento da área da saúde mais marcante do milênio; e dá início ao disciplinamento do emprego da fitoterapia de base científica extraída das coleções de plantas de uma população que tinha como única opção para o tratamento de seus males, o uso empírico das plantas medicinais em cada região do país (BRASIL, 2006a). O Prof. Abreu Matos, idealizador do Projeto Farmácias Vivas, definiu bem essa política:

É marcante por estimular o desenvolvimento das experiências municipais que já utilizam plantas cultivadas em suas próprias hortas na preparação de fitoterápicos de qualidade [...] É correta por aceitar a premissa de que nunca se deve subestimar a informação sobre plantas medicinais oriunda da sabedoria popular [...] É promissora por acender a esperança dos pesquisadores brasileiros no apoio governamental para a realização de um grande programa de pesquisas (BRASIL, 2006a).

Conforme o autor, faz-se necessário para o bom funcionamento de programas envolvendo plantas medicinais, a integração de profissionais de várias áreas do conhecimento, participando o agrônomo em orientações de cultivo, produção de mudas, controle do crescimento e higidez das plantas (MATOS, 2002); conhecer os aspectos agrônômicos da cultura é importante para maximizar a produção e obtenção de material vegetal de qualidade.

Conforme Magalhães et al. (2006) a pesquisa agronômica significa um modesto “convênio” frente ao enorme trabalho evolutivo da natureza e dos povos que descobriram seus usos terapêuticos e visa colaborar sobre a qualidade e a base sustentável da matéria prima de forma a ampliar os benefícios das plantas medicinais para atender a um número elevado de pessoas.

Luz, Ehlert e Innecco (2009), reforçam a importância da pesquisa agronômica, afirmando que as investigações relacionadas às plantas medicinais têm propiciado estudos científicos em diversas áreas de conhecimento, com uma tendência recente para a área da Fitotecnia. “Esta área visa dar assistência para o cultivo das plantas nativas e exóticas, de forma a evitar o desaparecimento de espécies através do extrativismo, bem como ampliar a produção”, frente à demanda das indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosméticos, entre outras.

A pesquisa agronômica com plantas medicinais está passando por um processo de evolução no Brasil. O Grupo de Trabalho de Plantas Medicinais da Sociedade de Olericultura do Brasil vem incentivando e organizando atividades da área nos eventos maiores da Sociedade. Entre 1991, ano de fundação, e 2000 foram apresentados 223 trabalhos com espécies medicinais (inclui também aromáticas e condimentares) com algo em torno de 22 trabalhos por ano. Merece destaque o ano de 2000, quando foi realizado junto com o CBO o 1º Simpósio Latino Americano de Produção de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, com a apresentação de mais de 80 trabalhos (MING; CHAVES; SILVA, 2001).

O Congresso Brasileiro de Olericultura (CBO) em sua 52ª edição foi realizado em julho de 2012 com apresentação de 104 trabalhos sobre plantas medicinais, aromáticas e condimentares (HORTICULTURA BRASILEIRA, 2012). No ano anterior foram 50 trabalhos apresentados; e paralelo ao evento aconteceu o III Simpósio Latino Americano de Produção de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares promovido pela Associação Brasileira de Horticultura (HORTICULTURA BRASILEIRA, 2011).

Crescentes estudos têm contribuído para o melhor entendimento das plantas medicinais. Registros na literatura comprovam a eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais como os alcalóides da vinca (*Catharanthus roseus* G. Don), com atividade antileucêmica, ou do jaborandi com atividade antiglaucoma (FOGLIO et al., 2006). Foram relatadas as atividades antiulcerogênica e anticâncer de extratos e princípios ativos obtidos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), espinheira-

santa (*Maytenus ilicifolia*), açoita cavalo (*Luehea divaricata*) (CARVALHO, 2006). Pesquisas sobre tecnologia de propagação e produção de forma sustentável são conduzidas, por exemplo, com as espécies *Achyrocline satureioides* (marcela), *Arrabidaea chica* (grajiru), *Cordia verbenacea* (erva baleeira), *Mikania laevigata* (guaco), *Phyllanthus amarus* (quebra-pedra) e *Stevia rebaudiana* (estévia) (MAGALHÃES et al., 2006).

Para espécies do gênero *Ocimum*, estudos comprovaram diferentes propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana, destacando-se *O. basilicum* L. do Mediterrâneo, *O. gratissimum* L. da África e *O. sanctum* L. da Índia que mostraram forte atividade antibacteriana e antifúngica (SUPPAKUL et al., 2003 citado por VIEIRA, 2009). Porém, o número de trabalhos científicos sobre as plantas medicinais ainda está longe de ser ideal. Apesar dos estudos realizados, a complexa riqueza da flora do Brasil não é conhecida com precisão.

No país, poucas pesquisas com espécies medicinais, no que se refere às arbustivas, têm sido objeto de pesquisa científica. E ainda, o conhecimento agrônomo sobre plantas medicinais encontra-se em seus estágios iniciais quando comparado ao de outras culturas (SOUZA et al., 2011b). Sobre o gênero *Ocimum* e mais especificamente *O. gratissimum*, ainda é mais preocupante pois o maior número de trabalhos está vinculado a pesquisadores indianos, não estando os artigos livremente disponíveis (CHAVES, 2002).

Conseqüentemente, muitas espécies medicinais são usadas empiricamente, sem embasamento científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma grande lacuna entre a oferta de plantas e as pesquisas relacionadas. Vários autores atestam a necessidade de estudos botânicos e agrônômicos das espécies com potencial medicinal (BLANK et al., 2003; BLANK et al., 2005; FOGLIO et al., 2006; SIMÕES; SCHENKEL, 2002; SOUZA et al., 2011b; YUNNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Simões e Schenkel (2002) afirmam que a situação é paradoxal: as plantas medicinais do Brasil configuram-se como altamente promissoras, porém são pouco conhecidas.

Os autores falam da importância dos estudos realizados nas Universidades e da necessidade da formação de uma nova mentalidade, capaz de estabelecer o uso da nossa rica biodiversidade, propiciando o desenvolvimento socioeconômico, com respeito aos ecossistemas e buscando a manutenção das características culturais do país.

3.2 Óleos essenciais: produtos do metabolismo secundário

A utilização de óleos essenciais pelas populações humanas vem de longa data, o que pode ser confirmado pelos registros deixados por nossos antepassados. Textos conhecidos desde 3000 a.C. como *Ayurvedas*, que em sânscrito significa “conhecimento da vida” (CASTRO; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2010) descreviam a utilização, na Índia, de diversos óleos para o tratamento de doenças.

De acordo com essa tradição, o médico dos deuses (*Dhanwantari*) seria o controlador da medicina e podia ser representado carregando um pote com o néctar oleoso da imortalidade (*amrita*) (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

Referências históricas do Antigo Egito indicam a utilização de óleos essenciais para embalsamar múmias e para fazer oferendas nas cerimônias religiosas; na tumba do faraó Tutancâmon, por exemplo, foram encontrados óleos aromáticos de cedro, mirra e zimbros.

Os gregos adquiriram conhecimentos dos egípcios e os transmitiram aos romanos que, a partir de 45 a.C., adotaram o uso dos óleos essenciais em seus rituais religiosos e funerários, perfumando o corpo e o ambiente (BIOMIST, 2006 citado por JAKIEMIU, 2008). O uso terapêutico de plantas e óleos aromáticos pelos chineses aparecem em registros bem antigos datados de 2700 a.C. e muitos outros relatos estão documentados, sendo que somente durante os séculos XVI e XVII os óleos essenciais receberam suas primeiras aplicações e sua introdução no comércio (DE LA CRUZ, 2003).

Importantes compostos produzidos pelas plantas medicinais, os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário (SILVA; CASALI, 2000), que consiste de um conjunto de reações químicas que origina compostos orgânicos que aparentemente não têm função direta no crescimento e desenvolvimento do vegetal (PERES, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2002).

Dividindo-se o metabolismo das plantas em primário e secundário, o primário seria aquele responsável pelo desenvolvimento e manutenção celular, participando desses processos substâncias comuns tais como carboidratos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos. Diferentemente dos metabólitos primários, que teriam caráter conservativo e universal, os metabólitos secundários seriam restritos em sua distribuição (PROBST, 2012). Por serem frequentemente encontrados em apenas uma espécie vegetal ou grupo relacionado de espécies (PERES, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2002), os compostos secundários não são necessários para todas as plantas, e como consequência prática, podem ser utilizados em estudos taxonômicos (PERES, 2004). Produzidos, geralmente, em pequenas quantidades no vegetal, conferem ação terapêutica no ser humano, sendo a expressão da individualidade química do ambiente, diferindo de espécie a espécie, qualitativa e quantitativamente (ARMOND et al., 2011).

Por muitos anos permaneceu desconhecido o significado da produção de metabólitos secundários pelas plantas. Especulava-se não terem função alguma dentro da planta ou mesmo serem resultantes de erro metabólico, superexpressão protéica, excreta ou desintoxicação das plantas. Foi a partir da década de 50, após estudos envolvendo diversas áreas do conhecimento, que o metabolismo secundário passou a ser mais bem compreendido (PROBST, 2012), e embora nem sempre seja necessário para que a planta complete seu ciclo de vida, recentes estudos sugerem que tenha um importante papel ecológico, protegendo-a da herbivoria e do ataque de patógenos; os metabólitos secundários ainda atuam na competição entre plantas e estão envolvidos na atração de polinizadores e dispersores de sementes (PERES, 2004; PROBST, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2002); “produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais” (PERES, 2004, p. 2).

Esses compostos podem ser divididos em três grupos principais, quimicamente distintos: alcalóides, compostos fenólicos e terpenos. A Figura 1 mostra de maneira simplificada as vias biossintéticas os metabólitos secundários e suas interconexões com o metabolismo primário.

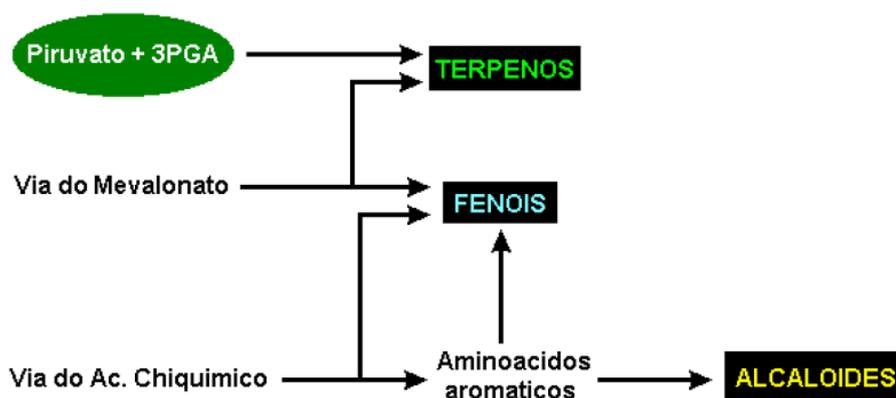


Figura 1. Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações
Fonte: PERES, 2004

Os alcalóides são compostos nitrogenados de grande importância do ponto de vista farmacológico ou medicinal, devido ao seu dramático efeito fisiológico e psicológico em humanos.

Contudo, alguns alcalóides são substâncias altamente eficazes na cura de doenças, por exemplo, os alcalóides antimitóticos vincristina e vimblastina extraídos da vinca (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Os fenóis englobam uma grande variedade de compostos que apresentam um grupo hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático. Os óleos essenciais de plantas podem conter quantidades significativas de compostos fenólicos do tipo fenilpropanóides capazes de alterar as características sensoriais do óleo. Alguns dos principais fenilpropanóides identificados em plantas são o eugenol, metil eugenol, chavicol e estragol (JAKIEMIU, 2008).

Os terpenos, por sua vez, são formados de unidades de isopreno (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007) e são classificados pelo número de unidades de isopreno que entram em sua composição. Os monoterpenos (2 isoprenos, 10 átomos de C) e sesquiterpenos (3 isoprenos, 15 C) devido ao baixo peso molecular, costumam ser voláteis; podem ocorrer em pelos glandulares (Lamiaceae), estar estocados em folhas, flores, frutos (PERES, 2004), sendo os principais constituintes dos óleos essenciais de plantas (CASTRO et al., 2004a).

Assim, uma ampla gama de constituintes químicos pode ser identificada nos óleos essenciais havendo referências da presença de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, entre outros.

Aqueles constituintes que aparecem em maior concentração são conhecidos como componentes principais, enquanto os que se apresentam em baixíssimas concentrações são denominados componente traço (VITTI; BRITO, 2003); por outro lado, as plantas medicinais que produzem como princípios ativos óleos essenciais com teor maior que 1%, são chamadas plantas aromáticas (OLIVEIRA, 2011), sendo a qualidade das plantas medicinais, aromáticas e condimentares, determinada por estes metabólitos secundários (ARMOND et al., 2011).

Do ponto de vista econômico os óleos essenciais formam um grupo importante dos metabólitos secundários das plantas. São componentes vegetais voláteis e de odor intenso que podem estar contidos em flores, frutos, raízes, folhas e em algumas espécies como o cedro, a canela e o linho, encontram-se na casca (JORGE, 2009).

A definição de óleos essenciais consta na Resolução RDC nº 2/ 2007, da ANVISA:

São produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (BRASIL, 2007).

O curioso sobre o termo 'óleo essencial' é que não há em sua composição óleos ou lipídeos, soma-se a isso o fato de não ser essencial. Mesmo assim, o termo é usado amplamente em todo o mundo. Na Idade Média, o médico e alquimista suíço, Paracelsus, usando vapor, conseguiu isolar de material vegetal, substâncias que tinham o aroma das plantas medicinais, o que ele chamou de "a alma da planta" ou essência. Essas substâncias não se misturavam com a água, daí a origem do nome óleo essencial (JAKIEMI, 2008).

Dessa forma, os óleos essenciais são substâncias voláteis, de consistência semelhante a óleo, produzidas por diversas espécies de plantas, cujas propriedades terapêuticas são conhecidas pelo homem desde a antiguidade (CRUZ; NOZAKI; BATISTA, 2000; SIANI et al., 2000).

Esses compostos, produzidos em vários locais da planta, são armazenados na célula, primariamente, nos vacúolos; frequentemente são sintetizados em determinada parte do vegetal e armazenados em outra, sendo que sua concentração pode variar no ciclo dia/ noite (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

3.3 Diversidade de espécies de *Ocimum* (Lamiaceae)

Entre as famílias do Reino Plantae, destaca-se Lamiaceae (= Labiatae), uma das maiores do grupo das Angiospermas e uma das principais famílias botânicas com representantes medicinais (JUDD et al., 2002). “É considerada uma autêntica família de plantas medicinais, pelas virtudes curativas observadas na maioria de suas espécies” (ALMEIDA, 2002).

Entre as espécies comumente utilizadas pelas populações humanas por suas indicações terapêuticas, estão *Melissa officinalis* L. (cidreira), *Mentha arvensis* L. (hortelã), *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (malvariço), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e vários representantes do gênero *Ocimum*.

As diversas espécies que compõem *Ocimum* são conhecidas como manjericões e alfavacas (BRITO; PEREIRA; AMARAL, 2006). *Ocimum* provém da palavra *ózein* (grego = cheiro) pelo forte cheiro de suas partes aéreas (FONTANARI; BAZZANELLI, 2009). As plantas apresentam-se como ervas e arbustos anuais e perenes, nativas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América do Sul (PAULA et al., 2007; PATON, 1992) e produzem óleos essenciais, que por suas propriedades terapêuticas, são muito utilizados na medicina popular para tratamento de vários males e destinados à indústria na produção de fitoterápicos, perfumes e cosméticos (VIEIRA, 2009).

O número de espécies varia de autor para autor. *Ocimum* foi inicialmente descrita por Linnaeus, em 1753, que listou 5 espécies (CAROVIC-STANKO et al., 2010). Bentham, em 1832, reconheceu 40 espécies para o gênero e dividiu *Ocimum* em seções baseando-se em características dos estames e subseções, pela morfologia do cálice (1848).

Paton (1992), em sua revisão de espécies africanas de *Ocimum* reconheceu cerca de 30 espécies para o gênero (PATON; HARLEY; HARLEY, 1999). Estudos de Koba et al. (2009) também citam a existência de cerca de 30 espécies de *Ocimum*. Para Hiltunem e Holm (1999) são conhecidas cerca de 50 a 150 espécies, enquanto outros autores relatam que o gênero envolve cerca de 160 espécies (GUPTA, 1994; PUSHPANGADAN; BRADU, 1995).

Pushpangadan, em diversos trabalhos (PUSHPANGADAN, 1974; PUSHPANGADAN; BRADU, 1995; SOBTI; PUSHPANGADAN, 1979, citados por PATON; HARLEY; HARLEY, 1999) formulou uma classificação infragenérica diferente, baseada em cariótipos. O grupo '*Basilicum*', contendo herbáceas anuais, algumas perenes, com sementes pretas, elipsóides, mucilaginosas e número básico de cromossomos $x = 12$; enquanto o grupo '*Sanctum*', arbustos perenes, sementes marrons, globosas, não mucilaginosas ou fracamente mucilaginosas e $x = 8$ como número básico de cromossomos.

Entre as razões das divergências apresentadas, estão as taxonômicas, por exemplo, revisões tais como as de Paton, em 1992 que reduziu o número de espécies por reavaliar alguns taxa, quando diferentes nomes são aplicados ao mesmo táxon (sinonímia); e geográficas, pois muitas espécies são africanas e os registros da literatura indiana, por exemplo, estão escritos sem o conhecimento da literatura pertinente para as espécies africanas (PATON, 1992).

A complexidade da taxonomia para o gênero também se deve à hibridização interespecífica e poliploidia comum nas espécies (ALMEIDA et al., 2004). Dessa forma, a taxonomia e a nomenclatura para o gênero ainda é confusa (PATON; HARLEY; HARLEY, 1999). Os autores comentam que a taxonomia está subjacente à Biologia vegetal, sendo necessário conhecer o nome correto de uma planta para divulgar seus usos e relacionamentos.

Algumas espécies representativas do gênero *Ocimum*, com as principais características, sinonímia e uso pela população, são:

O. basilicum L. (= *O. thyrsoiflorum* L.), ou manjericão, apresenta-se como um subarbusto aromático, anual, ereto, muito ramificado, de 30-50 cm de altura, sendo nativo da Ásia tropical e amplamente cultivado após a vinda dos imigrantes italianos para o Brasil.

O manjeriço é utilizado como febrífugo, estimulante digestivo, béquico e antirreumático (LORENZI; MATOS, 2008). Suas folhas podem ser usadas frescas e secas como aromatizante ou especiaria em uma ampla variedade de comidas (VIEIRA; GOLDSBROUGH; SIMON, 2003).

Ocimum selloi Benth. (= *O. carnosum* Link & Otto), popularmente conhecida como atoveran, elixir paregórico, é nativa do sul do país e cultivada em jardins e hortas domésticas como planta condimentar e medicinal. As folhas e as inflorescências são consideradas digestivo-estomacais e hepático-biliares (COSTA et al., 2010; LORENZI; MATOS, 2008). As flores estão dispostas em grupos de três, com coloração variando de roxo a róseo; os frutos são tetraquênios, com quatro sementes pequenas, amarronzadas e ligeiramente alongadas (FACANALI, 2008).

O. tenuiflorum (= *O. sanctum* L), é um pequeno arbusto anual, com folhas pequenas e flores de coloração púrpura, nativa da Índia, que se adapta bem em climas subtropicais e vegeta em solos permeáveis e ricos em matéria orgânica (LORENZI; MATOS, 2008; PEREIRA; LOPES, 2006). O emprego de seu chá, bebido em cerimônias para o tratamento de males do corpo e da mente e os benefícios obtidos pela simples presença da planta são documentados na literatura indiana por milênios. Promove uma melhora geral da saúde e sensação de bem estar, oxigena os tecidos além de ação antioxidativa, propriedade anti-histamínica, anti-inflamatória e antimicrobiana (LORENZI; MATOS, 2008).

O. campechianum Mill (= *O. micranthum* Willd.), conhecida no Nordeste como alfavaca do campo, é subarborescente, perene, possui inflorescências terminais com flores de coloração branca (SILVA, 2007), assemelhando-se morfológicamente a *O. tenuiflorum* (LORENZI; MATOS, 2008). Outra espécie, *O. americanum* L. (= *O. canum* Sims) popularmente denominada manjeriço doce, tem as folhas *in natura* empregadas em distúrbios gástricos, respiratórios e renais; seus óleos essenciais atingem altos valores no mercado nacional e internacional assumindo grande relevância medicinal (BRITO; PEREIRA; AMARAL, 2006), enquanto *O. officinalis* L, ou alfavaca, que ocorre nas regiões sudeste e nordeste do país, é uma espécie anual, que floresce todo o ano. As flores, reunidas em inflorescências terminais possuem coloração branca; os frutos são tetraquênios e as pequenas sementes são amarronzadas, sendo empregado na indústria farmacêutica e de cosméticos, além do uso como condimento (ALMEIDA et al., 2004).

3.3.1 Caracterização geral de *O. gratissimum* L.

A espécie *Ocimum gratissimum* L. (= *O. guineense* Schumach. & Thonn., *O. viride* Willd.), é conhecida popularmente como “alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo” (LORENZI; MATOS, 2008); a mesma espécie recebe o nome de “quioiô” em Sergipe, mas apresenta aroma diferente do cheiro de cravo-da-índia (*Syzygium caryophyllata*) típico da alfavaca-cravo (BLANK et al., 2003)

Apresenta-se como um subarbusto ramificado com típicas inflorescências terminais, sendo originário da Ásia e África e subespontâneo nas regiões do Brasil (BLANK et al., 2003; JORGE, EMERY, SILVA, 2006; LORENZI; MATOS, 2008). “A planta é um subarbusto aromático, que cresce, sem maiores problemas, em todo o Brasil” (JORGE; EMERY; SILVA, 2006). O centro de origem de *Ocimum gratissimum* é a África, e apesar dos estudos a respeito dos constituintes químicos de seus óleos essenciais, a taxonomia infraespecífica desta espécie permanece ainda confusa (PATON, 1992).

A espécie pode ser subdividida em duas variedades: *O. gratissimum* var. *gratissimum*, a qual possui folhas e ramos pubescentes, e inflorescência densa; e *O. gratissimum* var. *macrophyllum*, que apresenta folhas e ramos glabros, com inflorescência aberta (PATON, 1992), porém a espécie possui larga variedade morfológica, em especial ao indumento de folhas e inflorescências, o que torna difícil o uso desses caracteres como indicador taxonômico (VIEIRA et al., 2002) .

As flores de *O. gratissimum* são hermafroditas, possuem simetria zigomorfa e a corola formada por cinco pétalas possui coloração branca, enquanto o cálice é lilás. As flores estão organizadas em inflorescências terminais do tipo racemo, com uma média de 70 a 80 botões, e para cada grupo de três flores há duas brácteas. O androceu é formado por quatro estames com as anteras livres, com deiscência longitudinal portando grãos de pólen amarelo e pulverulento. O gineceu é composto por um ovário súpero bicarpelar e bilocular com estigma bifido e com estilete ginobásico. Os frutos são do tipo esquizocarpo, possuindo quatro mericarpos subglobosos de 1 a 1,3 mm, rugoso-ponteados, amarronzados e ligeiramente alongados (SOUZA et al., 2006). As folhas são verdes, ovalado-lanceoladas, de bordos denteados, membranáceas, variando de 4 a 8 cm de comprimento (BIASI et al., 2009).

Como outras espécies do gênero, *O. gratissimum* apresenta propriedades medicinais, podendo ser utilizado como diurético, para tratar doenças gastrointestinais, reumatismo, paralisia, entre outras moléstias (EFFRAIM; JACKS; SODIPO, 2001; LORENZI; MATOS, 2008). As folhas e flores da alfavaca podem ser utilizadas sob a forma de infusão, decocção, ou na forma de xaropes (GONÇALVES et al., 2008).

As propriedades medicinais atribuídas a seus óleos essenciais, presentes em folhas, inflorescências e sementes (FRANCO et al., 2007; SOUZA et al., 2006), faz com que a alfavaca-cravo seja empregada como anestésico, no tratamento de gripes, resfriados e afecções respiratórias de origens diversas (ALMEIDA, 2011), inseticida (OGENDO et al., 2008), nematocida e antimicrobiano (EFFRAIM, JACKS, SODIPO, 2001; LEMOS et al., 2005).

Mbata e Saikia (2005) comprovaram a ação antimicrobiana de *Ocimum gratissimum* sobre *Listeria monocytogenes*. Em seu estudo, células foram tratadas com concentrações crescentes do óleo essencial extraído da planta, causando inibição do crescimento bacteriano, sendo a concentração de 250 µg/mL capaz de inibir em mais de 97% o crescimento. Estudos de Nakamura et al. (1999) indicaram efeitos antibacterianos do óleo de *O. gratissimum* em *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp.

Nweze e Eze (2009) determinaram os efeitos do extrato na inibição do crescimento de *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Atividades dos extratos de *O. gratissimum* contra quatro espécies de *Candida*, a saber, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* foram confirmadas por Nakamura et al. (2004), enquanto bioatividade do extrato da planta em *Alternaria* sp e *Penicillium chrisogenum* foram estudadas por Faria et al. (2006) e Rosset et al. (2005).

Santos et al. (2010), em estudos da avaliação de extratos vegetais e animais da Região do Cariri sobre fungos dermatófitos, mostraram forte ação antifúngica com relevância clínica para os extratos vegetais de *O. gratissimum*, enquanto Lemos et al. (2005) comprovaram a eficácia do óleo essencial extraído da planta contra *Cryptococcus neoformans*.

Os resultados da pesquisa de Flávio et al. (2011) mostraram que houve redução na infecção de sementes de sorgo por fungos quando tratadas com óleo essencial de *O. gratissimum*, dessa forma, a espécie se mostra como uma alternativa orgânica e de baixo custo para o manejo integrado de doenças de plantas.

Alves et al. (2004) identificaram potencialidades alelopáticas do óleo essencial de várias plantas medicinais, incluindo *O. gratissimum*, enquanto os efeitos antiparasitários foram estudados em *Leishmania amazonensis* (UEDA- NAKAMURA et al., 2006), e *L. chagasi* (OLIVEIRA et al., 2008), indicando a ampla gama de ação dos componentes extraídos de *O. gratissimum*.

3.3.2 Considerações sobre a alfavaca-roxa (*Ocimum* sp)

Faz-se necessária uma breve caracterização da alfavaca-roxa, identificada em nível de gênero, mas não da espécie. É uma planta aromática, cujas folhas são simples, arroxeadas na parte adaxial e verdes na abaxial. O caule é quadrangular e as flores estão agrupadas em inflorescências do tipo racemo, de coloração roxa, mesma cor do caule. Da mesma forma que em *O. gratissimum*, as flores são hermafroditas, com simetria zigomorfa.

Torna-se bastante curioso o fato de que algumas variedades de alfavaca apresentam variação de cor (CAMPOS, 2010). No caso da alfavaca-roxa, essa coloração sofre variações, dependendo de onde o espécime esteja sendo cultivado. Percebe-se que em baixa luminosidade, há instabilidade da cor e as plantas passam a apresentar coloração verde.

Na Figura 2 são mostrados aspectos da morfologia externa dos espécimes para comparação.



Figura 2. Inflorescência, alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b); flor isolada, alfavaca-cravo (c) e alfavaca-roxa (d). Fortaleza, CE, 2012.

3.4 Estudos de germinação e caracterização morfológica de espécies vegetais

Os estudos que abrangem a germinação de sementes e a caracterização morfológica das plântulas resultantes desse processo são importantes por propiciarem a compreensão do ciclo biológico da planta, além de ampliarem as informações sobre as espécies vegetais e subsidiarem programas de manejo e conservação.

Vários estudos indicam a importância de se trabalhar com morfologia da germinação e de plântulas, e incluem contribuir para a melhoria dos conhecimentos silviculturais das espécies (FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008); favorecer a identificação de espécie ou as relações ecológicas interespecíficas (COSTA et al., 2006); servir de subsídio para a produção de mudas, visando a reposição florestal (LEONHARDT et al., 2008). Fornecer informações para a correta identificação de espécies a partir de características peculiares (ABUD et al., 2010) e de espécies nativas do bioma caatinga que são pouco estudadas mas apresentam grande potencial econômico (NOGUEIRA; MEDEIROS FILHO; GALLÃO, 2010) e aquelas de grande importância ecológica e que estejam ameaçadas de extinção (REGO et al., 2010).

Conhecer e entender, sob vários aspectos, o desenvolvimento das plantas, é fundamental para que sejam tomadas decisões em relação aos melhores métodos de produção, cultivo e regeneração das espécies.

3.4.1 Biologia reprodutiva e germinação de sementes

Durante o processo evolutivo as plantas desenvolveram formas de propagação vegetativa e reprodutiva para sua perpetuação. “A grande maioria das espécies de plantas cultivadas, exóticas ou nativas apresenta propagação reprodutiva, em que o diásporo é considerado a unidade de dispersão da espécie” (SERT; BONATO; SOUZA, 2009).

Os diásporos podem ser considerados não só uma estratégia de dispersão, mas também de multiplicação, sobrevivência e preservação da biodiversidade, uma vez que contêm o código genético representando a principal forma de disseminação no ambiente; são representados, em geral, apenas pela semente, porém, em muitas espécies trata-se do fruto ou pode conter, além da semente, brácteas, perianto e pericarpo (SERT; BONATO; SOUZA, 2009).

A reprodução por sementes é um método importante pelo qual as plantas se reproduzem, sendo essenciais no processo a produção de células haplóides, os gametas, através de meiose, e a união dos gametas masculino e feminino para formarem o zigoto diplóide que originará a planta (ARAÚJO; BRUCKNER, 2008).

“Por possibilitar ampla recombinação genética, a propagação sexuada é, mais do que um modo de propagação, um mecanismo de adaptação da espécie” (ARAÚJO; BRUCKNER, 2008).

O ciclo sexual de uma planta inclui o desenvolvimento de gametófitos masculinos (grãos de pólen germinados) e femininos (saco embrionário). A flor é o órgão das angiospermas adaptado à reprodução sexual. Nela ocorre a meiose, seguida da formação dos gametas, a polinização, a fertilização e o desenvolvimento da semente. A meiose viabiliza a segregação, a fertilização e a recombinação genética. Das partes da flor o gineceu corresponde à parte feminina e o androceu, masculina. O gineceu é formado pelo ovário, em cujo interior se formam os óvulos, pelo estilete e estigma, sendo que nesse último germina o grão de pólen após a polinização; o androceu é formado pelos estames, onde cada estame é composto por filete e antera (ARAÚJO; BRUCKNER, 2008).

Pelo processo da polinização os gametas masculinos são levados pelo grão de pólen, ou microgametófito imaturo que, no momento da dispersão, pode conter duas ou três células. Inicialmente, existe a célula do tubo e a célula geradora, sendo que esta última se divide antes ou depois da dispersão dando origem a duas células espermáticas. O gametófito feminino das angiospermas é formado por oito núcleos quando maduros, sendo um deles a oosfera (GASPARINO; CRUZ-BARROS, 2006).

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas que se formam nas anteras, através do processo de microsporogênese. No interior dos sacos polínicos das anteras, as células precursoras (células-mãe) dos grãos de pólen, aumentam de volume e sofrem meiose. Cada célula, após a primeira divisão meiótica, origina duas células haplóides (microsporócitos secundários), que juntas formam as díades.

Após a segunda divisão, formam-se os microspórios, que juntos formam as tétrades. Em seguida há a diferenciação das tétrades em grãos de pólen (ARAÚJO; BRUCKNER, 2008; DETTKE; SANTOS; 2011).

Cada grão de pólen é inicialmente constituído de uma célula haplóide envolvida por duas paredes: a externa (exina) é formada por esporopolenina, substância muito resistente e que apresenta padrões morfológicos característicos de cada espécie ou grupo de plantas, enquanto a camada interna (intina) é feita de celulose (ARAÚJO; BRUCKNER, 2008; REIS, 2010).

A semente das angiospermas surge através do processo da dupla fertilização, no qual um dos núcleos espermáticos fertiliza a oosfera, formando o embrião; e o outro se combina com os núcleos polares do óvulo para produzir o endosperma triploide, que nutrirá o embrião (SADAVA et al., 2011).

A semente pode ser considerada, então, como o óvulo fecundado e amadurecido, apresentando, basicamente, um ou dois tegumentos, tecido de reserva e embrião (SOUZA; PAOLI, 2009), e tem como função primordial sua germinação para que uma nova geração da planta possa ser originada (SERT; BONATO; SOUZA, 2009).

Durante o seu desenvolvimento, a semente passa por três fases principais: histodiferenciação ou morfogênese inicial, expansão celular concomitante à fase de acúmulo de reserva, e a fase final, que corresponde ao dessecação (AMARAL; PEREIRA; CORTELAZZO, 2000; CARVALHO et al., 2008).

Em relação à tolerância à dessecação e baixa temperatura, podem ser agrupadas em sementes ortodoxas (tolerantes) e recalcitrantes (intolerantes) (ROBERTS, 1973). “As sementes que toleram desidratação quase completa podem suportar, conseqüentemente, temperaturas extremamente baixas, o que supostamente não ocorre com as sementes intolerantes à dessecação” (BONJOVANI; BARBEDO, 2008).

De acordo com Gemaque et al. (2005), o baixo teor de água das sementes, neste caso, além de limitar a germinação é fundamental para reduzir a deterioração das mesmas. A tolerância à dessecação destas sementes em relação às recalcitrantes é uma característica vantajosa e muito bem empregada pelo homem no armazenamento das sementes. Ainda conforme os autores, as sementes ortodoxas geralmente não só toleram a dessecação, mas provavelmente, dependem dela para redirecionar os processos metabólicos que levam à germinação, podendo ser resultado do processo de seleção natural em concordância com as condições do meio em que as espécies evoluíram. Assim, as sementes que germinavam logo que seu processo de formação e maturação fosse concluído, produziam plântulas que poderiam não sobreviver às condições adversas. Foram selecionadas, desta forma, as plântulas cujas sementes germinavam apenas quando as condições do meio fossem favoráveis ao seu desenvolvimento.

O primeiro processo fisiológico do estabelecimento de uma nova planta é a germinação das sementes, processo em que predominam as atividades catabólicas e de mobilização de reservas, culminando com o desenvolvimento do eixo embrionário (SERT; BONATO; SOUZA, 2009).

A germinação compreende, pois, uma sequência ordenada de atividades metabólicas que tem início com o processo da embebição, em que há a retomada do desenvolvimento do embrião, e que culmina com a emergência da plântula e restabelecimento da espécie (MARCOS FILHO, 1986 citado por DINALLI et al., 2010).

As sementes podem ser consideradas como a principal forma de propagar as espécies, bem como de propiciar a sobrevivência das plantas em condições adversas. Em ambientes favoráveis o metabolismo da semente aumenta e as reservas começam a ser consumidas. “Com isso, inicia-se o desenvolvimento das plântulas, mesmo quando as plantas que originaram essas sementes já tenham morrido há anos” (SERT; BONATO; SOUZA, 2009).

Diversos fatores, extrínsecos e intrínsecos, podem interferir na germinação das sementes, entre eles a luz, a temperatura, a água e a dormência (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). A luz atua na germinação através do fitocromo, uma cromoproteína capaz de absorver luz mais fortemente em determinadas regiões do espectro.

Dependendo do comprimento de onda da luz que é absorvida, o fitocromo sofre interconversão entre as formas F_v, forma inativa do fitocromo e F_{ve}, forma ativa. Ao receber luz no comprimento de onda de 660 nm (Vermelho- V) o fitocromo converte-se na segunda forma, o F_{Ve}, que tem absorção máxima de luz em 730 nm (Vermelho extremo- Ve). A forma ativa é capaz de induzir a germinação em determinadas sementes (SERT; BONATO; SOUZA, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Bewley e Black (1994), sementes de um grande número de espécies cuja germinação é promovida pela luz são chamadas fotoblásticas positivas, enquanto aquelas na qual a germinação é inibida pela luz são denominadas fotoblásticas negativas. Nas fotoblásticas preferenciais, a germinação ocorre no escuro, mas preferencialmente o processo é favorecido na presença da luz (KLEIN; FILIPE, 1991 citados por FONSECA; NUNES; NUNES, 2012), enquanto as fotoblásticas neutras são insensíveis à luz (FONSECA; NUNES; NUNES, 2012).

A temperatura interfere na germinação devido à atuação na velocidade de absorção de água e também nas reações bioquímicas que determinam todo o processo de germinação (KOPPER; MALAVASI; MALAVASI, 2010).

As sementes podem não germinar, mesmo que as condições ambientais estejam favoráveis, devido ao processo de dormência. Souza (2009) a define como a incapacidade de germinação do embrião, devido às condições inerentes à semente. Dentre essas condições, destacam-se: tegumento impermeável e restrições intrínsecas, como embrião imaturo ou presença de substâncias inibidoras que foram produzidas durante a formação da semente.

O autor relata que, dependendo da origem, a dormência pode ser primária, quando foi instalada durante a formação da semente, ainda na planta-mãe; presente, portanto, no ato da dispersão; e dormência secundária, que pode ocorrer depois de as sementes serem embebidas e terem seu metabolismo ativado, quando entram em dormência novamente devido às condições ambientais desfavoráveis.

A dormência primária é uma característica ou padrão de desenvolvimento específico, sendo programado geneticamente, enquanto na dormência secundária, a semente é programada para desencadear a manifestação do mecanismo que determina a dormência, ou seja, são liberadas em estado não dormente, em condições desfavoráveis para a germinação, tornando-se dormentes (LOPES et al., 2011).

O fato de uma espécie vegetal apresentar algum tipo de dormência, afeta a produção de mudas. “Na agricultura, é desejável que as sementes de uma espécie tenham germinação rápida e uniforme” (GMACH, 2008), dessa forma, vários são os métodos utilizados para a quebra da dormência visando uniformizar a germinação.

Um procedimento comumente adotado para reduzir o tempo entre a semente e a emergência das plântulas é o contato das sementes com substratos umedecidos (LOPES; CORRÊA; DIAS, 2006).

Entre as substâncias utilizadas na superação de dormência de sementes está o nitrato de potássio (KNO_3). Essa substância é considerada como um agente osmótico e é utilizada para aumentar a concentração da solução, diminuindo o potencial hídrico da solução, podendo promover a respiração em algumas espécies (LEONEL; RODRIGUES, 1999; TONIN et al., 2005). Trata-se de um agente osmótico inorgânico, atuando na recepção de elétrons quando se reduz a forma de nitrito no interior das sementes, reoxidando o NADPH e aumentando a disponibilidade de NADP para a redução das desidrogenases do ciclo da pentose fosfato, processo este que está envolvido na superação da dormência das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

Além da quebra da dormência, é importante em qualquer estudo que envolva propagação de plantas por sementes informar-se sobre sua qualidade sanitária e fisiológica, para não comprometer a sustentabilidade do plantio.

Desta forma, a sustentabilidade de plantios, sejam eles agrônômicos ou agroflorestais podem ser comprometidos devido à baixa qualidade fisiológica e sanitária das sementes; além disso, as sementes são via de transmissão de patógenos que podem prejudicar posteriormente as plântulas ou as plantas em desenvolvimento, comprometendo, assim, o plantio (ARAÚJO, 2008).

A qualidade de sementes envolve uma série de aspectos genéticos, físicos, fisiológicos ou sanitários, que ao serem avaliados de forma conjunta, propiciam o conhecimento do valor real e potencial de utilização destas sementes (BORÉM, 2005). As sementes devem ser submetidas a vários testes de acordo com os métodos disponibilizados nas Regras de Análises de Sementes (RAS), sendo estes testes de uso obrigatório em Laboratórios de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

O teste de germinação determina o potencial germinativo de um determinado lote, avaliando a qualidade fisiológica das sementes para fins de semeadura e produção de mudas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Trata-se de um teste de controle de qualidade, realizado em condições de laboratório objetivando qualificar e quantificar o valor das sementes vivas, com potencial de produzir plantas normais em condições favoráveis de campo (PIÑA-RODRIGUES; FIGLIOLIA; PEIXOTO, 2004).

O estudo da germinação das sementes de espécies medicinais tem merecido atenção especial da comunidade científica, devido ao incremento ao seu potencial farmacológico, aliado a necessidade de proceder a cultivos racionais, destinados a produção de fitoterápico (PEREIRA, 1992).

3.4.2 Morfologia da germinação e da plântula

Estudos de caracterização morfológica da germinação e de plântulas são de grande importância, pois fornecem subsídios para melhorar as técnicas de propagação de mudas, padronizar testes de germinação, identificar as espécies em campo, entre outros, nos estudos de preservação das espécies ou outros fins práticos (ABUD et al., 2010; BELTRATI, 1995).

Estudos morfológicos fornecem informações para a identificação botânica de espécies e orientam quanto ao método de cultivo (NOGUEIRA; MEDEIROS FILHO; GALLÃO, 2010), sendo uma das formas mais tradicionais em trabalhos de caracterização de espécies. Configura-se como um dos passos iniciais em um programa de melhoramento e tem como objetivo conhecer o material que se deseja trabalhar e observar a diversidade existente. Em geral, os próximos passos são associá-la a características agronômicas e genéticas (SAWASATO, 2007).

Diversas classificações foram propostas para as plântulas, de acordo com características como exposição dos cotilédones, posição na plântula e funções dos cotilédones (RESSEL et al., 2004).

A germinação é considerada criptocotiledonar, caso em que os cotilédones permanecem no interior do diásporo e fanerocotiledonar, quando os cotilédones são expostos. Na germinação dita hipógea os tecidos de reserva das sementes podem ficar abaixo do solo; no caso de acompanharem o hipocótilo, projetando-se para fora do solo, denomina-se germinação epígea (DUKE, 1965; NG, 1978; VIEIRA; SOCOLOWSKI; TAKAKI, 2010).

Outra classificação bastante utilizada é a de Míquel, de 1987, que separa as plântulas em cinco tipos morfofuncionais: tipo fanerocotiledonar epigeal fotossintetizante, caracteriza-se por apresentar cotilédones externos ao tegumento da semente e visíveis, foliáceos fotossintetizantes e localizados acima do nível do solo; fanerocotiledonar epigeal de reserva, apresenta cotilédones visíveis e localizados acima do nível do solo, mas com função de reserva; fanerocotiledonar hipogea de reserva, possui cotilédones visíveis, localizados abaixo ou ao nível do solo e apresentam função de reserva; criptocotiledonar hipogea de reserva, possui cotilédones encerrados no tegumento da semente, não sendo visíveis, pois estão localizados abaixo ou ao nível do solo e com função de reserva; e criptocotiledonar epigeal de reserva, cujos cotilédones não são visíveis por estarem encerrados no tegumento da semente, localizados acima do nível do solo e que apresentam função de reserva (CAVICHIOLO; BOEGER; MARQUES, 2009).

De modo geral, no início da fase de plântula desenvolvem-se a raiz primária e o hipocótilo, a partir do eixo hipocótilo-radicular do embrião contido no interior da semente. A raiz, comumente axial, pode apresentar pelos que podem ser observados macroscopicamente. No limite entre a raiz e o hipocótilo pode ser identificado o colo, visível pela diferença de coloração ou apresentar-se como uma pequena depressão ou estrangulamento (SOUZA et al., 2009).

Os cotilédones podem ser foliáceos ou de reserva e apresentam grande variedade de formas e tamanhos.

O hipocótilo é o entrenó da plântula, possui coloração variável, podendo ser verde, bege, marrom, enquanto o epicótilo localiza-se entre o nó cotiledonar e o nó do primeiro eófilo. A gema vegetativa localizada no ápice do epicótilo pode formar um ou mais eófilos, também chamados protófilos (SOUZA et al, 2009).

De acordo com Pereira (1988), a observação do desenvolvimento da plântula permite diferenciar grupos taxonômicos muito semelhantes entre si.

O estudo de morfologia de plântulas é importante por contribuir com o conhecimento morfo-anatômico integral da espécie, oferecendo quantidade de caracteres próprios que torna possível determinar a espécie da qual procede a semente. Também é utilizado em laboratórios de análise de sementes para identificar plântulas normais e anormais (OLIVEIRA, 1988 citado por MELO; VARELA, 2006).

Percebe-se que o conhecimento dos caracteres morfológicos de plântulas e mudas é de grande importância em trabalhos de laboratório, viveiros de produção de mudas e estudos de avaliação da regeneração natural, pois facilita o reconhecimento e a identificação das espécies (AMORIM et al., 2006). Várias espécies com propriedades medicinais carecem de informação acerca de seu processo reprodutivo, dessa forma, estudos dessa natureza devem ser estimulados.

3.5 Aspectos agronômicos e químicos

À medida que as plantas se desenvolvem, seu crescimento pode ser acompanhado através da determinação da matéria seca e área foliar (AIRES; SILVA; EICHOLZ, 2011), pois esse crescimento deve-se ao aumento da matéria seca a partir da conversão de substâncias inorgânicas simples, tais como luz, CO₂ e minerais em substâncias orgânicas. Por serem as folhas responsáveis pela captação de energia solar e produção dessa matéria orgânica, através da fotossíntese, torna-se importante a determinação da área foliar ao longo do crescimento da planta (MAGALHÃES, 1986 citado por BARREIRO et al., 2006).

Godoy et al. (2007) afirmam que “a medida da área foliar está relacionada à determinação ou estimativa da superfície fotossinteticamente ativa”; apresentando-se como uma ferramenta válida para o estudo das bases fisiológicas da produção (ALMEIDA et al., 2011).

Considerando crescimento como “o aumento irreversível de uma grandeza física como massa, área, altura e diâmetro” (FAGUNDES et al., 2010), a análise de crescimento descreve as condições morfofisiológicas da planta em diferentes intervalos de tempo, sendo válido acompanhar a dinâmica do processo produtivo através de parâmetros fisiológicos e bioquímicos (MAGALHÃES, 1986

citado por BARREIRO et al., 2006). “A utilização dos parâmetros de crescimento vegetal, como análise, é considerada o método básico para se obter a estimativa da produtividade primária dos vegetais” (FONSECA, 2001).

A importância agronômica de estudos dessa natureza pode ser atribuída à possibilidade de se conhecer as diferenças funcionais e estruturais entre as plantas quando submetidas a diferentes fatores ambientais. E o conhecimento dos efeitos das condições ambientais no crescimento da planta pode subsidiar programas de melhoramento bem como práticas adequadas de manejo da cultivar de interesse (AIRES; SILVA; EICHOLZ, 2011; BENINCASA, 1988) e contribuir com o aumento da produção.

Em plantas medicinais, a importância da análise de crescimento de uma determinada espécie também está correlacionada à concentração de princípios ativos, como o óleo essencial, os quais podem variar durante o desenvolvimento da planta (FONSECA, 2001). Faz-se necessário associar a produção de biomassa à qualidade dos princípios ativos, pois além das variações circadianas, estudos demonstram que vários outros fatores podem influenciar as plantas na produção de biomassa, bem como na quantidade e qualidade de metabólitos secundários, incluindo aqui os óleos essenciais (BRANT et al., 2009; COSTA et al., 2010; FRANCO et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; LIMA et al., 2011).

Vários fatores podem influenciar a produção dos metabólitos secundários nas plantas. Entre eles estão a época em que o material é coletado (sazonalidade), (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2003), fase de desenvolvimento, idade da planta, órgão de armazenamento (SIMÕES; SPITZER, 2003; SANGWAN; FAROOQI; SANGWAN, 2001) e as condições ambientais as quais as plantas estão submetidas, tais como a temperatura, disponibilidade hídrica e luminosidade (ARMOND et al., 2011; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; LIMA et al., 2011; REIS; MARIOT; STEENBOCK 2003; SILVA; CASALI, 2000; LUZ; EHLERT; INNECCO, 2009); sem esquecer, logicamente, do fator genético (FRANCO et al., 2007).

Dessa forma, fatores tais como “[...] fotoperíodo, temperatura e intensidade luminosa podem determinar nas espécies a época ideal de colheita e o local de cultivo em que poderá se obter maiores quantidades do princípio ativo” (SOUZA et al., 2011b).

Para plantas que apresentam óleos essenciais, o período da manhã é recomendado para a colheita (NAGAO, 2003 citado por LUZ; EHLERT; INNECCO, 2009), porém existem as particularidades de cada espécie (LUZ; EHLERT; INNECCO, 2009).

Por serem substâncias extremamente complexas, podendo conter 100 ou mais compostos orgânicos (CASTRO et al., 2004b), os óleos essenciais podem ser quantificados e identificados através de técnicas cromatográficas ou espectroscópicas (CASTELO; DEL MENEZZI; RESCK, 2010).

Os componentes que normalmente formam os óleos essenciais oferecem certas dificuldades de separação e de identificação, devido à existência de diversos compostos isoméricos e da instabilidade de certos terpenos (RUDLOFF, 1974 citado por FONSECA, 2001). Quanto aos métodos de extração dos óleos essenciais, eles podem variar conforme a localização do óleo na planta e com a proposta de seu uso; entre os métodos mais comuns encontra-se o arraste por vapor d'água.

De acordo com Lupe (2007), os constituintes do material vegetal possuem pressão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Na extração em aparelho de Clevenger, o óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na_2SO_4 anidro, podendo o método ser utilizado para extrair óleos de plantas frescas.

Na identificação da composição química dos óleos essenciais, a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas é um dos métodos mais indicados (CG/EM) (CASTRO et al., 2004b), enquanto a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) constitui-se em uma técnica de análise poderosa e versátil para estudos estruturais moleculares.

Baseando-se na absorção de energia na gama das radiofrequências por partes de núcleo em uma molécula submetida a um forte campo magnético, a RMN é uma das mais importantes técnicas para a obtenção de informação física, química, eletrônica e estrutural das moléculas, de um modo não destrutivo, podendo fornecer informação acerca da estrutura tridimensional e da dinâmica das moléculas no estado líquido ou sólido (ALVES, 2010).

Masetto et al. (2011), através de análise por CG/EM, obtiveram como componentes majoritários das inflorescências de *Lavandula dentata* (Lamiaceae), monoterpenos hidrocarbonados (α -pineno, β -pineno e limoneno) e monoterpenos oxigenados (1,8-cineol, fenchona, linalol, α -fenchol e cânfora).

Costa Filho, Encarnação e Oliveira (2006) analisaram o óleo essencial de *O. gratissimum* var. *macrophyllum* indicando o eugenol como componente majoritário. BIASI et al. (2009), ao estudarem a composição química do óleo essencial de *O. gratissimum* confirmaram que o quimiotipo estudado foi o eugenol, com atividades antifúngicas e antibacterianas comprovadas.

Effraim, Jacks e Sodipo (2001) citam três quimiotipos para *Ocimum gratissimum*, eugenol, timol e geraniol, sendo que seus compostos aromáticos têm grande importância na indústria farmacêutica, principalmente por conter eugenol (70-80%) e geraniol (80-90%). “O óleo essencial desta espécie é rico em eugenol, um fenilpropanóide” (FACTOR et al, 2008); que é responsável pelo aroma de cravo-da-índia típico da espécie (BIASI et al., 2009). Os autores, em estudos sobre a influência da adubação orgânica em *O. gratissimum*, constataram que o teor de óleo essencial e do eugenol são maiores nas folhas do que nas flores.

A estrutura química de compostos voláteis comumente encontrados em *Ocimum gratissimum*, está representada a seguir:

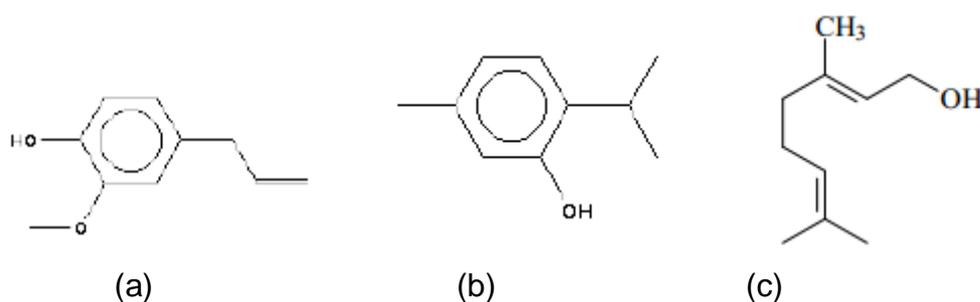


Figura 3. Estrutura química de compostos presentes nos óleos essenciais de *Ocimum* (a) Eugenol (b) Timol (c) Geraniol.
 FONTE: JAKIEMIU, 2008. ROSADO et al., 2011.

Diante das afirmações que o conteúdo e a composição dos óleos essenciais podem variar em função de vários fatores, é necessário que estudos sejam conduzidos visando detectar as condições ideais de cultivo e coleta para maximizar a produção e obtenção de óleos essenciais com qualidade de seus princípios ativos.

3.6 Análise molecular e citogenética em estudos de identificação de espécies vegetais

Áreas do conhecimento, tais como a Biologia, ao se integrarem à Física, Biofísica, Bioquímica e Genética, trazem como consequências para a humanidade, grandes avanços na ciência, tais como a descoberta do DNA como material básico constituinte dos genes, culminando no desenvolvimento da Biologia Molecular (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Pesquisas na área de Biologia Molecular associadas ao controle de qualidade de sementes têm evoluído rapidamente e o desenvolvimento de novas técnicas apresenta-se como ferramenta útil na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares que auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, manipulação e identificação do material genético, assim como na preservação desses materiais (CARVALHO; VIEIRA; PINHO, 2000).

Comparados aos morfológicos, os marcadores moleculares se mostram mais versáteis, rápidos e seguros.

Os principais marcadores moleculares utilizados para a identificação de cultivares e da pureza genética envolvem a análise de proteínas e de DNA (CARVALHO; VIEIRA, PINHO, 2000).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996) um marcador molecular é todo e qualquer fenótipo de um gene expresso (isoenzimas) ou segmento de DNA; os marcadores moleculares podem ser classificados de acordo com a metodologia usada para sua identificação. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, é evidenciado pela fragmentação da molécula do DNA por enzimas de restrição e observado pela hibridização destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. De acordo com os autores, a presença ou ausência de sequências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas por enzimas de restrição pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo.

Alguns marcadores são baseados na técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR- *Polmyerase Chain Reaction*). A tecnologia de PCR, idealizada por Kary Mullis, na década de 80, envolve a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento de DNA na presença da enzima DNA polimerase resistente ao calor

(*Taq* polimerase). Cada ciclo de PCR envolve 3 etapas, que são: desnaturação, anelamento e extensão (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). A descoberta de novas gerações de marcadores, baseados na seqüência do DNA tem possibilitado maior detecção de polimorfismo em comparação com marcadores morfológicos ou baseados na análise de proteínas (XAVIER et al., 2005).

A técnica de PCR possibilitou marcadores tais como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), bastante utilizados devido à facilidade de uso, rapidez e baixo custo (VIDAL; LAMEGO; NUNES, 2005).

Segundo Lopes et al. (2002), além de serem métodos rápidos e relativamente simples, são sensíveis e revelam vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética de seqüências-alvo.

No método RAPD, ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, o polimorfismo é revelado através da amplificação de locos usando-se *primers*, seqüências curtas de oligonucleotídeos, que quando submetidos a condições apropriadas de temperatura se anelam a seqüências genômicas complementares (LOPES et al., 2002). Para que haja a amplificação de fragmento RAPD no genoma pela DNA polimerase, duas seqüências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar adjacentes e em orientação oposta.

Uma etapa básica para os testes com marcadores moleculares é a extração do DNA genômico em quantidade e qualidade adequados (BELLON et al., 2005). As paredes celulares do material botânico devem ser rompidas, o que pode ser feito utilizando-se tubo de microcentrífuga e bastão de vidro, seguindo-se de ruptura das membranas celulares, pelo brometo de cetiltrimetilamônio (*CTAB-cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Ainda conforme os autores, o uso de tampões de extração, pH em torno de 8,0, evita a degradação do DNA pelas DNAses; e para que os ácidos nucléicos sejam separados de proteínas, utiliza-se fenol e/ou clorofórmio, enquanto o CTAB solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo, facilitando a precipitação.

Em função da quantidade de DNA produzido, é possível a visualização dos fragmentos amplificados sob a forma de uma banda de um gel de poli-acrilaminada ou agarose, e visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo (EtBr) sob luz UV (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

“O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização dos dois *primers*” (LOPES et al., 2002).

Dentro do núcleo da célula o DNA sofre um supercondensamento, auxiliado por proteínas histonas e não- histonas, para formar os cromossomos, que podem ser estudados através da Citogenética, que engloba os estudos relacionados com o cromossomo, isolado ou em conjunto; condensado ou distendido, sua morfologia, organização e variação (BRAMMER; ZANOTTO; CAVERZAN, 2007).

Vários autores afirmam que o estudo citogenético auxilia na resolução de problemas taxonômicos, cultivo e melhoramento genético (PEDROSA et al., 1999; VIEGAS et al., 2007; YUYAMA; CAVALHEIRO; VANZELA, 2010). Furlan e Aoyama (2012) destacam a importância do estudo do número de cromossomos dentro de um táxon e entre táxons distintos, por ser um dos parâmetros mais utilizados na caracterização citológica de uma espécie, podendo, inclusive, ter implicações na identificação de cultivares. Segundo Pedrosa et al. (1999) o número cromossômico quando aliado a outros caracteres citológicos, auxilia no entendimento das alterações genéticas envolvidas em estudos evolutivos, bem como na delimitação taxonômica das espécies.

Para Brammer, Zanotto e Caverzan (2007), a análise cromossômica tem sido de grande importância para o entendimento da evolução, genética e estabilidade cariotípica dos materiais estudados.

A citogenética de caráter investigativo é importante para a identificação e o entendimento do comportamento meiótico de espécies, fornecendo dados como número de cromossomos e nível de ploidia. Quando se analisa o comportamento meiótico, possíveis erros apresentados durante o processo celular podem ser esclarecidos. “Esses erros meióticos causam anormalidades, que, por sua vez, acarretam em disfunções na formação e viabilidade do grão de pólen, que podem esclarecer sobre a qualidade de propagação da espécie [...]”. (PASCOTTO; ROMAGNOLO, 2008).

O estudo e a caracterização dos grãos de pólen são fundamentais para diferentes áreas, em especial, para a taxonomia, o melhoramento genético, a filogenia e a paleobotânica.

Além, disso, dados da viabilidade do pólen podem ser correlacionados a anormalidades meióticas e auxiliar na seleção de material genético, podendo vir a se tornar uma ferramenta adicional na pesquisa agronômica (NUNES; BUSTAMANTE; MITTELMANN, 2012).

Palinologia, termo definido pelos ingleses Hyde & Willians, em 1944, referia-se aos estudos dos esporos e grãos de pólen das plantas e suas aplicações práticas (REIS, 2010). No Brasil, pesquisas na área são realizadas em espécies principalmente na região Centro-Oeste, Sul e Sudeste, ficando o Nordeste em desvantagem, principalmente devido à escassez de especialistas na área e ao pouco conhecimento da flora polínica (SILVA, 2007).

REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F.; GONÇALVES, N. R.; REIS, R. G. E.; GALLÃO, M. I.; INNECCO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamos. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 259-265, 2010.
- AIRES, R. F.; SILVA, S. D. A.; EICHOLZ, E. D. Análise de crescimento de mamona semeada em diferentes épocas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41. n. 8, p 1347-1353, 2011.
- ALMEIDA, J. A. R. PEIXOTO, P. C.; PASSOS, A. R.; SANTOS, J. F.; PEIXOTO, V. A. B. Diferentes métodos para a determinação da área foliar em genótipos de girassol. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 398- 403, 2011.
- ALMEIDA, M. A. Z. **Resposta do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) à aplicação de preparações homeopáticas**. 2002. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas Mediciniais**, 3 ed. Salvador: EDUFBA, 2011. 221 p.
- ALVES, J. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos**. 2010. 73f. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2010.
- ALVES, M. C. S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- AMARAL, L. I. V.; PEREIRA, M. F. D. A.; CORTELAZZO, A. L. Germinação de sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 273-285, 2000.
- AMORIM, I. L.; FERREIRA, R. A.; DADIVE, A. C.; CHAVES, M. M. F. Aspectos morfológicos do desenvolvimento de plântulas e mudas de trema (*Trema micrantha* (L.) Blum.) - Ulmaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 86-91, 2006.
- ARAÚJO, E. R. **Qualidade fisiológica, etiologia e patogenicidade de fungos assinalados em sementes de aroeira produzidas em três municípios da Paraíba**. 2008. 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba, 2008.
- ARAÚJO, R. C.; BRUCKNER, C. H. Biologia reprodutiva de fruteiras. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.) **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. p. 13- 38.
- ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D.; CASA, J.; CASTRO, D. M.; ARRUDA, V. M. Estudos fitoquímicos em plantas medicinais. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 4734-4741(Suplemento- CD ROM), 2011.

BARREIRO, A. P.; ZUCARELI, V.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 563-567, 2006.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; BARROS, A. M.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PEREIRA, A. V.; FERNANDES, F. D.; FERREIRA, M. E. Extração de DNA e obtenção de marcadores moleculares para diferentes espécies de interesse para o cerrado. In: **3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, 2005, Gramado: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2005.

BELTRATI, C. M. **Morfologia e anatomia de sementes**. In: Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal. Apostila. Rio Claro: Departamento de Botânica / Instituto de Biociências /UNESP, 1995. 98p.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas** (noções básicas) Jaboticabal: FUNEP, 1988, 42 p.

BENDAZZOLI, W. S. O azul de Renoir no céu de Galileu. **Conscientiae Saúde Revista Científica**, São Paulo, v. 1, p. 61-62, 2002.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. Plenum Press, New York. 1994. 445p.

BIASI, L. A.; MACHADO, E. M.; KOWALSKI, A. P. J.; SIGNOR, .; ALVES, M. A.; LIMA, F. I.; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L. C.; SCHEER, A. P. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, n. 27, n. 1, p. 35- 39, 2009.

BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK M. F.; SILVA P. A.; TORRES M. E. R.; MENEZES H. J. A. Efeitos de composições de substratos na produção de mudas de quiôid (*Ocimum gratissimum* L.). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 34, p. 105-108, 2003.

BLANK, A. F.; FONTES, S. M.; OLIVEIRA, A. S.; MENDONÇA, M. C.; SILVA-MANN, R.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Produção de mudas, altura e intervalo de corte em melissa. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 23, n. 3, p. 780-784, 2005.

BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 345-356, 2008.

BORÉM, A. Biotecnologia de Sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. 502 p. cap. 1, p. 1-34.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Acesso em 16/setembro/2012. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm>

BRANT, R. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSA, L. F.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FERRI, P. H.; CORREA, R. M. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1401- 1407, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. **Resolução- RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.htm. Acesso em 15 de fevereiro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 148 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. D.O.U. Poder Executivo. Brasília, 2006b.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo. Brasília, 2006c.

BRITO, A. C.; PEREIRA, D. A.; AMARAL, C. L. F. Influência da temperatura na germinação de *Ocimum canum* Sims. **Caatinga**, Mossoró, v.19, n.4, p.397-401, 2006.

CAMPOS, C. C. F. **Biologia reprodutiva de *Tibouchina heteromalla* Cogn. (Melastomataceae) e *Ocimum selloi* Benth (Lamiaceae)**. 2010, 83f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada). Universidade Federal de Lavras, 2010.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J. PAROUL, N.; TONIAZZO, G. ZBORALSKI, F.; PRICHOA, F. C. KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de Canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL.) ROWHER). **Perspectiva**, Erechim. v. 34, n.127, p. 123-133, 2010.

CAROVIC-STANKO, K.; LIBER, Z.; BESENDORFER, V.; JAVORNIK, B.; BOHANEK, B.; KOLAK, I.; SATOVIC, Z. Genetic relations among basil taxa (*Ocimum* L.) based on molecular markers, nuclear DNA content, and chromosome number. **Plant Systematics and Evolution**, n. 285, p. 13–22, 2010.

CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Multiciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, n. 7, 2006.

CARVALHO, L. R.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; CARVALHO, M. L. M. Classificação de sementes de espécies florestais dos gêneros *Nectandra* e *Ocotea* (Lauraceae) quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p.1-9, 2008.

CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C; PINHO, E. V. R. V. Técnicas moleculares em Sementes. **Biotecnologia**, Brasília, v. 3, n.17, p. 44-47, 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 424 p.

CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}C ; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.

CASTRO, F. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Alma, mente e cérebro na pré-história e nas primeiras civilizações humanas. **Psicologia: Reflexão e Crítica**. Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 37-48, 2010.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2 ed. Viçosa, MG, 2004a. 113 p.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004b.

CAVICHIOLO, L. E.; BOEGER, M. R. T.; MARQUES, M. C. M. Estrutura dos eófilos e cotilédones de quatro tipos de plântulas da Floresta de Restinga, Paraná. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 64, n. 2, p. 5-14, 2009.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte**. 2002. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2002.

COSTA FILHO, L. O.; ENCARNAÇÃO, C. R. F.; OLIVEIRA, A. F. M. Influência hídrica e térmica no crescimento e desenvolvimento de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.8, n.2, p.8-13, 2006.

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; GUIMARÃES, R. M. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocimum selloi* Benth. sob condições de luz, temperatura e tempo de armazenamento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 675- 680, 2010.

COSTA, R. S.; OLIVEIRA, I. V. M.; MÔRO, F. V.; MARTINS, A. B. G. Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação do jambo vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 117-120, 2006.

CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H., BATISTA, M.A. Plantas medicinais: plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 28-34, 2000.

DE LA CRUZ, M. G. Uso de Óleos Essenciais na Terapêutica. In: COELHO, M. F. B.; COSTA JÚNIOR, P.; DOMBROSKI, J. L. D. (Org.). **Diversos Olhares em Etnobiologia, Etnoecologia e Plantas Medicinais**. 1 ed. Cuiabá: UNICEN, 2003, p. 219-234.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 48-74, abr. 2011.

DINALLI, R. P.; CHAVES, D. C. D.; GAZOLA, R. N.; CASTILHO, R. M. M. Germinação de espécies ornamentais e medicinais. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v.17, n.2, p.53-59, dez, 2010.

DUKE, J. A. Keys for the identification of seedlings of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. n. 52, p. 314- 350, 1965.

EFFRAIM, K. D.; JACKS, T. W.; SODIPO, O. A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. **African Journal of Biomedical Research**. Borno State, Nigéria.v.6, p. 21-25, 2001.

FACANALI, R. **Estudo da Biologia reprodutiva, diversidade genética e química de populações de *Ocimum selloi* Benth**. 2008. 129 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo. 2008.

FACTOR, T. L.; PURQUERIO, L. F. V.; LIMA JUNIOR, S.; ARAÚJO, J. A. C.; CURTI, E. L.; TIVELLI, S. W. Crescimento e teor do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L. cultivados sob malhas coloridas. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, Suplemento, p. 5300- 5304, 2008.

FAGUNDES, L. K.; STRECK, N. A.; ROSA, H. T.; WALTER, L. C.; ZANON, A. J.; LOPES, S. J. Desenvolvimento, crescimento e produtividade de mandioca em diferentes datas de plantio em região subtropical. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.12, p. 2460-2466, 2010.

FARIA, T. J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J. R. P.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 867- 871, 2006.

FELICIANO, A. L. P.; MARANGON, L. C.; HOLANDA, A. C. Morfologia de sementes, de plântulas e de plantas jovens de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 8, n. 1, p. 198- 206, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em Análise Genética**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA/ Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia-CENARGEN, 1996. 220p.

FLÁVIO, N. S. D. S.; SALES, N. L. P.; AQUINO, C. F.; CATAO, H. C.; DOURADO, E. R.; AQUINO. Óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Annona crassiflora* no tratamento de sementes de sorgo. **Cadernos de Agroecologia**, Fortaleza, v. 6, n. 2, 2011.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**. n. 7, 2006.

FONSECA, M. C. M. **Crescimento, composição do óleo essencial, teores de óleo e de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini**. 2001. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

FONSECA, P. C.; NUNES, U. R.; NUNES, S. C. P. Aspectos da germinação de sementes de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.4, p.633-637, 2012.

FONTANARI, I.; BAZZANELLA, G. **Piante officinali e aromatiche**. Editora Saturnia, Trento, 2009. 127 p.

FRANCO, A. L. P.; OLIVEIRA, T. B.; FERRI, P. H.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 208- 220, 2007.

FURLAN, M. R.; AOYAMA, E. M. Número cromossômico de *Ocimum basilicum* L. cultivar Genovese. **Thesis**, São Paulo, ano IV, n.17. p. 52-59, 2012.

GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Palinologia**. Curso de capacitação de monitores e educadores. Instituto de Botânica, São Paulo, out. 2006.

GEMAQUE, R. C. R. DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; FARIA, J. M. R. Efeito das secagens lenta e rápida em sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 4, p. 329-335, 2005.

GMACH, J. R. **Métodos para superação da dormência de sementes de tabaco**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2008.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GODOY, L. J. G.; YANAGIWARA, R. S.; VILLAS BÔAS, R. L.; BACKES, C.; LIMA, C. P. Análise da imagem digital para estimativa da área foliar em plantas de laranja "pêra". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 420-424, 2007.

GONÇALVES, C. B. S.; SILVA, C. B.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S. Atividades de insetos em flores de *Ocimum gratissimum* L e suas interações com fatores ambientais. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.21, n. 3, p.128-133, 2008.

GUPTA, R. Basil (*Ocimum* spp). **G- 15 Gene banks for Medicinal & Aromatic Plants Newsletter**, v. 5/ 6, p. 1-3, 1994.

HILTUNEM, R.; HOLM, Y. **Basil: the genus *Ocimum***. Editora Harwood Academic, 1999, 167 p.

HORTICULTURA BRASILEIRA. Vitoria da Conquista: Associação Brasileira de Horticultura. v. 29, n. 2, jul., 2011. (Suplemento).

HORTICULTURA BRASILEIRA. Vitoria da Conquista: Associação Brasileira de Horticultura. v. 30, n. 2, jul., 2012. (Suplemento).

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JORGE, M. H. A.; EMERY, F. S.; SILVA, A. M. **Enraizamento de estacas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.)**. Corumbá, MS. EMBRAPA, Comunicado Técnico 56, 2006.

JORGE, S. S. A. **Plantas medicinais: Coletânea de saberes**, 2009. 81p.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS. P.; DONOGHUE, M. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2 ed Sinauer Associates, Inc. Sunderland. p 466-468, 470-473, 2002.

KOBA, K.; POUTOLI, P. W.; RAYNAUD, C.; SANDA, K. Antifungal activity of the essential oils from *Ocimum gratissimum* L. grown in Togo. **Journal of Scientific Research**, v. 1, n. 1, p. 164- 171, 2009.

KOPPER, A. C.; MALAVASI, M. M.; MALAVASI, U. C. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2 p. 160-165, 2010.

LEMOS, J. A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, A. A. L. M. R. R. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 55- 58, 2005.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J.D. Efeitos de giberelinas, citocininas e do nitrato de potássio, no processo germinativo de sementes de limoeiro 'cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.1, p.111-116, 1999.

LEONHARDT, C.; BUENO, O. L.; CALET, A. C.; BUSNELLO, A.; ROSA, R. Morfologia e desenvolvimento de plântulas de 29 espécies arbóreas nativas da área da Bacia Hidrográfica do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v.63, n.1, p.5-14, 2008.

LIMA, M. C.; AMARANTE, L.; MARIOT, M. P.; SERPA, R. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p.45-50, 2011.

LOPES, J. C.; CORRÊA, N. B.; DIAS, M. A. Efeito de pré-tratamentos com água e nitrato de potássio na germinação e vigor de sementes de salsa lisa. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 46, 2006, Goiânia-GO. **Horticultura Brasileira**. Brasília-DF: Associação Brasileira de Horticultura, v. 24, p. 2952-2955, 2006.

LOPES, P. S. N.; AQUINO, C. F.; MAGALHÃES, H. M.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S. Tratamentos físicos e químicos para superação de dormência em sementes de *Butia capitata* (MARTIUS) BECCARI. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 120-125, 2011.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, ano V, n. 29, p. 56-60, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008, 544 p.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Estadual de Campinas, 2007.

LUZ, J. M. Q.; EHLERT, P. A. D.; INNECCO, R. Horário de colheita e tempo de secagem de alfavaca-cravo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 539-542, 2009.

MAGALHÃES, P. M.; PEREIRA, B.; FIGUEIRA, G. M.; MONTANARI JUNIOR, I.; ALVES, M. N.; DONALISIO, M. G.; ARCHANGELO JUNIOR, U. A pesquisa agrônômica das plantas medicinais: Um convênio com a natureza. **Multiciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**. n. 7, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em Medicina Veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: EDUFV, 2003. 220 p.

MASETTO, M. A. M.; DESCHAMPS, C.; MÓGOR, A. F.; BIZZO, H. R. Teor e composição do óleo essencial de inflorescências e folhas de *Lavandula dentata* L. em diferentes estádios de desenvolvimento floral e épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.4, p.413-421, 2011.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4 ed. Fortaleza: UFC, 2002. 346p.

MBATA, T. I.; SAIKIA, A. Antibacterial activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*. **Internet Journal of Food Safety**. v. 7, p. 15-19. 2005.

MELO, M. F. F.; VARELA, V. P. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de duas espécies florestais da Amazônia. I. *Dinizia excelsa* Ducke (Angelimpedra). II *Cedrelinga catenaeformis* Ducke (Cedrorana) - Leguminosae: Mimosoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p.54-62, 2006.

MING, L. C.; CHAVES, F. C. M.; SILVA, M. A. S. Recursos genéticos de plantas medicinais: recentes resultados de pesquisa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, Suplemento, Palestras, 2001.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, p.579- 586, 2004.

NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BONO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential oil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 675- 678, 1999.

NG, F.S.P. Strategies of establishment in Malayan forest trees. In: **Tropical trees as living systems**. TOMLINSON, P. B. P.; ZIMMERMANN, M. H. (Eds.). London: Cambridge University Press, 1978. p. 129-162.

NWEZE, E. I.; EZE, E. E. Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 37, 2009. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/9/37>. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

NOGUEIRA, F. C. B.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLÃO, I. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearensis* Ducke (pau violeta) – Fabaceae. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 24, n. 4, p. 978- 985, 2010.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da Química Medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 227-240, 2009.

NUNES, R. C.; BUSTAMANTE, F. O.; MITTELMANN, A. MORPHOLOGY AND POLLEN VIABILITY OF *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 180 -188, 2012.

OGENDO, J. O.; KOSTYUKOVSKY, M.; RAVID, U.; MATASYOH, J. C.; DENG, A. L.; OMOLO, E. O.; KARIUKI, S. T.; SHAYYA, E. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insects pests attacking stored food products. **J. Stored Products Research**, v. 44, p. 328-334, 2008.

OLIVEIRA, A. R. M. F. **Produção de óleo essencial de *Mentha x Piperita* var. *citrata* sob diferentes condições de manejo**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

OLIVEIRA, R. A. G.; SILVA, M. S. H. **Plantas medicinais na atenção primária à saúde**. João Pessoa: UFPB, 1994. 64p.

OLIVEIRA, V. C. S., MOURA, D. M. S., LOPES, J. A. D., ANDRADE, P. P., SILVA, N. H., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1053-1059, 2008.

PASCOTTO, C. R.; ROMAGNOLO, M. B. **Caracterização citogenética e morfológica de algumas espécies de plantas nativas da floresta Semidecidual na estação ecológica do Caiuá, Paraná**. Projeto de pesquisa. Universidade Paranaense, UNIPAR, Campus Paranavaí, PR. 2008.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bulletin**, v. 47, n. 3, p.403-435, 1992.

PATON, A.; R. M. HARLEY; M. M. HARLEY. *Ocimum*: an overview of relationships and classification. In **Medicinal and aromatic plants and industrial profiles**. The genus *Ocimum* (HOLM, Y., HILTUNEN, R. eds). Harwood Academic Press: Amsterdam, 1999. 167 p.

PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; RIBAS, J. L.; SPINARDI, G. M.; DOLL, P. M.; ARTONI, R. F.; ZAWADZKI, S. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential of estragole and eugenol chemotypes of *Ocimum selloi* Benth. essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26, n. 6, p. 846- 851, 2007.

PEDROSA, A.; GITAÍ, J.; SILVA, A. E. B.; FELIX, L. P.; GUERRA, M. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco: V. **Acta Botanica Brasilica**, v. 13, n.1, p. 49-60. 1999.

PEREIRA, R. C. A.; LOPES, J. V. M. **Recomendações técnicas para a produção de manjeriço-santo (*Ocimum tenuiflorum* L.)**. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2006. 2 p. (Comunicado Técnico 122).

PEREIRA, T. S. Bromelioideae (Bromeliaceae): morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. **Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v.29, p.115-154, 1988.

PEREIRA, T. S. Germinação de sementes de *Bauhinia forficata* Link. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.1, p.77-82, 1992.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário** (apostila). Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/ USP, 2004. 25 p.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M.C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed editora, 2004. 323p. cap.18, p. 283-297.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista 'Julio de Mesquita Filho'. Botucatu, SP, 2012.

PUSHPANGADAN, P.; BRADU, B. L. Basil. In: CHADHA, K.L.; RAJENDRA GUPTA, eds, **Advances in Horticulture** v. 11- Medicinal and Aromatic Plants. Malhotra Publishing House, New Delhi, 1995.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

REBOUÇAS, F. S. **Cultivo *in vitro* de Plantas Medicinais: *Ocimum basilicum* L e *Cissus sicyoides* L.**, 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.

REGO, S. S.; NOGUEIRA, A. C.; KUNIYOSHI, Y. S.; SANTOS, A. F. Caracterização morfológica do fruto, da semente e do desenvolvimento da plântula de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. e *Myrceugenia gertii* Landrum – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 52-60, 2010.

REIS, C. I. C. **Análise palinológica e mineralógica de solos portugueses e o seu potencial na prática forense**. 2010. 178f. Dissertação (Mestrado em Biologia do Desenvolvimento). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2010.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003, p. 43- 74.

RESSEL, K.; GUILHERME, F. A. G.; SCHIAVINI, I; OLIVEIRA, P. E. Ecologia morfofuncional de plântulas de espécies arbóreas da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 311-323, 2004.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology** v. 1, p. 499-514, 1973.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano II. n. 9, p. 40- 43, 1999.

ROSADO, L. D. S.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; NICULAU, E. S.; ALVES, P. B. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço cv. Maria Bonita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 291-296, 2011.

ROSSET, M.; ZAMARION, V. M.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J.; PINTO, J. P.; BARBOSA, A. M.; SOUZA, J. R. P. Estudo químico da fração diclorometânica do extrato de *Ocimum gratissimum* L. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 515- 520, 2005.

SADAVA, D.; HILLIS, D. M.; HELLER, H. C.; BERENBAUM, M. **Life: the science of Biology**. Ninth Edition, W. H. Freeman, 2011.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, p.3-21, 2001.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antifúngica de extratos vegetais e animais da região do Cariri. **Cadernos de Cultura e Ciências**, ano v, v. 1, n. 2, p. 53- 65, 2010.

SANTOS, R. L.; GUIMARÃES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.4, p. 486- 491, 2011.

SAWASATO, J. T. **Caracterização agronômica e molecular de *Paspalum urvillei* Steudel**. 2007. 205f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SERT, M. A.; BONATO, C. M.; SOUZA, L. A. Germinação da semente. In: SOUZA, L. A. (org.). **Sementes e plântulas**: Germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa: Todapalavra, 2009. 279 p. cap. 2, p. 89- 117.

SEVERO, R. B. O. **Identificação de planta medicinal baseada em espectroscopia e lógica Fuzzy**. 2010. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2010.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, A. B. **Biologia Reprodutiva e Citogenética de Alfavaca do Campo (*Ocimum campechianum* Mill.)**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista, 2007.

SILVA, F. H. M. **Contribuição à Palinologia das Caatingas**. 2007. 182f. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Federal de Feira de Santana, 2007.

SILVA, F., CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas**: pós-colheita e óleo essencial. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2000. 153p.

SILVA, S. S.; REIS, R. P.; FERREIRA, P. A. Naturae value: the evolution of this concept. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 1, p. 9- 15, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003, p. 467- 495.

SOUZA, G. S.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; PINTO, J. E. B. P.; RESENDE, M. G.; BERTOLUCCI, S. K. V. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 3, p. 1- 11, 2011a.

SOUZA, L. A. **Sementes e plântulas**: germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2009. 279 p.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; ALBIERO, A. L. M.; MONTANHER, R.; PAOLI, A. A. S. Morfologia da plântula e do tirodendro. In: SOUZA, L. M. (org.). **Sementes e plântulas**: germinação, estrutura e adaptação. Ponta grossa: Todapalavra, 2009. 279f. p. 121- 190.

SOUZA, L. A.; PAOLI, A. A. S. Estrutura da semente. In: SOUZA, L. M. (org.). **Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação**. Ponta grossa: Todapalavra, 2009. 279f. p. 51- 87.

SOUZA, G. S.; SILVA, J. S.; SANTOS, A. R.; GOMES, D. G.; OLIVEIRA, U. C. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em alfavaca cultivada sob malhas coloridas e adubação fosfatada. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.13, p. 296- 306, 2011b.

SOUZA, M. F.; SILVA, A. B.; SILVA, A. H. B.; SILVA, A. B.; AMARAL, C. L. F. Morfologia e biologia floral da alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.). **Horticultura Brasileira**, Goiânia, v. 24, n. 1, p. 243-243, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates. 2002. 690 p.

TONIN, G. A.; GATTI, A. B.; CARELLI, B. P.; PEREZ, S. C. J. G. A. Influência da temperatura de condicionamento osmótico na viabilidade e no vigor de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.27, n.2, p.35-43, 2005.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA- FILHO, R. R.; MORGADO-DIAZ, J. A.; KOREHISA, M. P.; DIAS FILHO, B. P.; GARCIA, C. D.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S.; LOPES, A. H.; ALVIANO, C. S., NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n.2, p. 99-105. 2006.

VIDAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; NUNES, A. L. Otimização do número de *primers* empregados em RAPD para detectar variabilidade genética entre acessos de picão-preto. **Scientia Agraria**, v.6, n.1-2, p.71-77, 2005.

VIÉGAS, J.; PORTO, B. L.; COELHO, M. A. N.; CORRÊA, M. G. S.; CORRÊA, L. B. Citogenética de dois exemplares de *Anthurium urvilleanum* coletados no mesmo município. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 882-884, jul. 2007.

VIEIRA, D. C. M.; SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Seed germination and seedling emergence of the invasive exotic species, *Clausena excavate*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.70, n.4, p. 1015-1020, 2010.

VIEIRA, P. R. N. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente a cepas de *Candida* spp e *Microsporum canis***. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2009.

VIEIRA, R. F.; GOLDSBROUGH, P.; SIMON, J. E. Genetic diversity of basil (*Ocimum* spp.) based on RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 1, p. 94- 99, 2003.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATONB, A.; SIMON, J. E. Uso de marcadores químicos no estudo da diversidade genética de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 12, supl., p. 126-129, 2002.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. Documentos florestais, n. 17, p. 1-26, 2003.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.4, p.353-359, abr. 2005.

YUYAMA, P. M.; CAVALHEIRO, A. L.; VANZELA, A. L. L. Estudo citológico em *Aegiphila sellowiana*, *Vitex montevidensis* e *Citharexylum myrianthum* da bacia do Rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 65, n. 1, p. 101-105, 2010.

YUNNES, R. A.; PEDROSA, R, C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147- 152, 2001.

CAPÍTULO 1- ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO E DA PLÂNTULA E INFLUÊNCIA DA LUZ, TEMPERATURA E KNO_3 NA GERMINAÇÃO DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA

RESUMO

As espécies que compõem o gênero *Ocimum* (Lamiaceae), conhecidas como manjericões e alfavacas, são amplamente utilizadas na medicina popular devido à produção de compostos aromáticos com propriedades terapêuticas. A alfavaca-cravo é um subarbusto ramificado, com típicas inflorescências terminais, produtor de óleos essenciais com atividades antifúngicas e antimicrobianas. A alfavaca roxa assemelha-se morfológicamente à alfavaca-cravo, porém, há instabilidade de sua coloração, que passa de roxo para verde sob condições de baixa luminosidade. O objetivo desse trabalho consiste em estudar os efeitos dos fatores temperatura, luz e nitrato de potássio (KNO_3) em sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, além de descrever e ilustrar os caracteres morfológicos da germinação e da plântula das espécies. Os testes foram conduzidos seguindo delineamento inteiramente casualizado (DIC) dispostos em um arranjo fatorial $2 \times 2 \times 5$, sendo duas condições de luminosidade (luz e escuro constante); dois níveis de nitrato de potássio (0%; 0,2%); e cinco temperaturas (20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 20-35°C). As sementes de alfavaca-cravo são fotoblásticas positivas e as da alfavaca-roxa, fotoblásticas positivas preferenciais. A germinação não excedeu 24%, em todos os tratamentos analisados. O tratamento 30°C, na luz, promoveu maior porcentagem de germinação das sementes de alfavaca-cravo, independente do KNO_3 , enquanto para a alfavaca-roxa, a maior germinabilidade foi verificada a 20-35°C, com KNO_3 e no escuro. A germinação é do tipo epígea fanerocotiledonar, com emergência inicial direta. A raiz primária é curta e esbranquiçada, os cotilédones são foliáceos, verdes, pedicelados; o hipocótilo é robusto e de coloração branca. Os protófilos são opostos e simples e com nervação camptódroma.

Palavras-chave: Lamiaceae. Alfavaca. Propagação.

ABSTRACT

Species comprising the genus *Ocimum* (Lamiaceae), known as alfavacas and basil are widely used in folk medicine due to its aromatic compounds with therapeutic properties. Alfavaca-cravo is an ramified shrub with typical terminal inflorescences that produces essential oils with antimicrobial and antifungal properties. The morphology of the alfavaca-roxa is similar to alfavaca-cravo, however there is instability of its purple color, that changes from purple to green under low light conditions. In this work it was intended to investigate the effects of temperature, light and KNO_3 on the germination of its seeds and characterizing seedling morphology and seed germination. Experiment was carried out using a completely randomized design in a $2 \times 2 \times 5$ factorial arrangement: two different light expositions; KNO_3 (0%; 0,2%) and five temperatures. Alfavaca-cravo is positive photoblastic and alfavaca-roxa, photoblastic preferential. Germination did not exceed 24% in all treatments. Temperature of 30°C was the best condition for seed germination for alfavaca-cravo and 20-35°C for alfavaca-roxa with KNO_3 , darkness. Germination of alfavaca-cravo and alfavaca-roxa is epigeous. The primary root is short; foliaceous cotyledons; hypocotyls is robust and white; protophylus are opposite and simple, the venation is camptodrome.

Keywords: Lamiaceae. Wild basil. Propagation.

1. INTRODUÇÃO

As espécies que compõem o gênero *Ocimum* (Lamiaceae) são conhecidas como manjericões e alfavacas (BRITO; PEREIRA; AMARAL, 2006). Os óleos essenciais produzidos pelas diferentes espécies do gênero possuem propriedades terapêuticas, sendo muito utilizados na medicina popular (EFFRAIM; JACKS; SODIPO, 2001; LORENZI; MATOS, 2008). *Ocimum gratissimum* L., é conhecida popularmente como “alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo” (LORENZI; MATOS, 2008), e como outras espécies do gênero, apresenta propriedades medicinais, destacando-se pela presença dos compostos eugenol (70-80%) e geraniol (80-90%) (EFFRAIM; JACKS; SODIPO, 2001).

Quanto à sua morfologia, a alfavaca-cravo possui flores organizadas em típicas inflorescências terminais, seus frutos são do tipo esquizocarpo (SOUZA et al., 2006) contendo sementes pequenas, amarronzadas e ligeiramente alongadas.

A alfavaca-roxa, identificada somente em nível de gênero, também é uma espécie aromática, cujas folhas são simples, arroxeadas na parte adaxial e verdes na abaxial. O caule é quadrangular e as flores estão agrupadas em inflorescências de coloração roxa, mesma cor do caule. Essa coloração sofre variações, dependendo de onde a espécie esteja sendo cultivada. Percebe-se que em baixa luminosidade, há instabilidade da cor e as plantas passam da coloração arroxeadada para verde.

O estudo da germinação e dos caracteres morfológicos das sementes e plântulas é de grande importância por contribuir para o conhecimento do processo reprodutivo de espécies vegetais, podendo auxiliar no esclarecimento de questões relativas à taxonomia, filogenia e ecologia (SANTIAGO; PAOLI 1999; FERREIRA et al., 2001).

A observação do desenvolvimento da plântula permite diferenciar grupos taxonômicos muito semelhantes entre si bem como auxiliar nos trabalhos de tecnologia de sementes, como testes diretos e indiretos para avaliação da germinação e vigor das sementes, podendo vir a subsidiar a produção de mudas de espécimes de importância econômica (AMORIM et al., 2006; COSTA et al., 2006; PEREIRA, 1988).

A morfologia de plântulas nos estádios iniciais de desenvolvimento serve de subsídio para a produção de mudas, além de ser fundamental para o processo de estabelecimento das plantas em condições naturais (BELTRATI, 1995).

Além dos aspectos morfológicos, o estudo da germinação é fundamental para caracterização das espécies. Lopes, Pereira e Martins Filho (2002), enfatizam que o conhecimento das condições adequadas para a germinação de sementes de uma espécie é de fundamental importância, principalmente pelas respostas diferenciadas que ela pode apresentar devido a diversos fatores, como dormência, condições ambientais (água, luz, temperatura e oxigênio) e ocorrência de patógenos.

Para Bewley e Black (1994) a temperatura influi na germinação, especialmente por alterar a velocidade de absorção de água e das reações químicas que desencadeiam o processo germinativo. Algumas espécies apresentam maior germinabilidade em condições de temperaturas alternadas enquanto outras respondem bem tanto a temperatura constante como à alternada (LIMA; BORGHETTI; SOUSA, 1997), sendo que a alternância de temperatura pode estar relacionada a uma adaptação às flutuações naturais do ambiente (BORGES; RENA, 1993; FARON et al., 2004). No campo, as sementes são comumente submetidas às flutuações de temperatura (baixas temperaturas noturnas e altas temperaturas diurnas) (BEZERRA et al., 2006).

A luz, por sua vez, é de fundamental importância para as plantas pela ação direta ou indireta na regulação do crescimento e desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2009). De acordo com a sensibilidade à luz, as sementes, basicamente, são classificadas em fotoblásticas positivas, quando há maior germinação na presença de luz, fotoblásticas negativas, com maior germinação no escuro, ou fotoblásticas neutras, cuja germinação independe da condição de luz (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

De maneira geral pretende-se que as sementes de uma espécie tenham germinação rápida e uniforme, o que, muitas vezes, só se torna possível com a utilização de tratamentos adequados. O efeito positivo da adição de solução aquosa de nitrato de potássio (KNO_3) no substrato de germinação é bem registrado na literatura (FARON et al., 2004; GMACH, 2008). O KNO_3 é um agente osmótico inorgânico que aumenta a concentração da solução, diminuindo seu potencial hídrico, estando incluído no grupo dos produtos químicos que limitam ou inibem o

metabolismo respiratório, podendo promover a respiração em algumas espécies (LOPES; CORREA; DIAS, 2006).

GUPTA (2002), utilizando nitrato de potássio em estudos com espécies de *Ocimum*, conseguiu a superação da dormência das sementes. Dessa forma, regimes de temperatura, luz e tratamentos químicos são fatores que afetam a germinação de sementes (GMACH, 2008) devendo ser conhecidos e estudados para melhor produção das espécies de interesse.

Apesar de *O. gratissimum* ser um arbusto aromático amplamente utilizado na medicina popular, pesquisas sobre a germinação de suas sementes são escassas. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram estudar os efeitos dos fatores temperatura, luz e nitrato de potássio (KNO_3) em sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa; bem como descrever e ilustrar os caracteres morfológicos da germinação e da plântula das espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico e local do experimento

As sementes utilizadas neste estudo foram coletadas durante os meses de janeiro e fevereiro de 2011, de exemplares de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa cultivadas na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana-NEPAU, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará-UFC, *campus* do Pici (Figura 4).



Figura 4. Cultivo das plantas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa no NEPAU, UFC. Fortaleza, CE, 2012.

Exemplares das plantas foram depositados no Herbário Prisco Bezerra da UFC registradas sob nº 49804 e nº 49805, para *Ocimum* sp e *Ocimum gratissimum*, respectivamente.

As inflorescências foram colhidas manualmente, com auxílio de uma tesoura de poda e posteriormente levadas ao Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias/CCA-UFC.

As inflorescências foram colocadas para secar em estufa elétrica a 35°C por um período de 7 dias e desmanchadas manualmente. Após o beneficiamento, as sementes foram acondicionadas em recipientes plásticos e mantidas sob refrigeração (6°C-10°C) até a realização dos experimentos.

2.2 Determinação do grau de umidade e peso de mil sementes

O grau de umidade foi determinado empregando-se estufa a 105±3°C, durante 24h, utilizando-se quatro repetições de 100 sementes cada. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade. Para o cálculo do peso médio de mil sementes foram utilizadas oito subamostras de 100 sementes de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

2.3 Teste de Germinação

Pelo fato de as sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa terem apresentado baixa germinação em testes preliminares, utilizando-se água, optou-se por testar o nitrato de potássio objetivando estimular a germinação das sementes dos espécimes.

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes semeadas em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido com água destilada na quantidade correspondente a 2,5 vezes o peso do papel, ou solução aquosa de nitrato de potássio (KNO₃) a 0,2%, conforme o tratamento.

As contagens da germinação foram feitas diariamente por um período de 28 dias. Foram consideradas germinadas as sementes com emissão da radícula (no mínimo a metade do comprimento da semente), sendo os resultados expressos em porcentagem. A luz foi fornecida por lâmpadas fluorescentes localizadas no interior das câmaras de germinação (BOD), enquanto a ausência de luz foi obtida envolvendo-se as placas de Petri em papel laminado e, em seguida, em plástico de polietileno preto; nesse caso, as observações foram realizadas sob luz de segurança verde (SOUZA; PEREIRA, 1992).

Os testes de germinação foram conduzidos seguindo delineamento inteiramente casualizado (DIC) dispostos em um arranjo fatorial 2x2x5, sendo duas condições de luminosidade: luz (luz/12h e escuro/12h) e escuro constante; dois níveis de nitrato de potássio (0%; 0,2%); e cinco temperaturas: 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 20-35°C.

Os dados foram submetidos à análise de variância, verificando-se a significância dos fatores e suas interações, e as comparações das médias foram feitas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

2.4 Morfologia da germinação e plântula

Ao mesmo tempo em que se desenvolvia o teste de germinação, outro experimento foi instalado para o estudo dos aspectos morfológicos da germinação e do crescimento da plântula. Foram utilizadas quatro subamostras de 25 sementes selecionadas ao acaso de um mesmo lote e semeadas em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido com água destilada; em seguida foram colocadas em câmara de germinação (BOD), à temperatura de 30°C, avaliando-se a cada 24h, durante 28 dias. O substrato foi umedecido com água destilada, quando necessário utilizando-se uma pisseta.

Os aspectos analisados foram a protrusão da radícula, raiz primária, hipocótilo, epicótilo e plúmula.

Para acompanhar o desenvolvimento da plântula, foram retiradas de cada lote 200 sementes distribuídas em 4 repetições de 50, colocadas em bandejas entre substrato areia, sendo o crescimento das plântulas ocorrendo em casa de vegetação com irrigação intermitente.

A análise descritiva foi realizada a partir de plântulas que se apresentaram mais vigorosas e destas, apenas uma foi utilizada para ilustração. Os elementos vegetativos observados e descritos foram raiz (eixo principal e ramificações laterais), colo, hipocótilo, cotilédones, epicótilo, caule jovem, protófilos, gema apical, utilizando-se para a descrição literatura que verse sobre morfologia e desenvolvimento de plântulas (AMORIM et al., 2006; BARROSO et al., 1999; BELTRATI, 1995; COSMO et al., 2009; COSTA et al., 2006; FERRI et al 1981; LEONHARDT et al., 2008; SOUZA, 2009; VIDAL; VIDAL, 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a alfavaca-cravo o grau de umidade do lote utilizado para a realização dos trabalhos foi de 10,9% e o peso de mil sementes, 0,58g. Por sua vez, as sementes de alfavaca-roxa apresentaram grau de umidade de 13,6% e peso de mil sementes 0,26g (Tabela 1). Constatou-se que o peso de mil sementes de alfavaca-cravo superou em 2,2 vezes o calculado para a alfavaca-roxa.

Tabela 1. Grau de umidade e peso de mil sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa

Espécimes	Umidade (%)	Peso de mil sementes (g)
Alfavaca-cravo	10,9	0,58
Alfavaca-roxa	13,6	0,26

Martins (2006) obteve para *O. gratissimum* 8,28% de umidade e um valor médio de 0,51g para o peso de mil sementes, valores semelhantes aos encontrados nesse estudo para a espécie. Lima, Athanázio e Bellettini (2006) estudando germinação e vigor de alfavaca-cravo, trabalharam com lotes de sementes da espécie que apresentaram grau de umidade inicial variando de 7,0 a 8,4% enquanto Costa et al. (2010) obtiveram para *O. selloi*, peso de mil sementes de 1,34 com 7,3% de umidade.

Amaro et al. (2012) obtiveram 9,3% de umidade para sementes de *O. basilicum*, valor este dentro do padrão considerado ideal para a colheita e armazenamento de sementes de espécies consideradas ortodoxas, como é o caso da espécie estudada pelos autores.

3.1 Influência da temperatura, luz e do KNO₃

Os resultados do efeito da temperatura, luz e do nitrato de potássio (KNO₃) na germinação das sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Médias de porcentagem de germinação de sementes de alfavaca-cravo na interação entre luz alternada e escuro constante, KNO₃ e temperatura.

Temperatura	Luz (12h/12h)		Escuro	
	KNO ₃	(%)	KNO ₃	(%)
	(0,2)	(0)	(0,2)	(0)
20°C	0 cA	0 cA	0 aA	0 aA
25°C	20 aA	18,5 abA	0 a B	0 a B
30°C	23 aA	23 aA	0 aB	0 aB
35°C	12,5 bA	5,5 cB	0 aB	0 aB
20- 35°C	10 bA	13 bA	0 aB	0 aB

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Médias de porcentagem de germinação de sementes de alfavaca-roxa na interação entre luz alternada e escuro constante, KNO₃ e temperatura.

Temperatura	Luz (12h/12h)		Escuro	
	KNO ₃	(%)	KNO ₃	(%)
	(0,2)	(0)	(0,2)	(0)
20°C	7bB	22,5aA	0bC	5,5abC
25°C	20aA	9bB	0bC	0bC
30°C	11,5abA	9,5bA	0bB	9abA
35°C	13abA	11bA	0bB	0bB
20- 35°C	16,5abA	17,5abA	24aA	12,5aB

Médias seguidas por mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve baixa porcentagem de germinação das sementes em todos os tratamentos, não excedendo 24%.

Em condições de luminosidade, a temperatura de 30°C promoveu porcentagens de germinação das sementes de alfavaca-cravo superiores aos tratamentos com 20°C, 35°C, 20-35°C, com ou sem KNO₃; não diferiu, entretanto, dos resultados obtidos no tratamento térmico de 25°C (Tabela 2).

Sousa (2002), em estudos com alfavaca-cravo, observou que temperaturas de 25 e 30°C mostraram-se favoráveis à germinação da espécie, com porcentagens acima de 40%.

Lima et al. (2011) constataram que o teste de germinação conduzido a 30°C apresentou as maiores médias, a maior alcançando 67% de sementes germinadas, comprovando que as sementes da alfavaca-cravo são estimuladas a germinar sob temperaturas elevadas.

Factor et al. (2008), verificaram que as maiores reduções de germinabilidade de alfavaca-cravo estão associadas às condições de 20°C e 20-25°C. Sob condições de luz, os melhores valores de germinabilidade foram em 30°C e 20-30°C. A germinabilidade não excedeu 55%. Na ausência de luz as sementes não germinaram sob temperaturas constantes, entretanto sob temperaturas alternadas houve germinação, apesar de reduzida quando comparada com a das sementes submetidas à luz; e em temperaturas alternadas a germinação foi de aproximadamente 10%.

O fato de a espécie apresentar germinabilidade maior sob temperaturas elevadas está de acordo com as condições climáticas predominantes nas regiões geográficas de onde *O. gratissimum* é originária (MARTINS et al., 2008). Os autores também constataram que sob condições de luminosidade, a temperatura de 30°C promoveu altas taxas de germinação, entretanto, diferentemente do presente trabalho, aumento da germinabilidade também foi conseguido com temperatura alternada.

Lima et al. (2007) trabalhando com outra espécie do gênero *Ocimum* (*O. basilicum*), verificaram que a temperatura de 30°C é a mais indicada para a germinação das sementes dessa espécie.

Temperaturas altas, tais como 35°C, geralmente restringem a germinação, provavelmente por provocar alterações enzimáticas, ou pela insolubilidade do oxigênio a essa temperatura, o que acelera o processo respiratório das sementes (MARCOS FILHO, 1996). Não só temperaturas altas podem reduzir a germinação; nesse estudo, as sementes de alfavaca-cravo, quando submetidas ao tratamento de 20°C independente da pré-umbebição em KNO₃ (0% e 0,2%), não germinaram; bem como não houve germinação no escuro, independente das temperaturas utilizadas, o que as classifica como fotoblásticas positivas, o que está de acordo com o trabalho de Sousa (2002), que também classifica a espécie como fotoblástica positiva.

Já, em estudos de Martins et al. (2008), os autores verificaram que as sementes de alfavaca-cravo são fotoblásticas positivas preferenciais, não germinando sob escuro contínuo em temperaturas constantes. Segundo os autores, em temperaturas alternadas a germinação de sementes de alfavaca-cravo ficou em torno de 10%, e baixas taxas de germinação ocorreram a 20°C e 15-25°C.

Costa et al (2010) verificaram para sementes de *O. selloi* porcentagem de germinação superior a 90% em ampla faixa de temperatura (20 a 30°C), indiferente à presença de luz, classificando assim a espécie como fotoblástica neutra. Porém, a 35°C a germinação ficou em 38% na presença de luz e nula na ausência de luz.

Lima et al. (2007) afirmam que as sementes de *O. basilicum* dependem da luz para germinar, sendo, portanto fotoblásticas positivas.

Para a alfavaca-cravo, a interação entre a luz e o nitrato de potássio foi significativa apenas na temperatura de 35°C, onde a germinabilidade foi mais baixa ainda na ausência de KNO₃ (Tabela 2). Já no ensaio com a alfava-roxa em temperatura alternada de 20-35°C, a aplicação do nitrato aumentou a porcentagem de germinação no escuro, inclusive, alcançando a maior porcentagem de germinação entre todos os tratamentos. Na luz, a 25°C, o nitrato aumentou a germinação das sementes enquanto agiu como inibitório a 20°C (Tabela 3).

Alfavaca-roxa pode ser classificada como fotoblástica positiva preferencial. Quanto ao efeito da interação de luz e nitrato de potássio na germinação de sementes, Ikeda et al. (2004) trabalhando com o mentrasto (*Ageratum conizoides* L) verificaram que a interação entre nitrato de potássio (KNO₃ 0,2%) e a luz nas temperaturas constante e alternada foi significativa para a germinação da espécie. Na temperatura constante de 25°C verificou-se que o nitrato inibiu a germinação na condição de escuro enquanto no ensaio com temperatura alternada, na presença da luz, a aplicação de KNO₃ aumentou a porcentagem de germinação.

Apesar de KNO₃, em alguns casos, substituir a luz em espécies fotoblásticas positivas (FARON et al., 2004; SILVA, GUIMARÃES, YAMASHITA, 2009), não estimulou a germinação de sementes de mentrasto, resultado semelhante ao relatado nesse estudo para alfavaca-cravo.

3.2 Morfologia da germinação e plântula

A Figura 5 apresenta o desenvolvimento pós-seminal de alfavaca-cravo e a Figura 7, o desenvolvimento de alfavaca-roxa. A germinação das espécies é do tipo epígea fanerocotiledonar, com emergência inicial direta. O processo da germinação tem início com o surgimento da radícula cerca de 4 dias após a semeadura (Figura 5a, 7a). A raiz primária possui coloração esbranquiçada, é curta, curva e tem o ápice pontiagudo; posteriormente alonga-se e adquire a coloração amarronzada.

Os cotilédones são epígeos, foliáceos, verdes, pedicelados, limbo basicamente inteiro. As sementes recém-germinadas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa são bastante semelhantes, porém as folhas cotiledonares da alfavaca-cravo são mais arredondados enquanto os da alfavaca-roxa são ligeiramente alongados (Figura 6). O hipocótilo das plântulas, de início é robusto e depois se alonga mantendo a coloração branca, sendo longos em relação ao epicótilo (Figura 5b, 7b).

O primeiro par de protófilos surge em torno de 20 dias após a semeadura, apresentando-se opostos e simples (Figura 5f, Figura 7e). O surgimento do primeiro par de protófilos de alfavaca-roxa é ligeiramente mais demorado. As margens do protófilo são levemente serreadas e a nervação é pinada, camptódroma nas plântulas dos dois espécimes.

A plântula apresenta sistema radicular axial ou pivotante; as raízes secundárias são delgadas, distribuídas irregularmente e menores que a raiz primária.

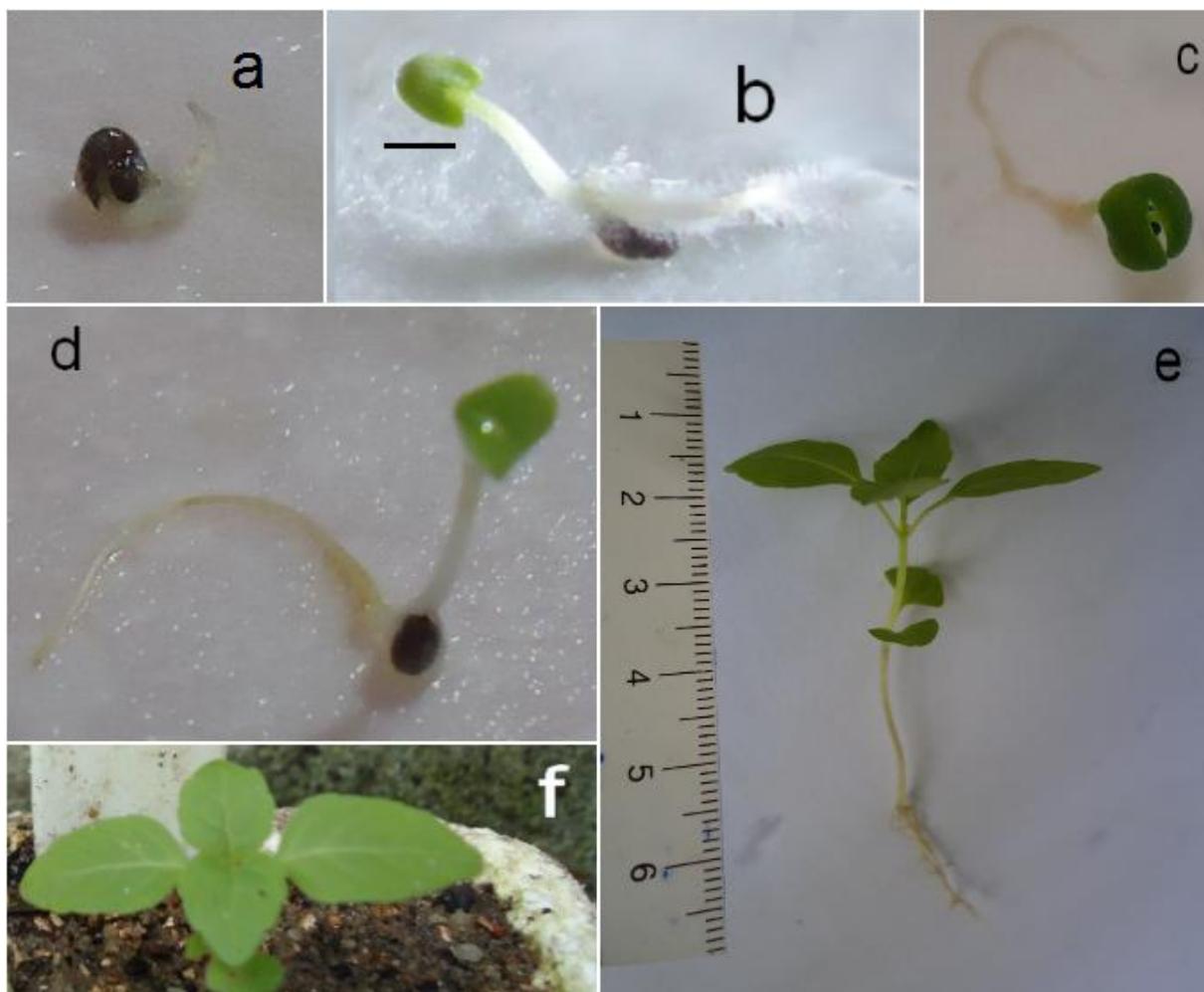


Figura 5. Estágios de germinação e desenvolvimento da plântula de Alfavaca-cravo. Legenda: (a) protrusão da radícula. 5 DAS (b, c, d) cotilédones livres (e, f) plântula apresentando primeiro e segundo par de protófilos; 28 DAS. DAS: dias após a semeadura. Barra 4mm. Fortaleza, CE, 2012.



Figura 6. Semente e plântula. Legenda: (a) Alfavaca-cravo; (b) Alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012.

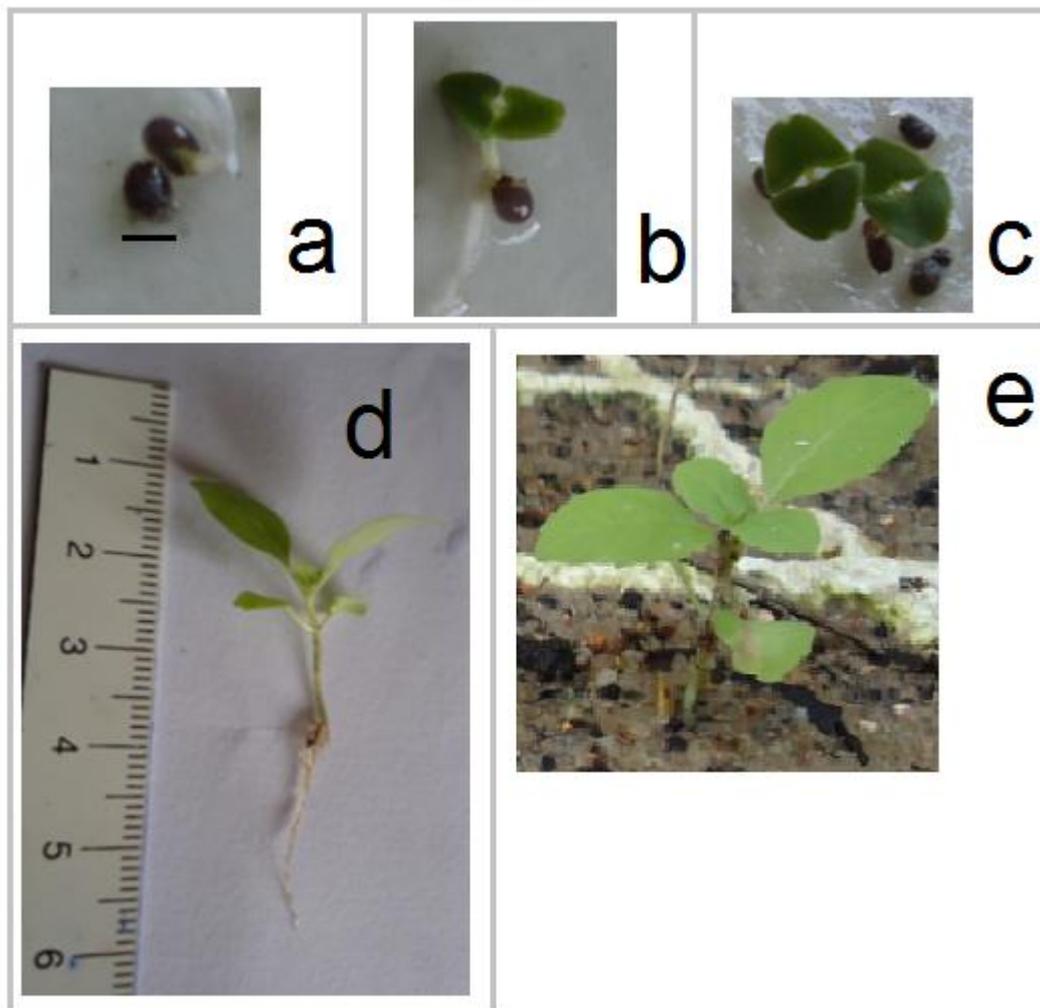


Figura 7. Estágios de germinação e desenvolvimento da plântula de *Ocimum* sp. Legenda: (a) protrusão da radícula, 4 DAS (b, c) cotilédones livres; (d) plântula com primeiro par de protófilos (28 DAS) (e) plântula apresentando primeiro e segundo par de protófilos. DAS: dias após a sementeira. Barra: 1mm. Fortaleza, CE, 2012.

4. CONCLUSÕES

- Houve diferenças entre as respostas à luz, temperatura e KNO_3 para as duas espécies, sendo alfavaca-cravo fotoblástica positiva e a alfavaca-roxa positiva preferencial;
- Constatou-se baixa porcentagem de germinação das sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa em todos os tratamentos, não excedendo 24%;
- A germinação de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa é do tipo epígea fanerocotiledonar, com emergência inicial direta.

REFERÊNCIAS

- AMARO, H. T. R.; ASSIS, M. O.; DAVID, A. M. S. S.; SILVEIRA, J. R.; SILVA NETA, I. C.; MOTA, W. F. Superação de dormência em sementes de manjeriçao (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14 n.spe, p. 218- 223, 2012.
- AMORIM, I. L.; FERREIRA, R. A.; DADIVE, A. C.; CHAVES, M. M. F. Aspectos morfológicos do desenvolvimento de plântulas e mudas de trema (*Trema micrantha* (L.) Blum.) - Ulmaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 86-91, 2006.
- BARROSO, G. M. et al., **Frutos e sementes**: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa, UFV, 1999, 443 p.
- BELTRATI, C. M. **Morfologia e anatomia de sementes**. In: Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal. Apostila. Rio Claro: Departamento de Botânica / Instituto de Biociências /UNESP, 1995. 98p.
- BEZERRA , A. M. E.; MEDEIROS FILHO, S.; BRUNO, R. L. A.; MOMENTÉ, V. G. Efeito da pré-embebição e aplicação de ácido giberélico na germinação de sementes de macela. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n.3, 2006.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2 ed. Plenum Press, New York. 1994. 445p.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília, DF: ABRATES, 1993. p.83-135.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BRITO, A. C.; PEREIRA, D. A.; AMARAL, C. L. F. Influência da temperatura na germinação de *Ocimum canum* Sims. **Caatinga**, Mossoró, v.19, n.4, p.397-401, 2006.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Germinação de sementes. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (Ed.) **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p.128-166.
- COSMO, N. L.; GOGOSZ, A. M.; NOGUEIRA, A. C.; BONA, C.; KUNIYOSHI, Y. S. Morfologia do fruto, da semente e morfo-anatomia da plântula de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.23 n.2, p. 389- 397, 2009.

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; GUIMARÃES, R. M. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocimum selloi* Benth. sob condições de luz, temperatura e tempo de armazenamento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 675- 680, 2010.

COSTA, R. S.; OLIVEIRA, I. V. M.; MÔRO, F. V.; MARTINS, A. B. G. Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação do jambo vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, São Paulo. v. 28, n. 1, p. 117- 120, 2006.

EFFRAIM, K. D.; JACKS, T. W.; SODIPO, O. A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. **African Journal Biomedical Research**. Borno State, Nigéria.v.6, p. 21-25, 2001.

FACTOR, T. L.; PURQUERIO, L. F. V.; LIMA JÚNIOR, S.; ARAUJO, J. A. C.; CURI, E. L.; TIVELLI, S. W. Efeito da temperatura, da luz e do ácido giberélico na germinação em sementes de *Ocimum gratissimum* L. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, (Suplemento) p. 5314- 5318, 2008.

FARON, M. L. B; PERECINI, M. B.; LAGO, A. A; BOVI, O. A; MAIA, N. B. Temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e *H. brasiliense* Choisy. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n.2, p.193-199, 2004.

FERREIRA, D. F. **SISVAR- Sistema de análise de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.1. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, R. A.; BOTELHO, S. A.; DAVIDE, C.A.; MALAVASI, M. M. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 303-309, 2001.

FERRI, M. G. et al., **Glossário ilustrado de Botânica**. São Paulo: Nobel, 1981, 197 p.

GMACH, J. R. **Métodos para a superação da dormência de sementes de tabaco**. 2008, 69f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de sementes), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, RS, 2008.

GUPTA, S. C. Seed dormancy studies in some *Ocimum* species and its control through chemical treatment. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, Lucknow, v.24, n.4, p. 957-960, 2002.

IKEDA, F. S.; CARMONA, R.; MITJA, D.; GUIMARÃES, R. M. Luz e KNO₃ na germinação de sementes de *Ageratum conyzoides* L. sob temperaturas constantes e alternadas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 193-199, 2008.

LEONHARDT, C.; BUENO, O. L.; CALET, A. C.; BUSNELLO, A.; ROSA, R. Morfologia e desenvolvimento de plântulas de 29 espécies arbóreas nativas da área da Bacia Hidrográfica do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v.63, n.1, p.5-14, 2008.

LIMA, C. B.; ATHANÁZIO, J. C.; BELLETTINI, N. M. T. Germinação e vigor de sementes de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) submetidas ao envelhecimento acelerado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 159-170, 2006.

LIMA, C. B.; COSSA, C. A.; NEGRELLE, R. R. B.; BUENO, J. T.; LOURENÇO, C. C.; BATISTA, N. A.; JANANI, J. K. Germinação e envelhecimento acelerado na análise da qualidade fisiológica de sementes de alfavaca-cravo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 865-874, jul/set. 2011.

LIMA, C. M. R.; BORGHETTI, F.; SOUSA, M. V. Temperature and germination of the Leguminosae *Enterolobium contortisiliquum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Brasília, v. 9, n. 2, p. 97- 102, 1997.

LIMA, M. L. S.; SOUZA, B. S.; OLIVEIRA, A. M.; TORRES, S. B. Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de alfavaca-cravo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 4, p. 31-33, 2007.

LOPES, J. C.; CORRÊA, N. B.; DIAS, M. A. Efeito de pré-tratamentos com água e nitrato de potássio na germinação e vigor de sementes de salsa lisa. In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2006, Goiânia. **Horticultura Brasileira**, 2006. p. 2952-2955.

LOPES, J. C.; PEREIRA, M. D.; MARTINS FILHO, S. Germinação de sementes de calabura (*Muntingia calabura* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.24, n.1, p.59-66, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008, 544 p.

MARCOS FILHO, J. Germinação de sementes. In: **FUNDAÇÃO CARGILL**. Atualização em produção de sementes. Campinas, 1986. 223 p.

MARTINS, J. R. **Aspectos da germinação de sementes e influência da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.** 2006. 176 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras- UFLA. Lavras, MG, 2006.

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; BATISTA, L. A.; SILVA, A. P. O. Influência da luz, temperatura e ácido giberélico na germinação de sementes de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) e avaliação da qualidade fisiológica pelo teste de raios- x. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 10, n. 2, p. 44-49, 2008.

OLIVEIRA, M. I.; CASTRO, E. M.; COSTA, L. C. B.; OLIVEIRA, C. Características biométricas, anatômicas e fisiológicas de *Artemisia vulgaris* cultivadas sob telas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 11, n. 1, p. 56-62, 2009.

PEREIRA, T. S. Bromelioideae (Bromeliaceae): morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. **Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 29, p.115-154, 1988.

SANTIAGO, E. F.; PAOLI, A. A. S. Morfologia do fruto e da semente de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert (Leg-Caesalpinoideae). **Naturalia**, Rio Claro, São Paulo, v.24, p. 139-152. 1999.

SILVA, J. L.; GUIMARÃES, S. C.; YAMASHITA, O. M. Germinação de sementes de *Chloris barbata* (L.) Sw. em função da luz. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.7, n.1, p.23- 34, 2009.

SOUSA, P. B. L. **Propagação e análise de crescimento de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) sob condições de campo e ambiente controlado**. 2002. 60f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS. Feira de Santana, BA, 2002.

SOUZA, L. A. **Sementes e plântulas**: germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2009. 279 p.

SOUZA, R. P.; PEREIRA, M. F. D. A. Interação de luz, GA₃ e estratificação na germinação de sementes de *Impatiens wallerana*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 4, n. 1, p. 21-25, 1992.

SOUZA, M. F.; SILVA, A. B.; SILVA, A. H. B.; SILVA, A. B.; AMARAL, C. L. F. Morfologia e biologia floral da alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.). **Horticultura Brasileira**, Goiânia, v. 24, n. 1, p. 243-243, 2006.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica**: organografia. 3 ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995. 114 p.

CAPÍTULO 2- CRESCIMENTO DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA CULTIVADAS EM PLENO SOL E AMBIENTE PROTEGIDO

RESUMO

O crescimento das plantas pode ser acompanhado ao longo do tempo, através da determinação de variáveis como matéria seca e área foliar, visto que esse crescimento deve-se ao aumento da matéria seca a partir da conversão de substâncias inorgânicas simples em substâncias orgânicas, pelo processo da fotossíntese. A partir dos dados de crescimento podem ser desenvolvidas técnicas de manejo das espécies, ou pode-se estimar as causas da variação do crescimento entre plantas que crescem em diferentes ambientes. Para avaliar as características de crescimento das plantas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa em diferentes ambientes de cultivo: pleno sol (0% sombra) e ambiente protegido (50% de sombra), foi realizado um experimento com duração de 90 dias, utilizando delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e duas plantas por repetição. As variáveis analisadas foram: diâmetro do caule, altura, nº de folhas, área foliar, comprimento da raiz e massa da matéria seca. As plantas das duas espécies apresentaram maior produção de biomassa em condição de pleno sol.

Palavras-chave: Planta Medicinal. Matéria Seca. Sombreamento.

ABSTRACT

Plant growth can be monitored over time determined by variables such as dry matter and leaf area, since this growth is due increased dry matter from inorganic substances which are converted into organic substances by the photosynthesis. Growth data can be used to develop techniques for management of the species or estimated causes the variation in the different environments. To evaluate the growth characteristics of medicinal plants *O. gratissimum* L. and *Ocimum* sp in different environmental conditions (0% shade, 50% shade), an experiment was performed with duration of 90 days, using a randomized design with four replications and two plants per replicate. In this experiment were analyzed: stem diameter, height, number of leaves, leaf area, root length, dry weight. *Ocimum gratissimum* and *Ocimum* sp had higher biomass production in the external environment (0% shade).

Keywords: Medicinal Plant. Dry Matter. Shade.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Ocimum* pertence à família Lamiaceae, cujos membros são principalmente herbáceas e arbustos, possuindo caules tetragonais, folhas simples, opostas e cruzadas. O cálice é fusionado em forma de sino ou cone, algumas vezes bilabiadas, enquanto as pétalas pentâmeras são fusionadas. O fruto é do tipo aquênio com uma semente (BRITO, 2009).

Ocimum gratissimum, ou alfavaca-cravo, é comumente empregada como anestésico, no tratamento de gripes, tosses, irritações da garganta, podendo ser usada também como inseticida (OGENDO et al., 2008), nematocida e antimicrobiano (EFFRAIM; JACKS; SODIPO, 2001).

Observa-se que algumas variedades de alfavaca apresentam variação de cor. No caso da alfavaca-roxa (*Ocimum* sp), essa coloração sofre variações, dependendo de onde a espécie esteja sendo cultivada.

Estudos demonstram que os fatores ambientais podem influenciar a produção de compostos pelas plantas (BRANT et al., 2009; COSTA et al., 2010; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; LIMA et al., 2011). Sales et al. (2009) constataram que o ambiente sombreado proporcionou menor acúmulo de fitomassa seca de folhas e ramos de hortelã-do-campo (*Hyptis marrubioides*). Da mesma forma, para a espécie medicinal *Achillea millefolium* L. o sombreamento reduziu o acúmulo de massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores da espécie (LIMA et al., 2011).

Por outro lado, Brant et al (2009), observaram alta produção de biomassa seca de folhas de erva- cidreira (*Melissa officinalis*) cultivadas na sombra, mostrando que o sombreamento foi benéfico em relação às plantas cultivadas a pleno sol.

A partir dos dados de crescimento podem ser desenvolvidas técnicas de manejo das espécies, ou pode-se estimar, de forma precisa, as causas da variação do crescimento entre plantas geneticamente diversas ou que crescem em diferentes ambientes (PERINI et al., 2011).

Lima et al. (2011) afirmam que a análise de crescimento ainda é o meio mais simples e preciso para o estudo de variação entre plantas. Dessa forma, é importante considerar os fatores ambientais no cultivo de plantas visando obter informações sobre as condições que favoreçam uma maior produtividade e qualidade do produto.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito da luminosidade (pleno sol e 50% sombra) na biomassa de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa cultivadas em dois ambientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico e descrição do local do experimento

As sementes utilizadas neste estudo foram coletadas durante os meses de janeiro e fevereiro de 2011, de exemplares de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa cultivadas na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana (NEPAU), localizado no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE.

O clima da região, segundo a classificação de Köppen enquadra-se no tipo tropical Aw, com chuvas de verão e outono, caracterizado por um período quente durante o ano inteiro com precipitações médias anuais irregulares. As temperaturas mais elevadas são apresentadas nos meses de novembro e dezembro, enquanto a mais baixa ocorre normalmente no início da estação seca, geralmente em julho. As chuvas ocorrem no período de janeiro a junho, podendo prolongar-se até agosto, com máximas em março e abril (QUEIROZ, 2003).

As inflorescências foram colhidas manualmente, com auxílio de uma tesoura de poda e posteriormente levadas ao Laboratório de Análise de Sementes da UFC. As inflorescências foram colocadas para secar em estufa elétrica a 35°C até peso constante, por um período de 7 dias, e desmanchadas manualmente. Após o beneficiamento, as sementes foram acondicionadas em recipientes plásticos e mantidas sob refrigeração (6-10°C) até a realização dos experimentos.

As condições climáticas do local foram monitoradas ao longo da condução do experimento, sendo os dados meteorológicos obtidos junto à Estação Meteorológica da Fundação Cearense de Meteorologia (FUNCEME), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, localizada na latitude 3° 44' S e na longitude 38° 33' W, na altitude de 19,5m. Durante o período de experimento, a temperatura máxima alcançou 30,3°C, a média, 26,7°C e a mínima, 22,7°C. A umidade relativa do ar teve máxima de 95%, média, 80,3% e a mínima, 62,1%.

2.2 Produção das mudas

As mudas foram produzidas em casa de vegetação do Laboratório de Análise de Sementes, no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza-CE. A semeadura em bandejas plásticas foi feita no dia 18 de março de 2011, semeando-se a lanço 2g de sementes de cada espécime. O substrato foi regado com solução de nitrato de potássio (KNO_3) em uma concentração de 0,2% com o objetivo de acelerar a germinação.

2.3 Transplântio

Após 20 dias de semeadura (7/4/2011), quando as plântulas apresentavam duas folhas definitivas, foi realizado o transplântio para bandejas de isopor com 72 células com volume de 30 cm^3 por célula, sendo submetidas a duas irrigações diárias. As mudas apresentaram excelente sobrevivência, não havendo perdas por morte dos indivíduos.

Ao apresentarem 4 a 6 folhas, no dia 25 de abril de 2011, as mudas foram transplantadas para o local definitivo, recipientes plásticos de 12 litros e se desenvolveram em dois ambientes de cultivo: em casa de vegetação (com telado de 50% de sombreamento) e ambiente externo (0% de sombreamento). O substrato era composto por areia, vermiculita, solo e húmus de minhoca na proporção 1:1:1:1, cuja análise físico-química encontra-se apresentada abaixo.

Tabela 4. Características físico-químicas do substrato utilizado no experimento. UFC/ Fortaleza, CE, 2012.

Determinações											
pH	P	K	Na	Ca	Mg	H+Al	Al	C	N	MO	V
H ₂ O	-----g kg ⁻¹ -----										(%)
7,8	4,10	0,32	0,06	2,02	0,24	0,00	0,00	20,46	1,93	35,27	100

Análise realizada no Departamento de Ciências do Solo. UFC, Fortaleza, CE, 2011

As plantas foram irrigadas duas vezes ao dia, não sendo necessário utilizar adubação adicional, nem produtos para controle de pragas e doenças.

2.3.1 Teste de irradiância

Foi realizada a medição da radiação solar ao longo do período diurno, no interior da casa de vegetação e no ambiente externo a ela. A intensidade luminosa (em *lux*) nas quatro repetições de cada tratamento foram medidas a cada hora das 6 horas às 18 horas através de luxímetro digital marca Icel, modelo LD-510. Os dados registrados em *lux* foram transformados em radiação fotossinteticamente ativa (RFA), obtida em $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por meio do fator de conversão 0,018 (Figura 8).

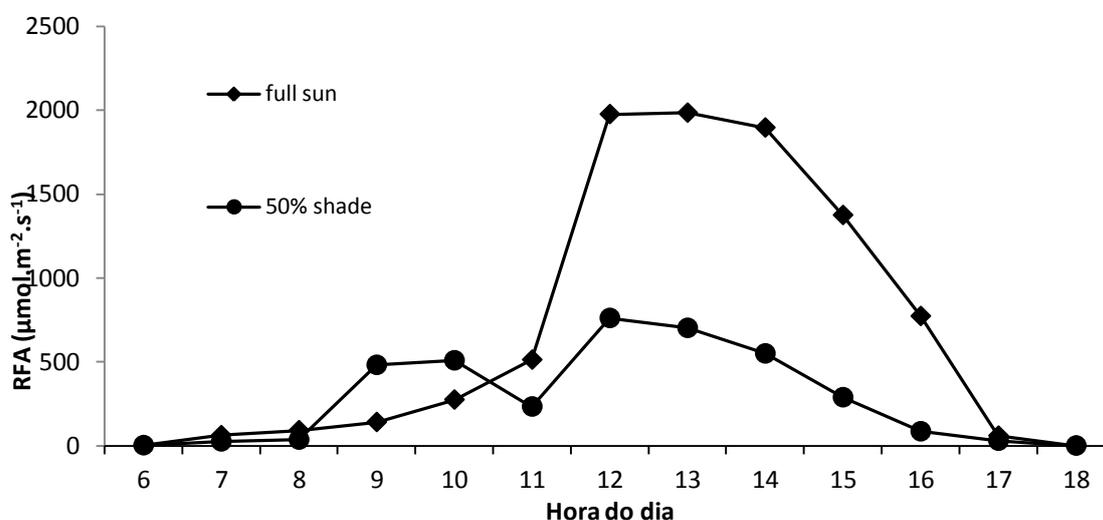


Figura 8. Comportamento diário da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) nos dois tratamentos estudados, na área do experimento. Pleno Sol (-♦-); 50% sombra (-●-).

2.3.2 Determinações efetuadas durante o período do experimento

O experimento teve duração de 90 dias, com a primeira coleta de material vegetal no dia do transplante para os vasos de 12 L, procedendo-se nova coleta a cada 15 dias, totalizando 7 coletas (D₀ 25/04/11; D₁₅ 09/05/11; D₃₀ 23/05/11; D₄₅ 06/06/11; D₆₀ 20/06/11; D₇₅ 04/07/11; D₉₀ 18/07/11).

As plantas foram colhidas pela manhã, sempre no mesmo horário, onde foram feitas as medições e observações. Para a obtenção da matéria seca, as plantas foram separadas em folhas (folhas e inflorescências, na ocasião da floração), caule e raízes e a secagem foi realizada em estufa, a uma temperatura de 80°C, até peso constante.

Foram avaliadas as seguintes variáveis:

- a) Diâmetro do caule: utilizando-se paquímetro tomando-se a medida da base do caule das plantas amostradas, em milímetros;
- b) Altura da planta: foram medidas as alturas, em centímetros, através de fita métrica, tomando-se a distância entre o colo da planta e a folha mais alta;
- c) Número de folhas por planta: fazendo-se a contagem do número de folhas das plantas amostradas;
- d) Área foliar: obtida através de integrador de área foliar modelo LI- 3100, marca Li-Cor; folhas completamente expandidas foram coletadas e levadas ao laboratório e tiveram as imagens digitalizadas e as áreas calculadas em cm^2 ;
- e) Comprimento da raiz, em centímetros, através de fita métrica;
- f) Peso da matéria seca: as folhas (folhas e inflorescências, por ocasião da floração), caules, raízes foram cortados e levados ao laboratório onde o material foi submetido à secagem em estufa a 80°C até peso constante e posterior pesagem em balança analítica de precisão (0,001g).

2.3.3 Análise Estatística

O experimento foi instalado em esquema de parcela subdividida no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, duas plantas por repetição. As parcelas foram constituídas pelos níveis de sombreamento (0 e 50%) e as subparcelas foram formadas por avaliações aos: 0; 15; 30; 45; 60; 75 e 90 dias após o transplântio (DAT).

Os dados foram submetidos à análise de regressão ajustados em equações quadráticas. Para os testes estatísticos foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância dos efeitos da luminosidade (pleno sol; 50% sombra) e idade da planta (0; 15; 30; 45; 60; 75; 90) em alfavaca-cravo e alfavaca-roxa estão apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Quadrados médios das variáveis diâmetro do caule, altura, número de folhas, comprimento da raiz, área foliar, massa seca do caule, das folhas e da raiz de alfavaca-cravo, em função de luminosidade e idade. Fortaleza, Ceará, 2012.

Fonte de Variação	GL	QM							
		Diâmetro	Altura	Número de Folhas	Comp. Raiz	Área Foliar	Peso Caule	Peso Folhas	Peso Raiz
Luminosidade (L)	1	50,16*	52,07*	12183,50*	522,16*	3743080,07*	297,16*	168,01*	20,64*
Resíduo (a)	6	0,54	35,79	264,45	7,35	153923,94	2,97	2,25	0,22
Idade (I)	6	92,02*	9404,32*	22546,60*	658*	15997384,86*	295,82*	184,90*	26,66*
Interação LxI	6	4,41*	303,23*	1637,04*	56,41*	433097,07*	53,86*	22,72*	3,93*
Resíduo (B)	36	0,56	50,47	197,53	11,49	148529,84	4,17	1,89	0,44
CV 1 (%)		14,99	12,81	30,75	14,12	26,14	35,61	32,73	33,29
CV 2 (%)		15,37	15,21	26,57	17,66	25,67	42,84	29,99	46,87

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste F

Tabela 6. Quadrados médios das variáveis diâmetro do caule, altura, número de folhas, comprimento da raiz, área foliar, massa seca do caule, das folhas e da raiz de alfavaca-roxa, em função de luminosidade e idade. Fortaleza, Ceará, 2012.

Fonte de Variação	GL	QM							
		Diâmetro	Altura	Número de Folhas	Comp. Raiz	Área Foliar	Peso Caule	Peso Folhas	Peso Raiz
Luminosidade (L)	1	90,01*	445,78*	87295,01*	434,57*	23141571,44*	624,44*	208,28*	27,16*
Resíduo (a)	6	0,18	34,51	644,82	9,46	140161,30*	4,77	1,04	0,08
Idade (I)	6	91,51	11910,05	48341,98*	364,68*	11521567,95*	288,65*	77,57*	12,82*
Interação LxI	6	8,35	205,86	16105,05*	57,27*	3891467,07	155,15*	36,07*	5,16*
Resíduo (B)	36	0,15	53,51	534,50	4,78	108176,23	3,40	0,53	0,20
CV 1 (%)		8,21	11,27	32,28	21,06	29,59	44,52	33,32	28,36
CV 2 (%)		7,57	14,03	29,39	14,97	25,99	37,57	23,79	42,49

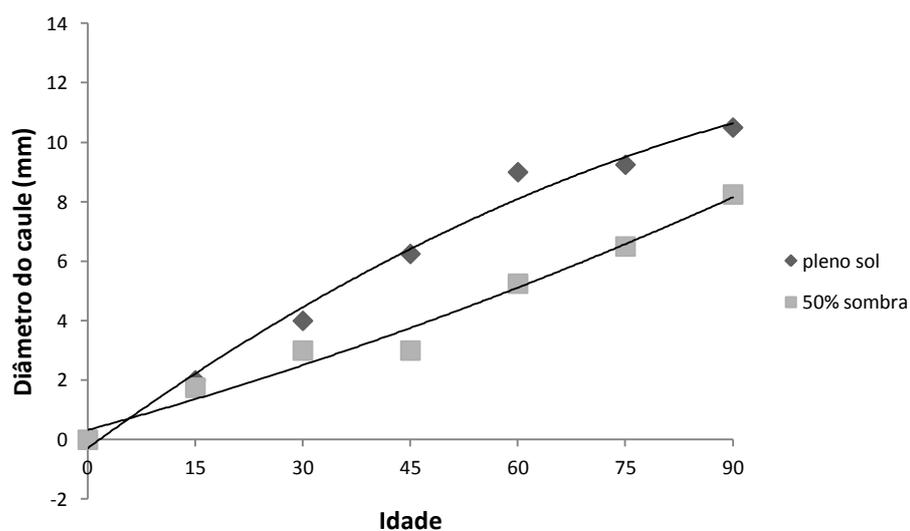
*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste F

Houve interação significativa para todas as variáveis analisadas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, podendo-se observar nas Figuras 9 a 16 que a regressão quadrática explicou o crescimento das plantas nos dois ambientes, evidenciando, de modo geral, melhor desempenho dos espécimes crescidos em pleno sol em comparação ao ambiente sombreado, no período avaliado.

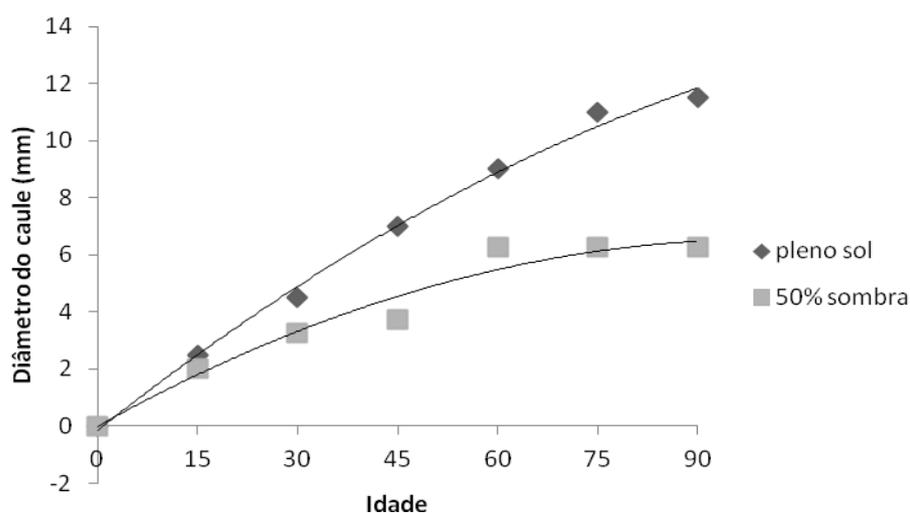
Quanto ao diâmetro do caule de alfavaca-cravo, os valores apresentam-se maiores quando as plantas cresceram em pleno sol em comparação ao ambiente sombreado, alcançando, aos 90 dias, valor médio de 10,7mm no desenvolvimento em pleno sol enquanto alcançou 8,26mm de diâmetro quando cultivada em ambiente protegido (Figura 9a). Da mesma forma, alfavaca-roxa apresentou valores médios do diâmetro do caule maiores na condição de sol, sendo que aos 90 dias atingiu a média de 11,5mm contra apenas 6,52mm em casa de vegetação (Figura 9b). As espécies cultivadas em casa de vegetação apresentavam morfologicamente caules finos, aparentando fragilidade, alguns, inclusive, tendo que ser apoiados por escoras.

Esses resultados estão de acordo com os estudos de Factor et al. (2008) que observaram que plantas de *O. gratissimum* cultivadas em pleno sol apresentaram maior diâmetro do colo que as plantas cultivadas em local sombreado (50% de sombra por malha preta), evidenciando que a redução da intensidade de luz, sem a alteração da qualidade espectral, proporciona plantas de caule mais fino em comparação às plantas desenvolvidas em sol pleno.

Da mesma forma, em estudos com hortelã-do-campo (*Hyptis marrubioides*), Sales et al. (2009) observaram que o diâmetro do caule das plantas foi menor no ambiente com baixa irradiação luminosa. O diâmetro pode ser um bom indicador da capacidade assimilatória líquida da planta (NAVES, 1993 citado por SALES et al., 2009).



(a)



(b)

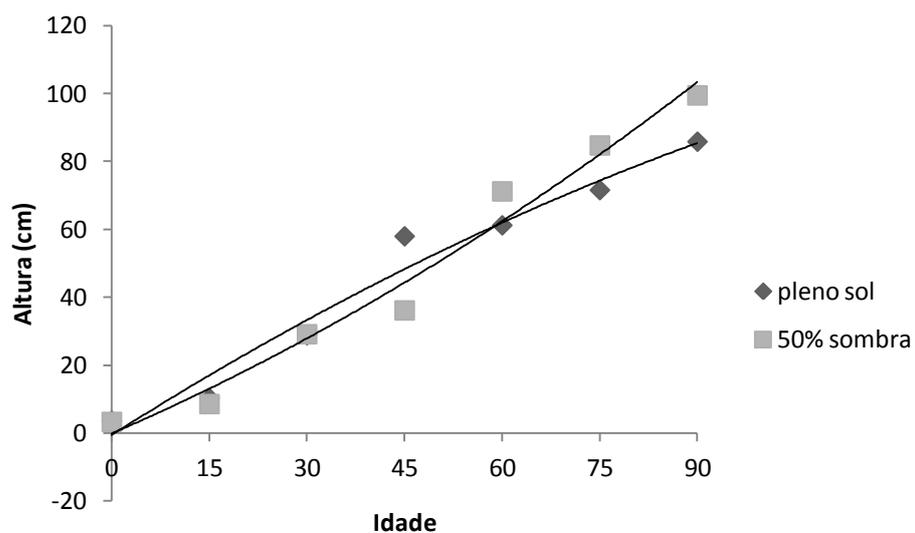
Figura 9. Diâmetro do caule de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

A variação da altura das plantas cultivadas em diferentes ambientes em função das idades pode ser observada na Figura 10. Em local sombreado, houve maior crescimento das plantas de alfavaca-cravo em altura a partir de 60 dias após o transplântio, atingindo aos 90 dias, 99,5cm contra 85,87cm das plantas cultivadas em pleno sol (Figura 10a). Já a alfavaca-roxa mostrou maiores médias da altura nas plantas cultivadas em pleno sol, atingindo 95,0cm, quando comparada com o tratamento 50% sombra, que foi de 91,75cm (Figura 10b).

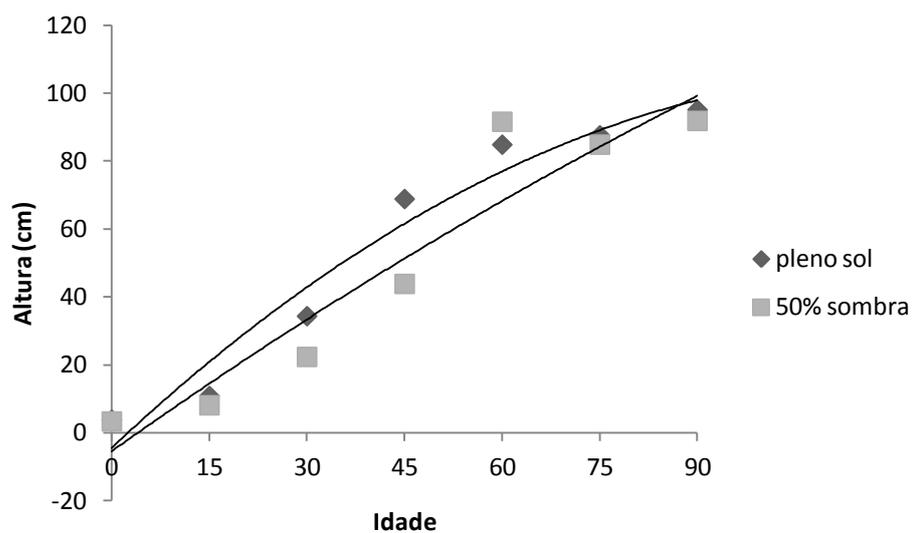
Conforme Carvalho et al. (2006), plantas que se desenvolvem em locais sombreados apresentam maior altura em relação às plantas que crescem em pleno sol, sendo esse estímulo do crescimento uma resposta rápida ao sombreamento. De acordo com Taiz e Zeiger (2004), o alongamento do caule seria uma resposta da planta para evitar a sombra, mediada pelo fitocromo. Observa-se que o comportamento de maior crescimento do caule da alfavaca-cravo em local sombreado, no presente trabalho, deu-se apenas a partir de 60 dias após o transplântio.

Fernandes (2012) observou que plantas de alfavaca-cravo ao serem cultivadas em ambiente sombreado apresentaram maior crescimento em altura do que as plantas em pleno sol, enquanto Lima et al. (2011), trabalhando com a planta medicinal *Achillea millefolium* L. mostraram que o crescimento da espécie foi maior sob luz plena, enquanto o sombreamento provocou uma menor produção da biomassa.

Sales et al. (2009) constataram que plantas de hortelã-do-campo (*Hyptis marrubioides*), quando cultivadas em pleno sol, apresentaram menor altura devido a um maior investimento fotossintético na produção de ramos. Por sua vez, Costa et al. (2010) em estudos com *Ocimum selloi*, obtiveram maior crescimento em altura em plantas que se desenvolveram em locais sombreados, enquanto o maior acúmulo de biomassa seca ocorreram na condição de pleno sol.



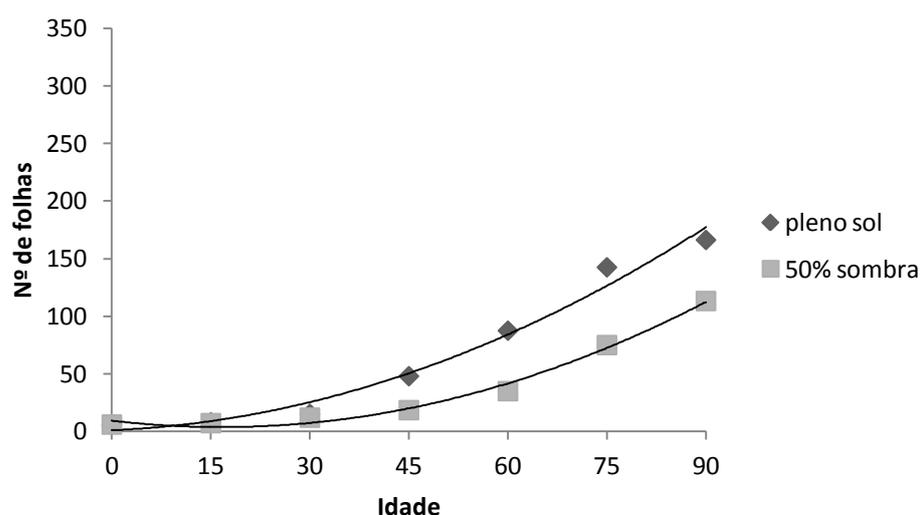
(a)



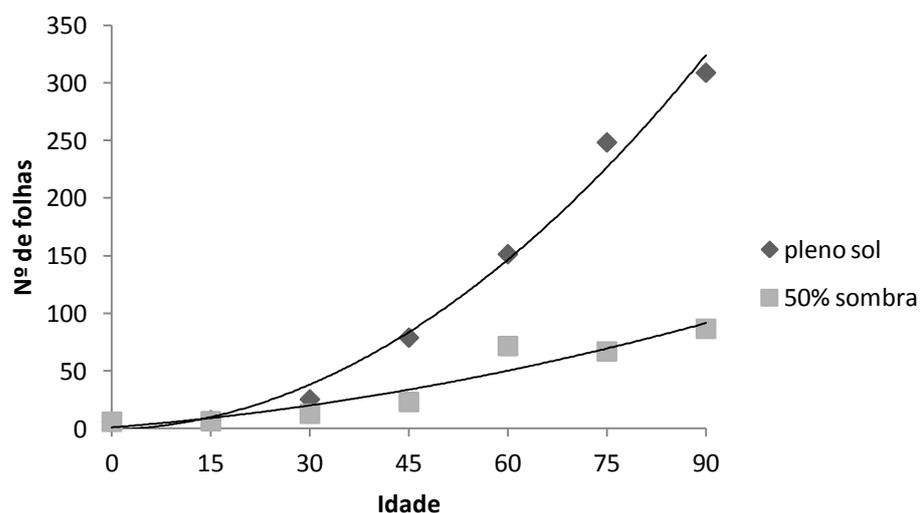
(b)

Figura 10. Altura de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

Em relação ao número de folhas, as plantas de alfavaca que apresentaram maior número, foram aquelas cultivadas em pleno sol. Pode-se observar que no tempo D_{90} , há uma média de 166,25 folhas e 113,25 folhas em plantas de alfavaca-cravo cultivadas em pleno sol e 50% sombra, respectivamente; para alfavaca-roxa, enquanto o número de folhas das plantas cultivadas em ambiente protegido foi de 86,75 folhas, alcançou valor de 309,0 folhas em ambiente em pleno sol, consistindo em um aumento de 3,5 vezes (Figura 11).



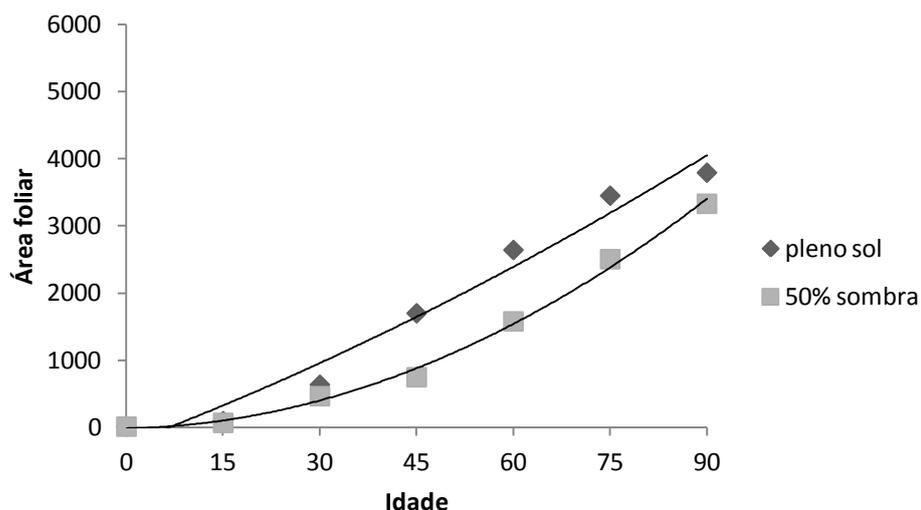
(a)



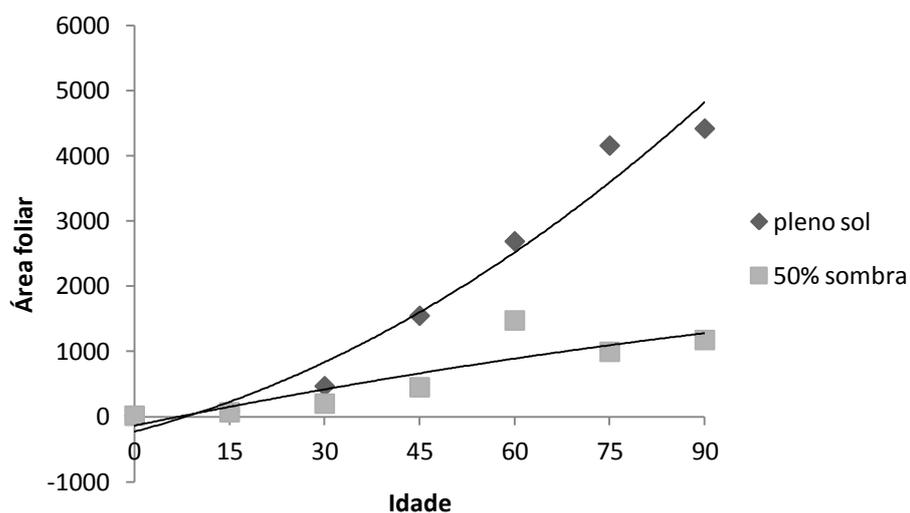
(b)

Figura 11. Nº de folhas de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

Quanto à área foliar, os maiores valores foram observados nas plantas cultivadas em pleno sol, sendo uma média de $3790,5\text{cm}^2$ para alfavaca-cravo e $4414,0\text{cm}^2$ para alfavaca-roxa, sendo que essa última apresentou os menores valores em casa de vegetação, sendo a média de $1172,75\text{cm}^2$ (Figura 12).



(a)

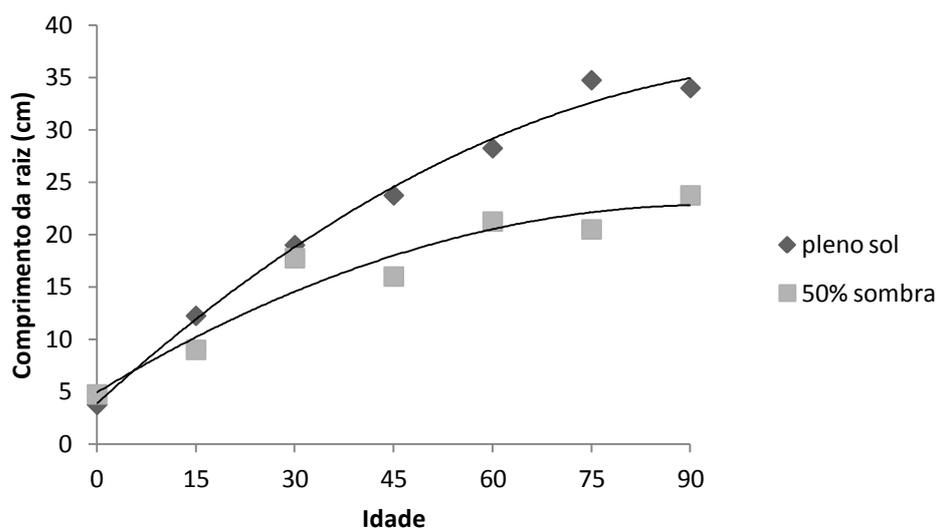


(b)

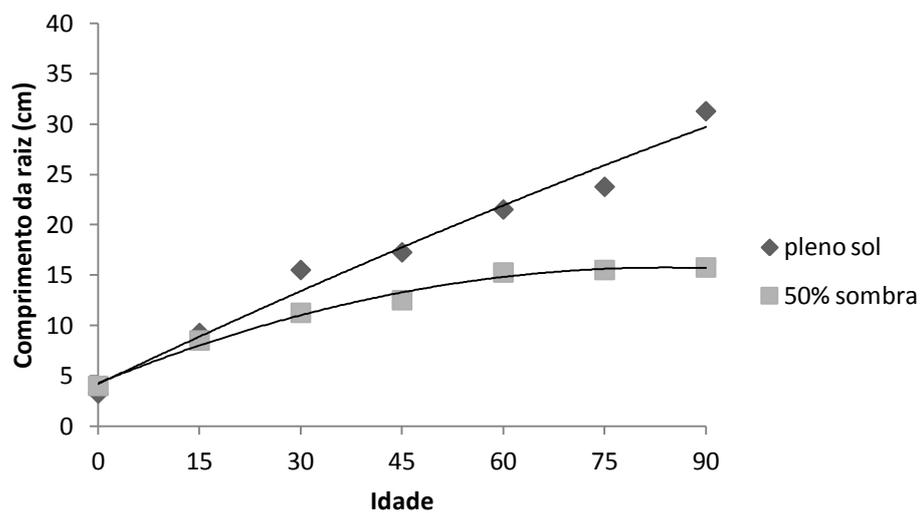
Figura 12. Área foliar (cm²) de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

A determinação da área foliar é importante, pois as folhas são responsáveis pela captação da energia solar e transformação em matéria orgânica pelo processo da fotossíntese (BARREIRO et al. 2006), sendo relevante em estudos que envolvam crescimento (NORMAN; CAMPBELL, 1989). E ainda, o aumento da área foliar propicia um aumento na capacidade da planta em aproveitar a energia luminosa para a fotossíntese e, desta forma, pode ser utilizado para avaliar a produtividade (LUCCHESI, 1987).

Quanto ao comprimento da raiz, para a alfavaca-cravo, o valor máximo foi aos 90 dias após o transplante, atingindo 34,0cm, em plantas em pleno sol, e em comparação, em ambiente 50% sombra, foi de 23,75cm (Figura 13a). Alfavaca-roxa, por sua vez, alcançou 31,25cm, em pleno sol. E em casa de vegetação, atingiu 15,75cm, aos 90 dias (Figura 13b).



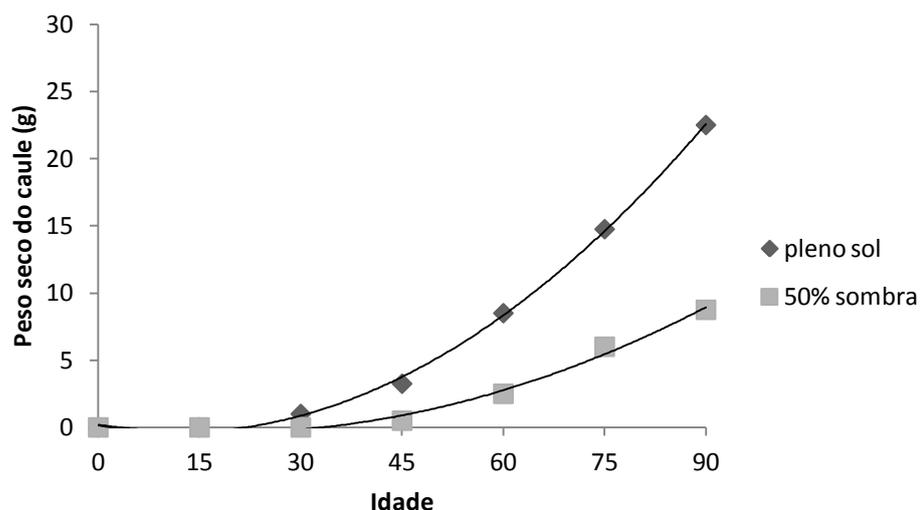
(a)



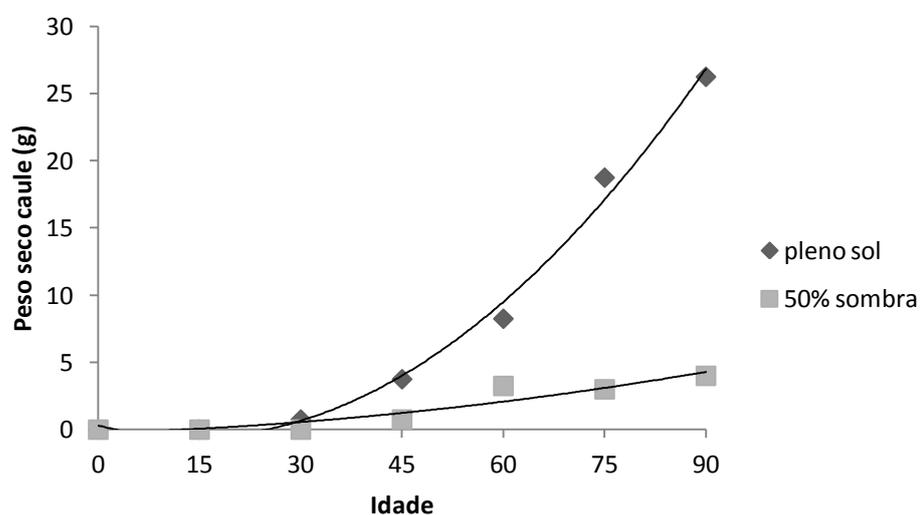
(b)

Figura 13. Comprimento da raiz de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

De acordo com o modelo de regressão ajustado para a matéria seca do caule, pode-se observar na Figura 14, que as espécies apresentaram comportamento semelhante, sendo que os maiores valores são observados, no período do experimento, na condição de pleno sol, onde o peso seco do caule de alfavaca-cravo foi de 22,5 g e de alfavaca-roxa, 26,25 g.



(a)

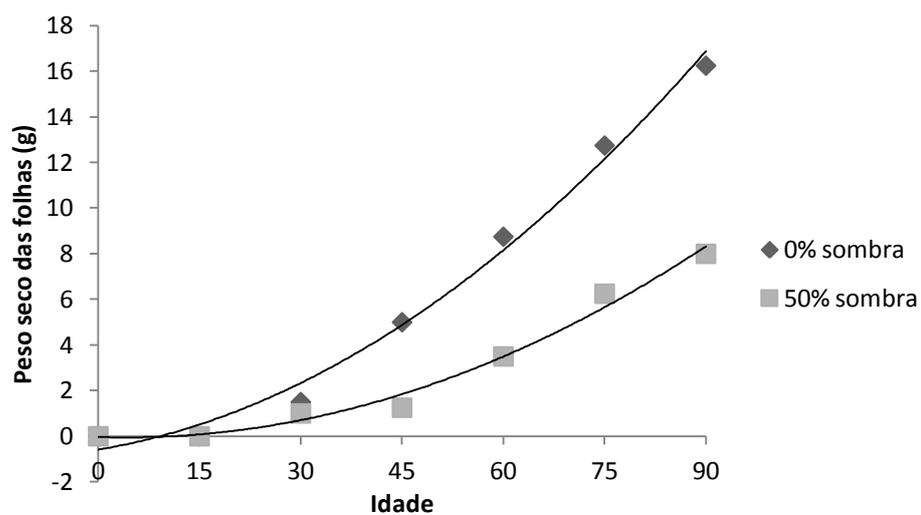


(b)

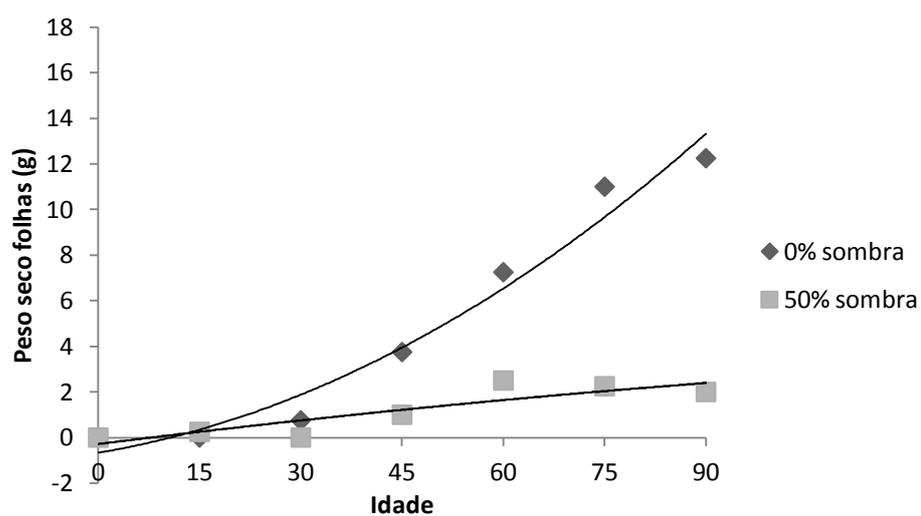
Figura 14. Peso seco do caule de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

Em casa de vegetação, os valores médios do peso seco foram muito baixos, 8,75 g para a alfavaca-cravo e 4,0 g para a alfavaca-roxa. A redução da intensidade luminosa pode, muitas vezes, ficar abaixo do ponto de saturação luminosa, reduzindo o processo fotossintético e, com isso, a produção de biomassa seca (LOPES et al., 1986 citado por GOMES et al., 2011).

A seguir estão apresentados os valores para o peso seco das folhas, onde se constata mais uma vez, que as plantas obtiveram maior massa seca quando cultivadas em pleno sol, estando de acordo com Gomes et al. (2011), que obtiveram para melissa (*Melissa officinalis*) no tratamento em pleno sol, valores 2,75 vezes maiores quando comparado ao tratamento em que as plantas cresceram em ambiente sombreado a 75%. As amostras de alfavaca-cravo crescidas em pleno sol apresentaram biomassa de 16,25 g; a alfavaca-roxa apresentou 12,25 g; em casa de vegetação, os pesos secos foram de 8,0 g para a alfavaca-cravo e 2,0 g para a alfavaca-roxa (Figura 15).



(a)



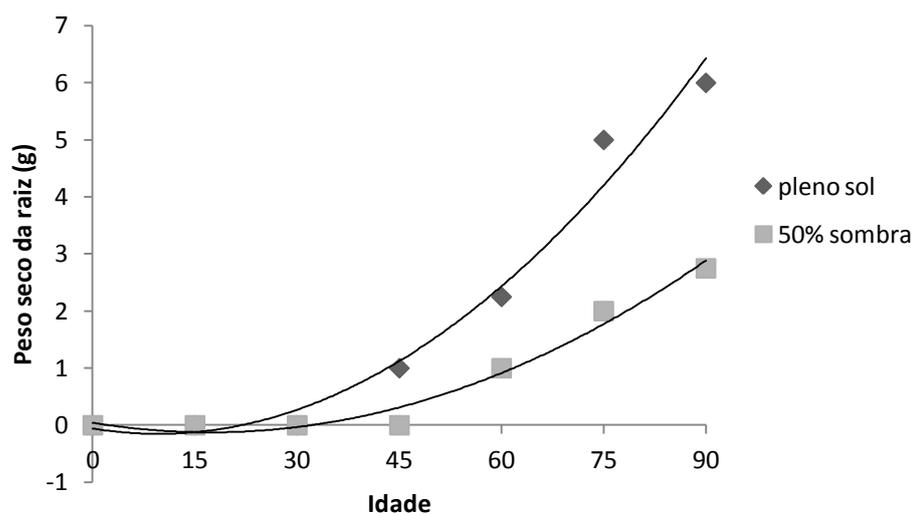
(b)

Figura 15. Peso seco das folhas de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

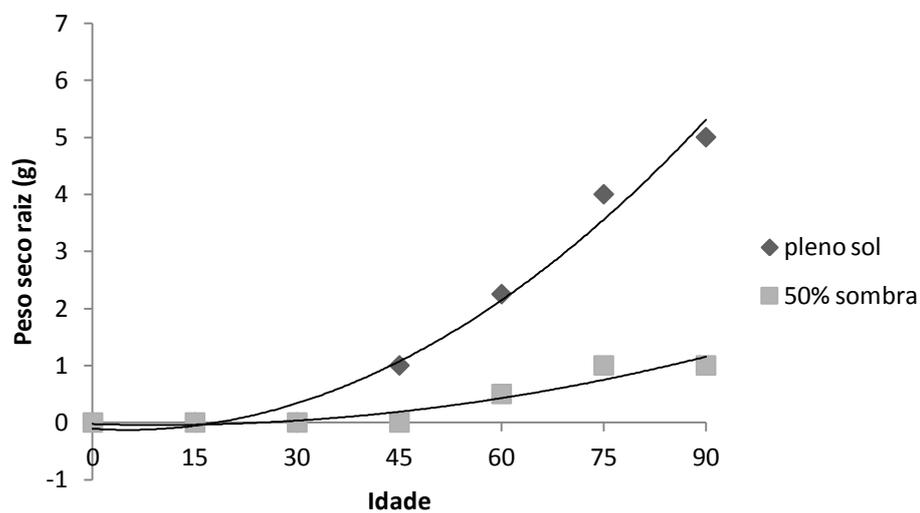
O peso seco das raízes das espécies está apresentado na Figura 16. Foram observados maiores médias dessa variável nas plantas cultivadas em pleno sol, o que está de acordo com o trabalho de Factor et al. (2008), cujas plantas de *O. gratissimum* em pleno sol obtiveram maiores ganhos de massa seca da raiz. Os autores afirmam que a alocação de matéria seca para as raízes ocorre preferencialmente em função da intensidade luminosa.

Nas plantas cultivadas em pleno sol, as médias foram 6,0 g e 5,0 g, para alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, respectivamente; em casa de vegetação, 2,75 g para alfavaca-cravo e apenas 1,0 g para alfavaca-roxa.

Sousa (2002), analisando a influência do substrato e da intensidade luminosa em alfavaca-cravo, constatou que, em relação a intensidade luminosa, a produção da matéria seca foi favorecida com o aumento da intensidade (80% de luminosidade e pleno sol).



(a)



(b)

Figura 16. Peso seco da raiz de plantas de alfavaca-cravo (a) e alfavaca-roxa (b) nos tratamentos luminosidade (0%; 50%) nas idades (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90). Fortaleza, CE, 2012.

4. CONCLUSÃO

As plantas cultivadas em pleno sol apresentaram melhor desempenho que as cultivadas em local sombreado, no período estudado.

Aos 90 dias após o transplântio, o número de folhas, a área foliar e a massa seca do caule da alfavaca-roxa cultivada em pleno sol foi superior ao da alfavaca-cravo cerca de 1,2x, enquanto a massa seca das folhas e da raiz da alfavaca-cravo foram maiores que a da alfavaca-roxa, no mesmo ambiente.

O número de folhas da alfavaca-roxa cultivada em pleno sol foi 3,5x maior que a condição em casa de vegetação.

A matéria seca de caule e raiz da alfavaca-cravo cultivada em pleno sol apresentou-se cerca de 3x superior que em local sombreado, enquanto o valor foi o dobro no que se refere à massa seca da folha.

A alfavaca-roxa, por sua vez apresentou valores cerca de 6x maiores de massa seca de caule e folha quando a espécie foi cultivada em pleno sol em comparação à casa de vegetação, enquanto a massa seca da raiz, foi 5 x maior, nas mesmas condições.

REFERÊNCIAS

- BARREIRO, A. P.; ZUCARELI, V.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 563- 567, 2006.
- BRANT, R. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSA, L. F.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FERRI, P. H.; CORRÊA, R. M. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1401- 1407, 2009.
- BRITO, A. C. **Emergência de plântulas e propriedades do pólen e do estigma do manjeriço (cultivar Maria Bonita) com vistas à hibridação artificial**. 2009, 69f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2009.
- CARVALHO, N. O. S.; PELACANI, C. R.; RODRIGUES, M. O. S.; CREPALDI, I. C. Crescimento inicial de plantas de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) em diferentes níveis de luminosidade. **Revista Árvore**, v. 30, n. 3, p. 351- 357, Viçosa, 2006.
- COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M.; ALVES, E.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSAL, L. E. Effects of coloured shade netting on the vegetative development and leaf structure of *Ocimum selloi*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 2, p. 349- 359, 2010.
- EFFRAIM, K.D.; JACKS, T.W.; SODIPO, O.A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. **African Journal Biomedical Research**. Borno State, Nigeria.v.6, p. 21-25, 2001.
- FACTOR, T. L; PURQUERIO, L. F. V; LIMA JÚNIOR, S.; ARAÚJO, J. A. C; CURI, E. L; TIVELLI, S. W. Crescimento e teor do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Horticultura Brasileira** v. 26, n. 2 (Suplemento - CD Rom), jul-ago 2008.
- FERNANDES, V. F. **Crescimento, produção do óleo essencial e anatomia foliar de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) em diferentes níveis de radiação luminosa**. 2012, 78 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2012.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR- Sistema de análise de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.1. Lavras: UFLA, 2000.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374- 381, 2007.

GOMES, J. A. O.; QUEIROZ, G. A.; SILVA, P. H. L.; BRANDÃO, D. S.; PARREIRAS, N. S.; MARTINS, E. R. Produção de biomassa e teor de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob sombreamento em Montes Claros-MG. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, Dez 2011.

LIMA, M. C.; AMARANTE, L.; MARIOT, M. P.; SERPA, R. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 45-50, 2011.

LUCCHESI, A. A. Fatores da produção vegetal. In: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1987. p. 1-11.

NORMAN, J. M.; CAMPBELL, G. S. Crop Structure. In: PEARCY, R. W.; EHLERINGER, J. R.; MOONEY, H. A.; RUNDEL, P. W. **Plant physiological ecology: field methods and instrumentation**. New York: Chapman and Hall, 1989, p. 457.

OGENDO, J. O.; KOSTYUKOVSKY, M.; RAVID, U.; MATASYOH, J. C.; DENG, A. L.; OMOLO, E. O.; KARIUKI, S. T.; SHAYA, E. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insects pests attacking stored food products. **J. Stored Products Research**, v. 44, p. 328-334, 2008.

PERINI, V. B. M.; CASTRO, H. G.; CARDOSO, D. P.; LIMA, S. O.; AGUIAR, R. W. S. MOMENTÉ, V. G. Efeito da adubação e da luz na produção de biomassa de capim citronela. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 6, p. 924- 931, 2011.

QUEIROZ, A. M. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente). **Caracterização limnológica do Lagamar do Cauípe- Planície Costeira do município de Caucaia- Ce**. 2003. 203 f. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2003.

SALES, J. F.; PINTO, J. E. B.; FERRI, P. H.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; BOTREL, P. P. Influência do nível de irradiância no crescimento, produção e composição química do óleo essencial de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* Epl.) **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 389-396, abr./jun. 2009.

SOUSA, P. B. L. **Propagação e análise de crescimento de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) sob condições de campo e ambiente controlado**. 2002. 60f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS. Feira de Santana, BA, 2002.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2004, 719p.

CAPÍTULO 3- RENDIMENTO E ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN ¹H) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA EM DOIS AMBIENTES

RESUMO

O gênero *Ocimum* (Lamiaceae) compõem várias espécies que produzem óleos essenciais com propriedades medicinais. *Ocimum gratissimum* L., originária da Ásia e subespontânea em todo o Brasil, apresenta-se como um subarbusto ramificado, cujo óleo essencial rico em eugenol, apresenta grande importância na indústria farmacêutica. É importante considerar que os fatores ambientais influenciam sobremaneira na produção de biomassa, bem como na quantidade e qualidade de metabólitos secundários, tais como os óleos essenciais. Para avaliar o rendimento do óleo essencial de *O. gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Ocimum* sp (alfavaca-roxa) em diferentes ambientes de cultivo, ou seja, em pleno sol (0% sombra) e ambiente sombreado (50% sombra), foi realizado um experimento com duração de 90 dias, utilizando delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo duas plantas por repetição. Foi realizada uma análise preliminar dos componentes químicos do óleo essencial das espécies através de Ressonância Magnética Nuclear ¹H. Houve diferença significativa para os rendimentos dos óleos essenciais de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa desenvolvidas em pleno sol em relação às plantas que se desenvolveram em ambiente sombreado. Para as duas espécies, maiores rendimentos foram obtidos nas amostras cultivadas em pleno sol. Os espectros de RMN mostraram a presença no óleo de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa de eugenol, β-cariofileno, 1,8- cineol.

Palavras-chave: Eugenol. Lamiaceae. Plantas Medicinais.

ABSTRACT

The genus *Ocimum* belongs to the Lamiaceae family that consists by herbs and shrubs and are collectively called alfavaca. *Ocimum gratissimum* L. is native of Asia presents itself as a branched subshrub whose essential oil rich in eugenol, is naturally used in the treatment of different diseases, for example upper respiratory tract infections, diarrhea, headache, fever and pneumonia. Environmental factors influence biomass production, as well as the quantity and quality of secondary metabolites, such as essential oils. The aim of this work was to evaluate essential oil content and chemical constituents of alfavaca-cravo e alfavaca-roxa in different environmental conditions, in full sun (0% shade) and shaded environment (50% shade). An experiment was conducted with a duration of 90 days. The experimental design was completely randomized, with four replications and two plants per replication. Essential oil was extracted through hydrodistillation and analyzed using ¹H Nuclear Magnetic Resonance. There was significant difference in the yields of essential oils of species developed in full sun in relation to plants that developed under shade. For both species, higher yields were obtained in samples grown in full sun. The NMR spectra showed the presence of eugenol, β-caryophyllene, 1,8 - cineole.

Keywords: Eugenol. Lamiaceae. Medicinal Plants.

1. INTRODUÇÃO

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais há muito tempo são conhecidas pelas populações humanas, e esse conhecimento do uso de plantas para promoção e manutenção da saúde, acumulado durante séculos, continua sendo valioso até hoje (PROBST, 2012).

Dentre as famílias botânicas que possuem representantes conhecidos por seus aspectos medicinais, destaca-se Lamiaceae (= Labiatae) (PEREIRA; MAIA, 2007). A espécie *Ocimum gratissimum* L. pertence a essa família e apresenta comprovadas propriedades terapêuticas. Comumente chamada de alfavaca-cravo (LORENZI; MATOS, 2008), apresenta-se como um subarbusto aromático, sendo originário de regiões quentes da Ásia e África e subespontâneo no Brasil (BLANK et al., 2003; JORGE; EMERY; SILVA, 2006; LORENZI; MATOS, 2008). Produz óleo essencial com ação antibacteriana sobre *Listeria monocytogenes* (MBATA; SAIKIA, 2005; NAKAMURA et al., 1999); *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. (NAKAMURA et al., 1999); *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (NWEZE; EZE, 2009).

Propriedades antifúngicas de *O. gratissimum* sobre *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* foram demonstradas por Nakamura et al. (2004), enquanto estudos de bioatividade do extrato da planta em *Alternaria* sp e *Penicillium chrisogenum* foram apresentados por Faria et al., 2006 e Rosset et al., 2005. Santos et al. (2010) estudaram o efeito de extratos de *O. gratissimum* sobre fungos dermatofíticos e Lemos et al. (2005) comprovaram a eficácia da espécie contra *Cryptococcus neoformans*.

Indicando a ampla gama de ação dos óleos essenciais de *O. gratissimum*, Flávio et al. (2011) observaram que houve redução na infecção de sementes de sorgo por fungos quando tratadas com óleo essencial da espécie, o que demonstra uma alternativa orgânica e de baixo custo para o manejo integrado de doenças de plantas, enquanto Alves et al. (2004) e Rocha et al. (2002) identificaram potencialidades alelopáticas do óleo essencial da espécie. Efeitos antiparasitários, por sua vez, foram estudados em *Leishmania amazonensis* (UEDA- NAKAMURA et al., 2006), e *L. chagasi* (OLIVEIRA et al., 2008).

Óleos essenciais são substâncias naturais, produtos do metabolismo secundário das plantas, que possuem composição química complexa.

São constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de dez e de quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos), mas, dependendo do método de extração, e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo essencial (SIANI et al., 2000).

Técnicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) auxiliam a identificação e elucidação estrutural de seus componentes químicos (CASTELO; DEL MENEZZI; RESCK, 2010; LOPES; FASCIO, 2004). RMN baseia-se na absorção de energia na gama das radiofrequências por partes de núcleo em uma molécula submetida a um forte campo magnético; e configura-se como uma das mais importantes técnicas para a obtenção de informação física, química, eletrônica e estrutural das moléculas, de um modo não destrutivo, podendo fornecer informação acerca da estrutura tridimensional e da dinâmica das moléculas (ALVES, 2010).

A biossíntese de metabólitos secundários é determinada geneticamente; porém a quantidade e a concentração desses compostos variam em função das condições ambientais, sendo a luz um importante fator, por atuar de forma complexa, influenciando “no acúmulo e na variedade dos componentes dos óleos essenciais, uma vez que afeta direta ou indiretamente a produção de fitomassa, a proporção de órgãos e as vias biossintéticas destes metabólitos secundários” (MARTINS, 2006).

Estudos sobre a flora medicinal do nosso país constituem uma ferramenta importante por fornecer informações sobre práticas adequadas de manejo da cultivar de interesse e obtenção de princípios ativos com melhor qualidade e quantidade.

Para avaliar o rendimento do óleo essencial de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa em diferentes ambientes de cultivo, pleno sol (0% sombra) e ambiente sombreado (50% sombra), foi realizado um experimento para avaliar o rendimento do óleo essencial e análise preliminar dos componentes químicos através de Ressonância Magnética Nuclear ^1H .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico e cultivo

As mudas foram produzidas em casa de vegetação do Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal do Ceará, a partir de sementes de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa coletadas de amostras cultivadas na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana (NEPAU), localizado no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE.

A semeadura em bandejas plásticas foi feita no dia 18 de março de 2011, semeando-se a lanço 2g de sementes de cada espécime. O substrato foi regado com solução de nitrato de potássio (KNO_3) em uma concentração de 0,2% com o objetivo de acelerar a germinação.

Após 20 dias de semeadura (7/4/2011), quando as plântulas apresentavam duas folhas definitivas, foi realizado o transplântio para bandejas de isopor com 72 células com volume de 30 cm^3 por célula, sendo submetidas a duas irrigações diárias. Ao apresentarem 4 a 6 folhas, no dia 25 de abril de 2011, as mudas foram transplantadas para o local definitivo, recipientes plásticos de 12 litros e se desenvolveram em pleno sol (0% sombra) e em casa de vegetação (50% sombra). O substrato era composto por areia, vermiculita, solo e húmus de minhoca em iguais proporções, cujas características físico-químicas foram: pH em água: 7,8; Ca: $2,02 \text{ g kg}^{-1}$; Mg: $0,24 \text{ g kg}^{-1}$; Al: $0,0 \text{ g kg}^{-1}$; Na: $0,06 \text{ g kg}^{-1}$; H+Al: $0,0 \text{ g kg}^{-1}$; K: $0,32 \text{ g kg}^{-1}$; P: $4,10 \text{ g kg}^{-1}$; MO: 35,27%; V: 100%.

As plantas foram irrigadas duas vezes ao dia, não sendo necessário utilizar adubação adicional, nem produtos para controle de pragas e doenças.

2.2 Extração, rendimento e análise espectroscópica por RMN dos óleos essenciais

A coleta de inflorescências e folhas foi realizada na manhã do dia 18/07/2011, 90 dias após o transplântio. As partes aéreas das plantas de cada tratamento foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas imediatamente ao Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (UFC) para serem

submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por Gottlieb (BARRETO, 2008). Acondicionou-se o material vegetal em balão de fundo redondo de 5,0 L onde se adicionou água destilada. O sistema foi submetido a aquecimento durante duas horas e o óleo essencial obtido foi separado do hidrolato e seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Alguns dos hidrolatos foram extraídos com diclorometano (CH_2Cl_2) e secos com Na_2SO_4 após evaporação do solvente utilizando N_2 (g).

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, duas plantas por repetição para cada espécime, alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, nos dois ambientes, totalizando 16 amostras.

Os espectros foram obtidos através de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) com frequência de 300 MHz. Quantidades variadas de óleo essencial foram dissolvidas em CDCl_3 (Clorofórmio Deuterado) e acondicionadas em tubos de RMN de 5 mm. Os espectros foram referenciados pelo sinal em δ 7,27 referente ao hidrogênio do clorofórmio residual não-deuterado presente na amostra. Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em ppm na faixa de 0,6 -7,3 ppm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 7 e 8 apresentam as quantidades de biomassa utilizada, o volume do óleo essencial e os rendimentos obtidos das plantas coletadas 90 dias após o transplante, nos ambientes de pleno sol (0% sombra) e em estufa (50% sombra) de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, respectivamente. Os rendimentos das amostras variaram de 0,002% a 0,008% para alfavaca-cravo e de 0,001 a 0,004% para alfavaca-roxa. Em uma das amostras de alfavaca-roxa (repetição 2) cultivada em condição de sombreamento, não foi possível a obtenção do óleo pelo fato do material coletado ter sido insuficiente para a extração, totalizando apenas 44,3g.

Tabela 7. Rendimentos (%) de óleo essencial das partes aéreas de alfavaca-cravo em dois ambientes (pleno sol; 50% sombra). Fortaleza, CE, 2012.

Espécimes de Alfavaca-cravo			Óleo essencial	
Sigla	ALFAVACA	Parte aérea (g)	V (mL)	Rendimento (%)
L2R1	CRAVO SOL	200	0,8	0,004
L2R2	CRAVO SOL	235	1,26	0,005
L2R3	CRAVO SOL	200	1,5	0,008
L2R4	CRAVO SOL	185	0,9	0,005
L2R1	CRAVO SOMBRA	140	0,5	0,003
L2R2	CRAVO SOMBRA	160	0,25	0,002
L2R3	CRAVO SOMBRA	155	0,25	0,002
L2R4	CRAVO SOMBRA	190	0,5	0,003

Tabela 8. Rendimentos (%) de óleo essencial das partes aéreas de alfavaca-roxa em dois ambientes (pleno sol; 50% sombra). Fortaleza, CE, 2012.

Espécimes de Alfavaca-roxa			Óleo essencial	
Sigla	ALFAVACA	Parte aérea (g)	V (mL)	Rendimento (%)
L3R1	ROXA SOL	180	0,6	0,003
L3R2	ROXA SOL	200	0,76	0,004
L3R3	ROXA SOL	210	0,9	0,004
L3R4	ROXA SOL	230	0,8	0,003
L3R1	ROXA SOMBRA	141	0,4	0,003
L3R2	ROXA SOMBRA	44,3	-	-
L3R3	ROXA SOMBRA	70	0,1	0,001
L3R4	ROXA SOMBRA	70	0,1	0,001

Na tabela 9 estão apresentadas as médias dos rendimentos de óleos essenciais dos espécimes estudados, evidenciando que o rendimento foi afetado pelas condições de cultivo. Houve diferença significativa para os rendimentos dos óleos essenciais de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa desenvolvidas em pleno sol em relação às plantas que se desenvolveram em ambiente sombreado. Para as duas espécies, maiores rendimentos foram obtidos nas amostras obtidas de plantas que se desenvolveram em pleno sol.

Alfavaca-cravo apresentou maiores valores em relação a alfavaca-roxa avaliando-se as plantas que cresceram em pleno sol; porém não houve diferença significativa para os rendimentos dos óleos essenciais das espécies em ambiente sombreado em casa de vegetação (Tabela 9).

Tabela 9. Médias dos rendimentos (%) de óleo essencial das partes aéreas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa em dois ambientes (pleno sol; 50% sombra). Fortaleza, CE, 2012.

Espécie	Ambiente	
	Pleno sol	50% sombra
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	0,0055aA	0,0025bA
<i>Ocimum</i> sp.	0,0035aB	0,0012bA
CV (%)	38,5	

Médias com mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Enquanto estudos apontam maiores acúmulos de óleo essencial em plantas cultivadas em casa de vegetação, outros mostram que plantas cultivadas em pleno sol apresentam maior produção. GOMES et al. (2009) afirmam que, dependendo da espécie, a luz pode influenciar os níveis e a composição do óleo essencial.

Segundo Factor et al. (2008), plantas de *O. gratissimum* cultivadas em pleno sol obtiveram o menor teor de óleo essencial dentre os tratamentos (malhas de 50% de sombreamento nas cores pretas, vermelha e azul e pleno sol ou 0%), enquanto o sombreamento de 50% (malha azul) favoreceu a produção de óleo essencial da espécie; os autores complementam que isso pode ter sido consequência da menor área foliar e alocação preferencial de biomassa para o sistema radicular, devido à elevada radiação.

Ly, Cracker e Potter (1996), por sua vez, constataram que plantas de tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentaram maior desempenho quando cultivadas na luminosidade total, diminuindo com o decréscimo dos níveis de luminosidade.

De forma geral, os cultivos protegidos têm apresentado êxito para a produção comercial de algumas espécies (BRANT et al., 2009). O comportamento observado nesse trabalho, entretanto, indica que alfavaca-cravo e alfavaca-roxa apresentaram maior rendimento desenvolvendo-se em condição de sol, comparado ao rendimento em casa de vegetação.

As figuras 17 a 20 representam os espectros de RMN ^1H dos óleos essenciais das quatro repetições de alfavaca-cravo cultivadas em pleno sol (0% sombra). Os espectros das plantas cultivadas em casa de vegetação (50% sombra) estão representados nas figuras 21 a 24. As figuras 25 a 28 mostram os espectros dos óleos essenciais das repetições 1 a 4 de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol e a figura 29 representa o espectro do óleo essencial da espécie nas condições de sombreamento.

A ressonância magnética das amostras de alfavaca-roxa, repetições R2, R3 e R4, referentes ao nível de sombreamento 50%, não puderam ser analisadas pelo fato das quantidades dos óleos essenciais obtidos terem sido insuficientes para a análise.

Os óleos essenciais são substâncias complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos, podendo pertencer a diversas classes de compostos, porém, os mais comumente encontrados são os monoterpenos e sesquiterpenos (CASTRO et al., 2004).

Existem vários quimiotipos para *Ocimum gratissimum*, tal como ocorre em outras espécies do mesmo gênero, sendo um quimiotipo muito comum o eugenol, que possui essa substância em maior quantidade na composição do óleo essencial (BIASI et al., 2009; PEREIRA; MAIA, 2007). Os espectros de RMN mostraram a presença no óleo das espécies o eugenol, β -cariofileno, 1,8- cineol.

Barreto (2008) e Gramosa et al. (2007) encontraram na composição dos óleos essenciais de *O. gratissimum*, eugenol, β -cariofileno, 1,8- cineol, enquanto γ -terpineno, α -bisaboleno, *p*-cimeno foram observados nos estudos de Franco et al. (2007) com a espécie. Gramosa et al. (2007) avaliaram a composição dos óleos essenciais de *Ocimum* sp. e observaram em sua composição, eugenol e teores significativos de β -cariofileno.

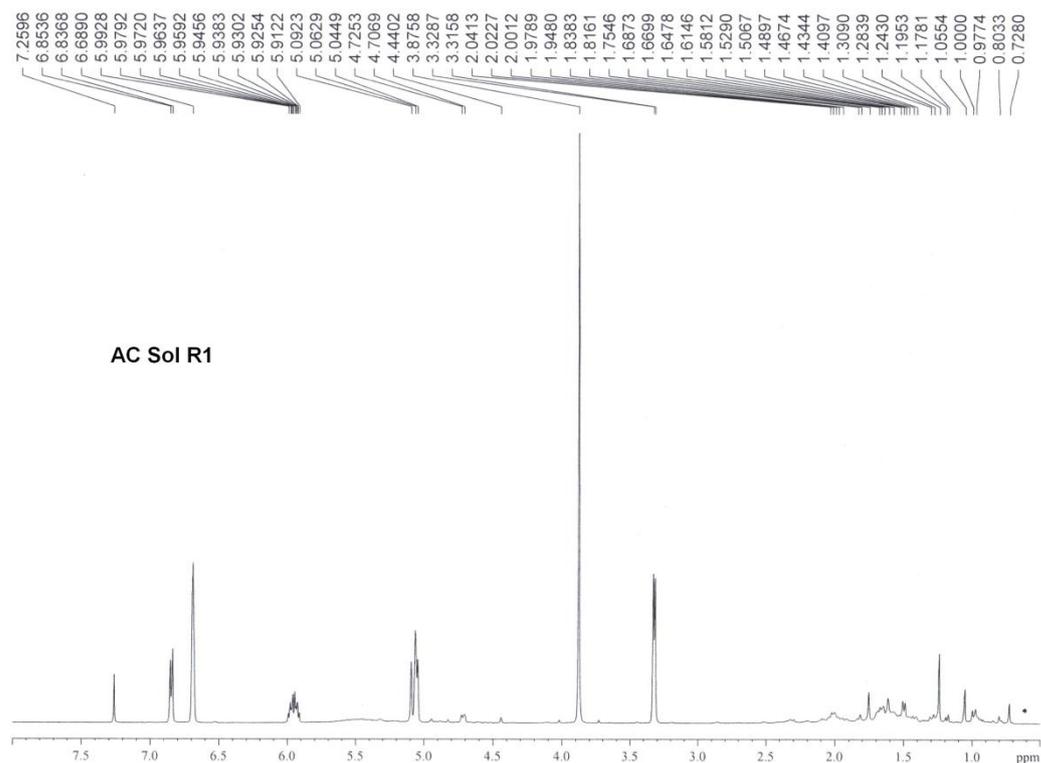


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol (0% sombra) (amostra 1).

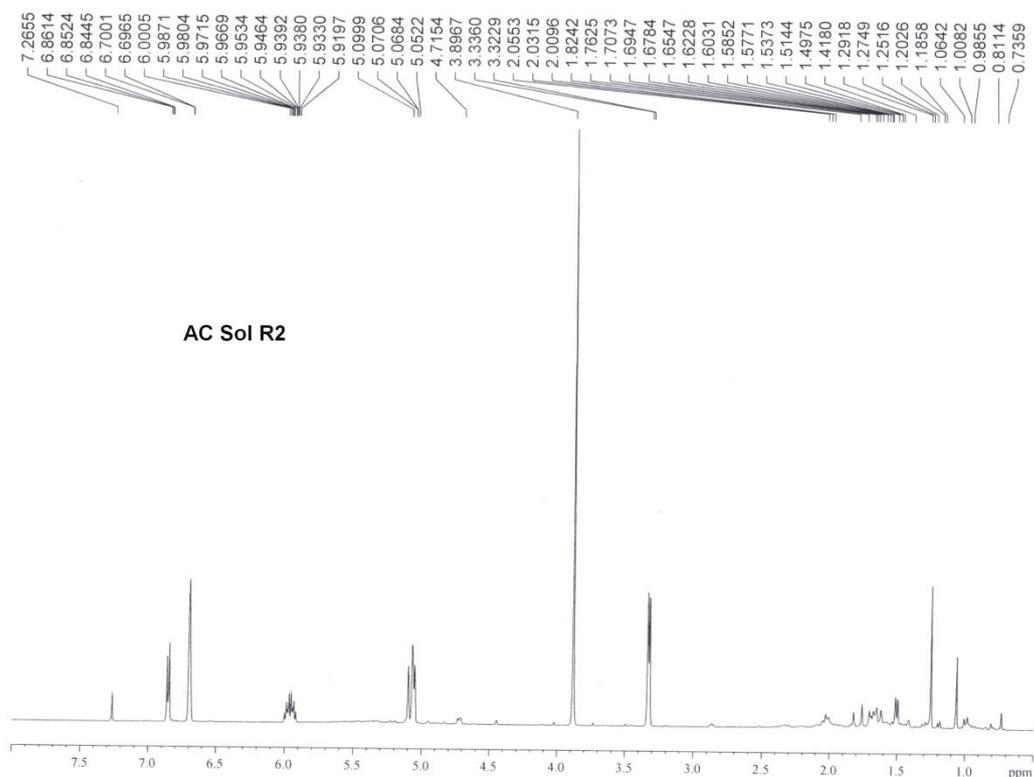


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol (0% sombra). (amostra 2)

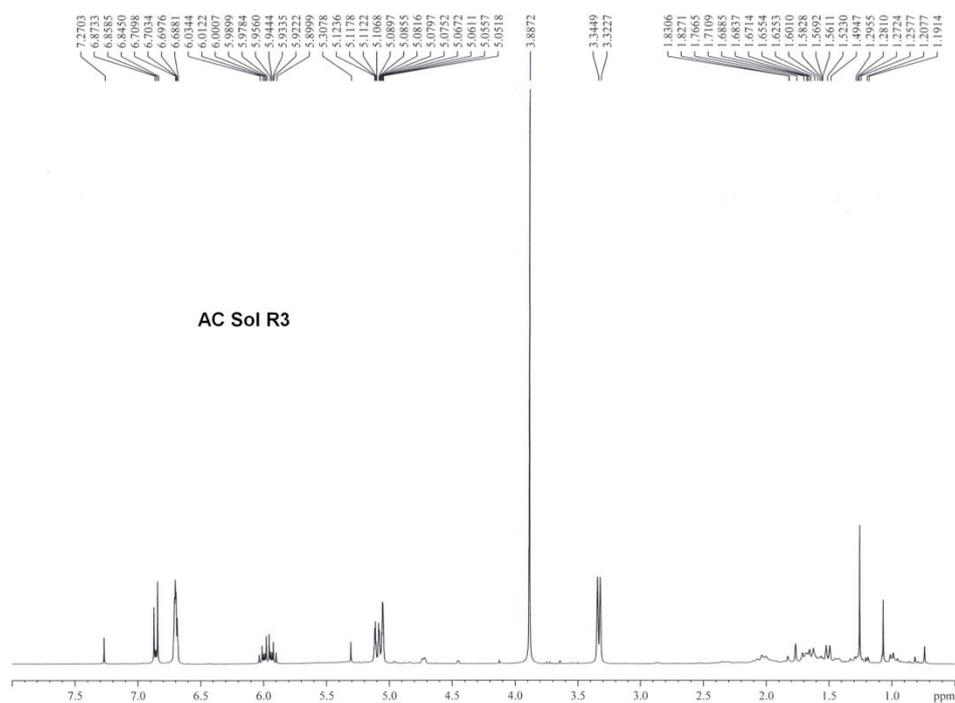


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol (0% sombra). (amostra 3).

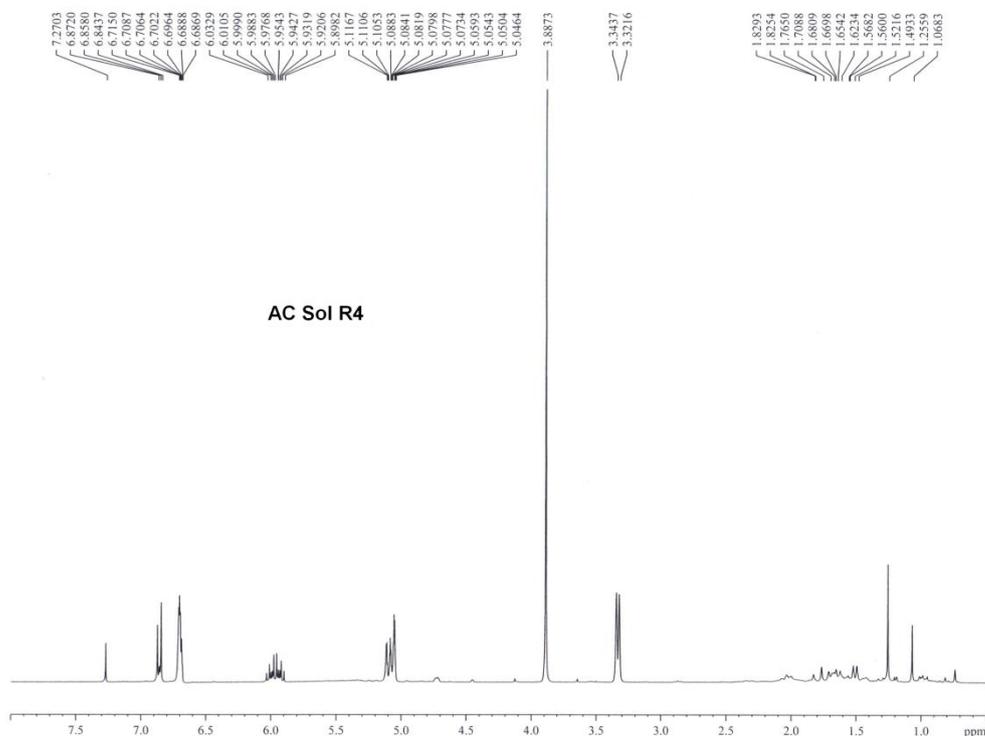


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em pleno sol (0% sombra). (amostra 4).

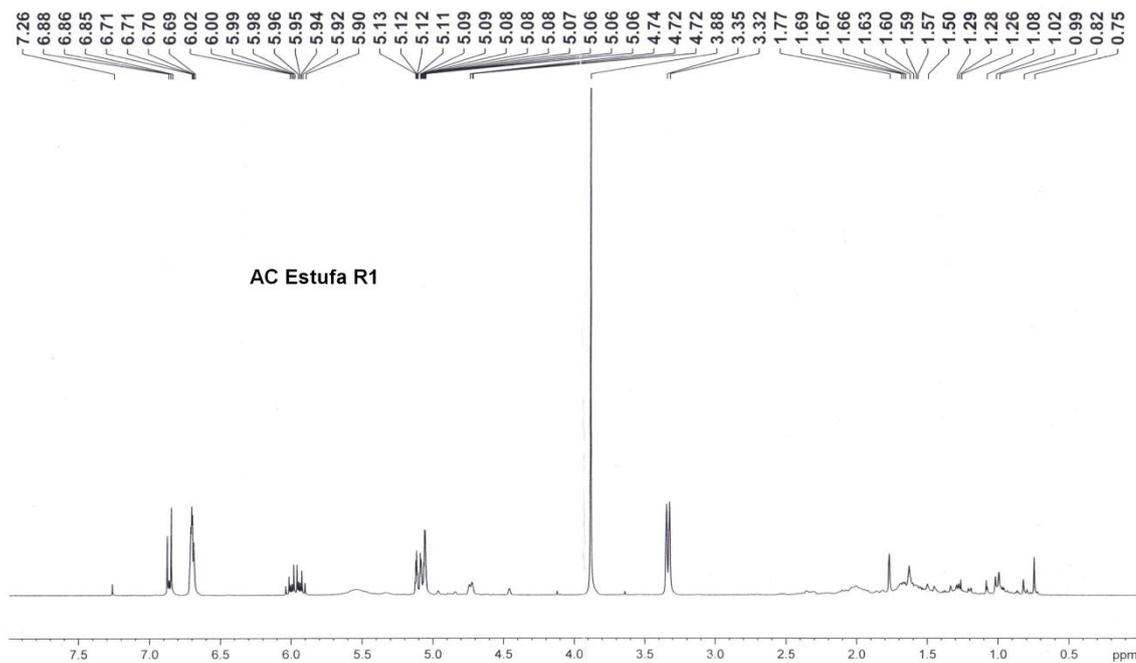


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em local sombreado (50% sombra). (amostra 1).

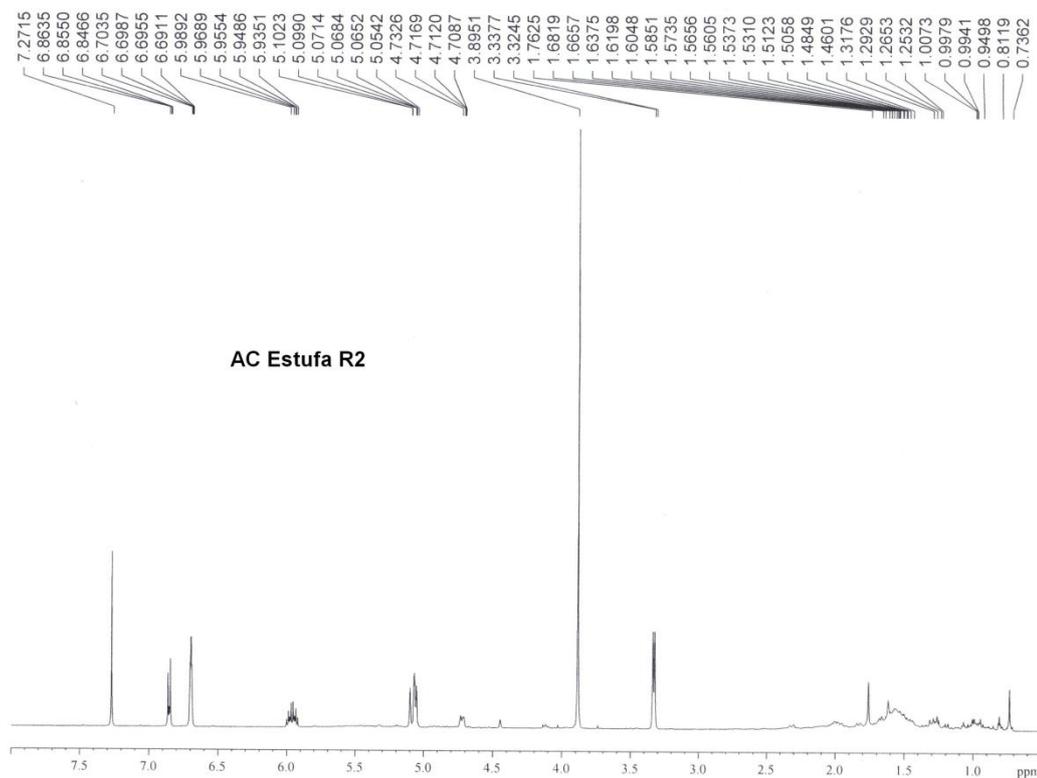


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em local sombreado (50% sombra). (amostra 2).

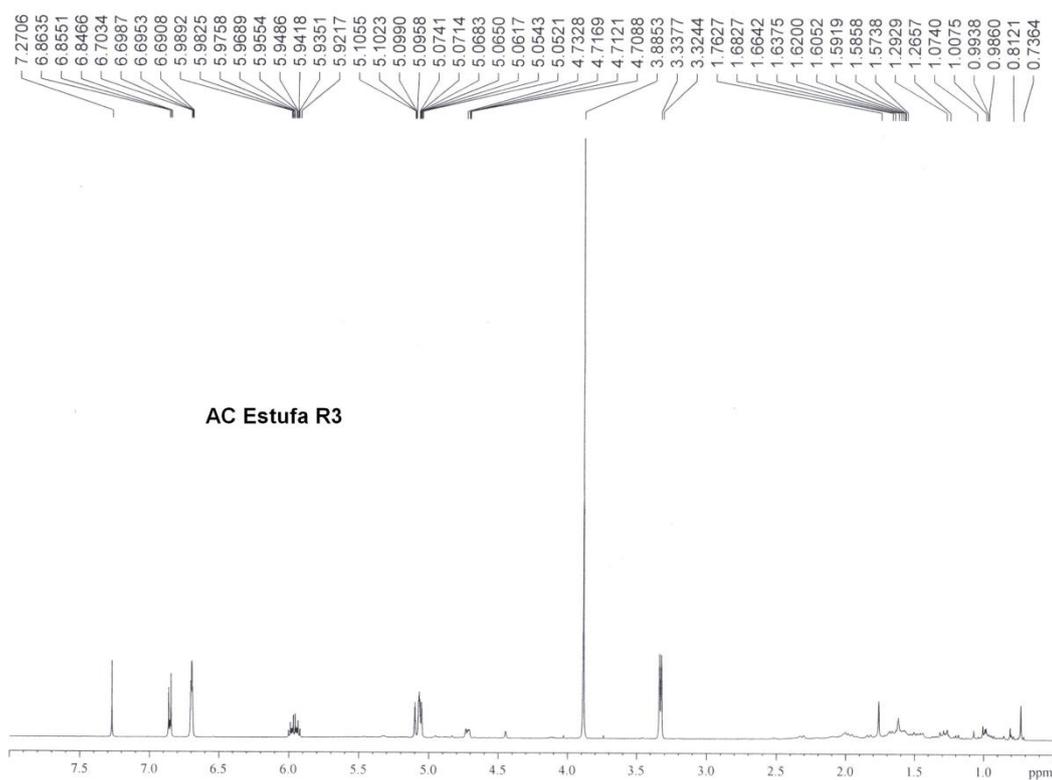


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em local sombreado (50% sombra). (amostra 3).

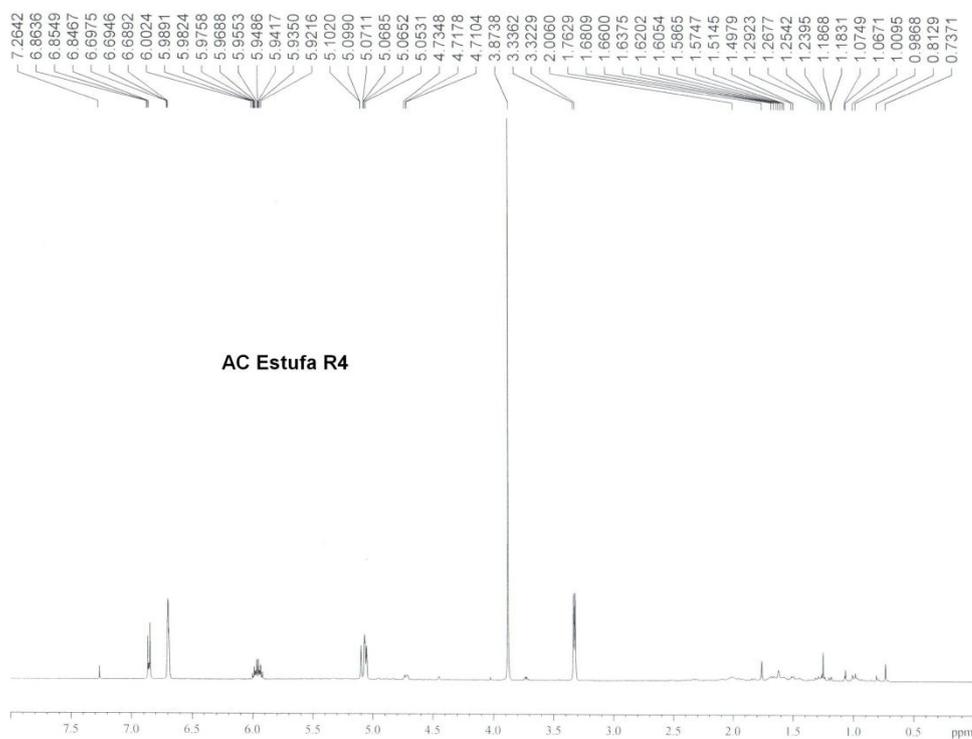


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-cravo cultivada em local sombreado (50% sombra). (amostra 4).

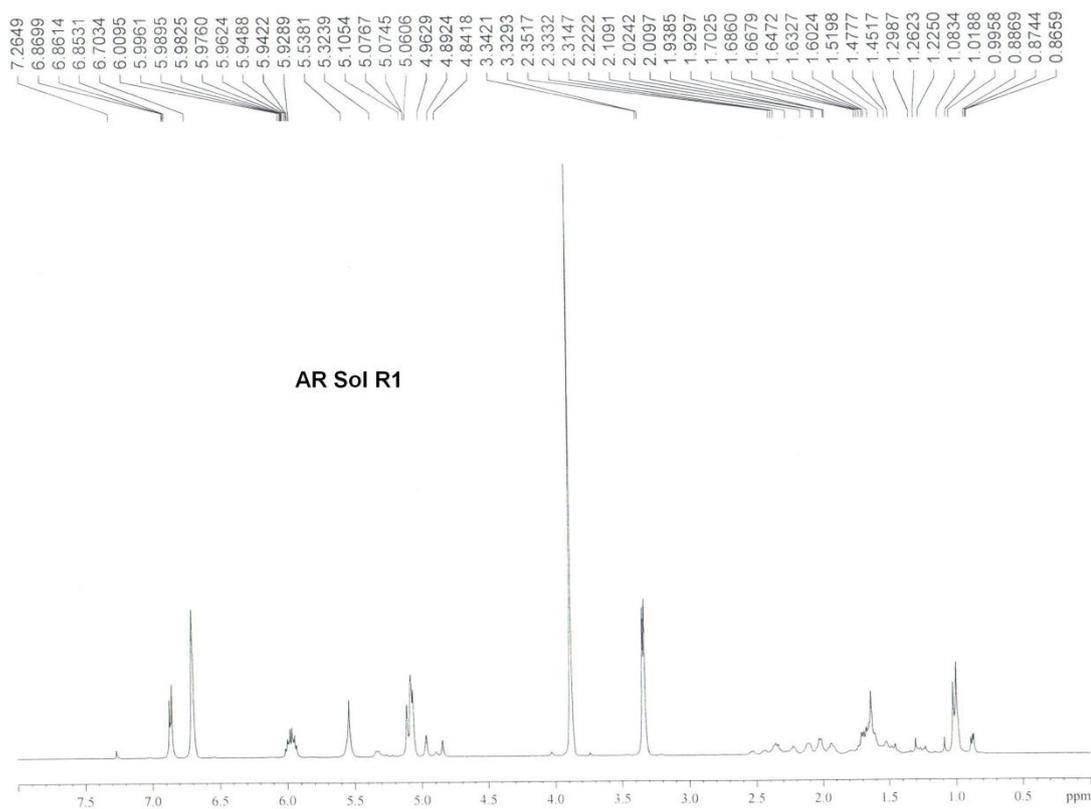


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol (0% sombra). (amostra 1).

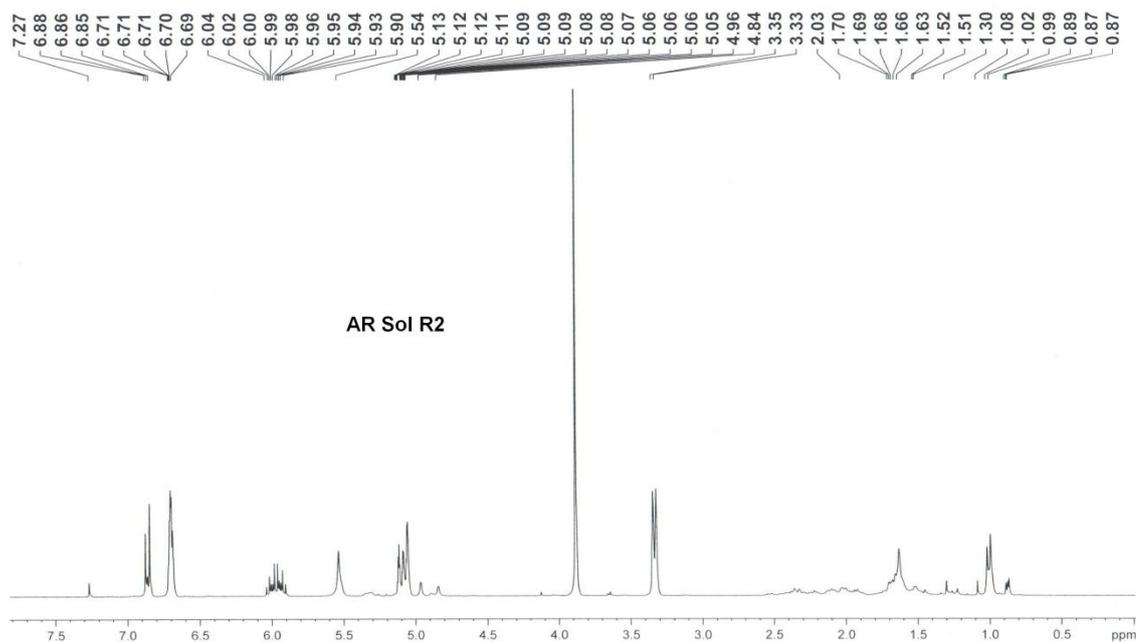


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol (0% sombra). (amostra 2).

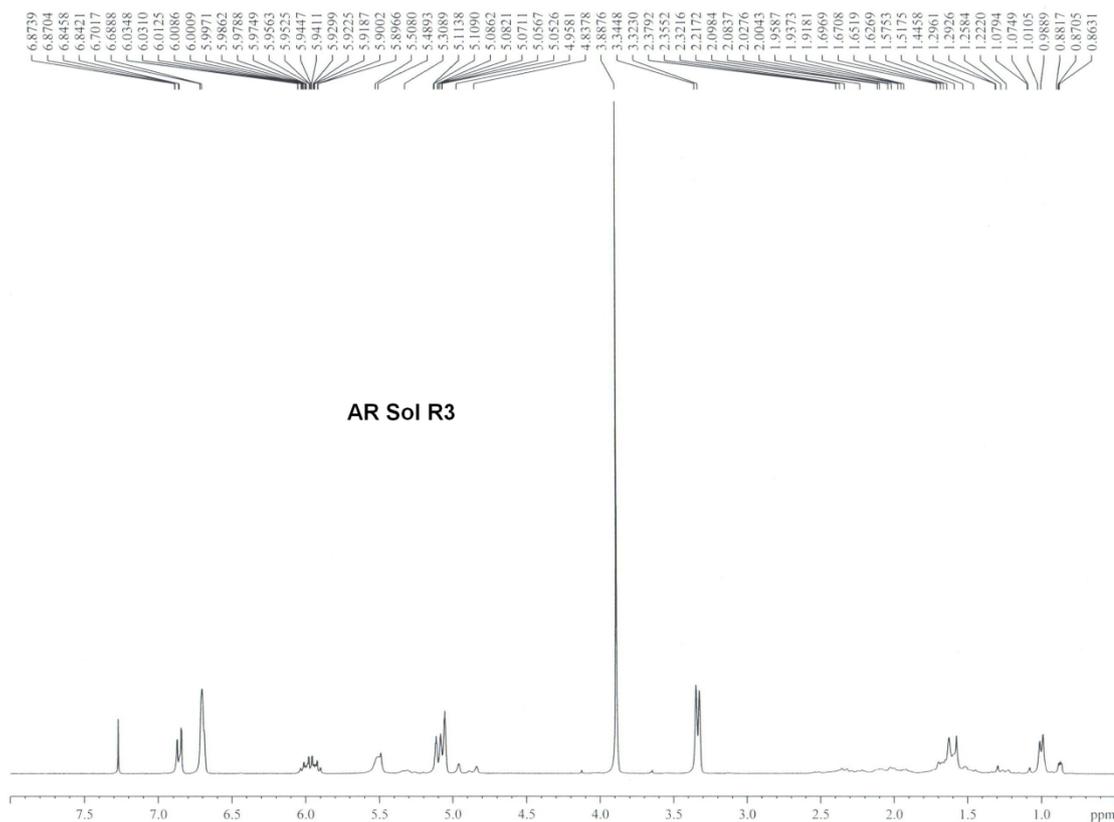


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol (0% sombra). (amostra 3).

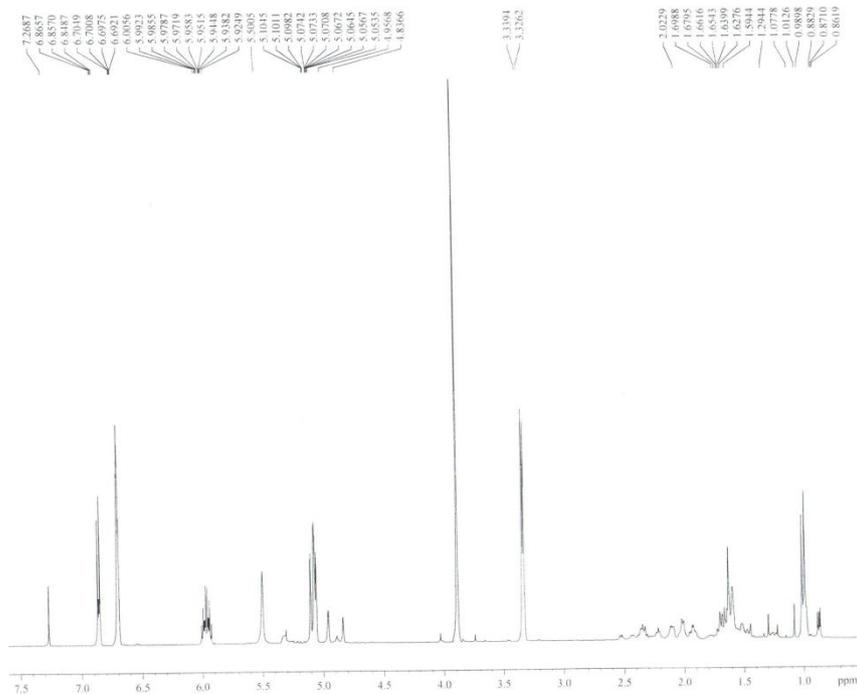


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em pleno sol (0% sombra). (amostra 4).

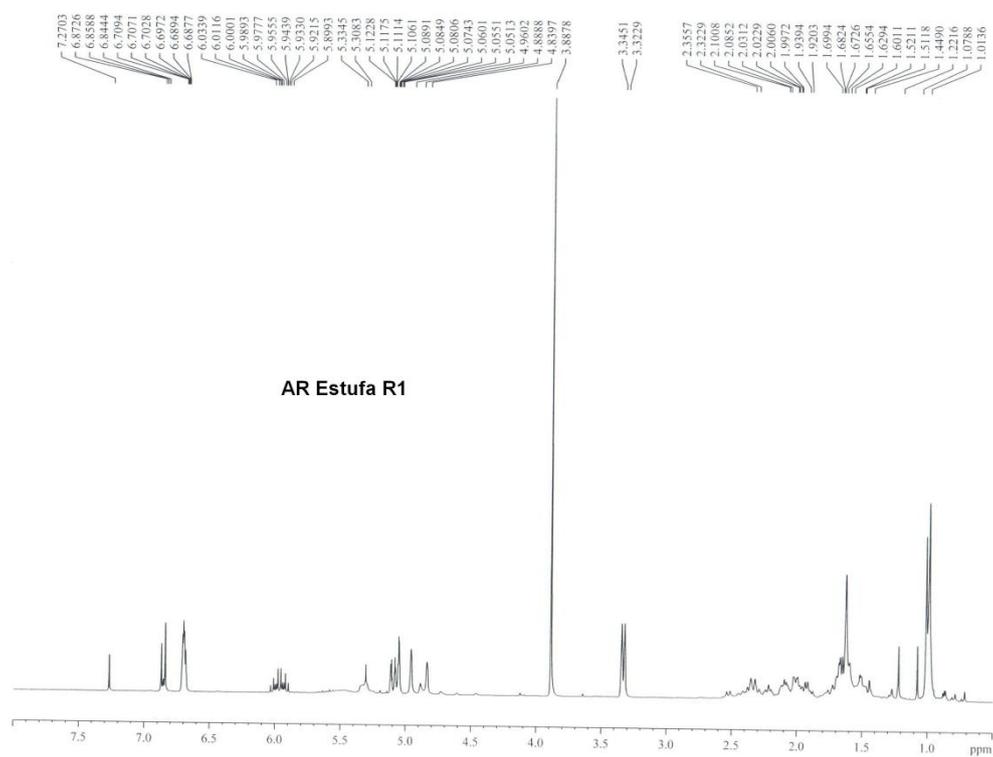


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de alfavaca-roxa cultivada em local sombreado (50% sombra). (amostra 1).

4. CONCLUSÃO

Para alfavaca-cravo e alfavaca-roxa, maiores rendimentos foram obtidos nas amostras cultivadas em pleno sol. Os espectros de RMN mostraram a presença no óleo das espécies o eugenol, β -cariofileno, 1,8- cineol.

REFERÊNCIAS

- ALVES, J. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos**. 2010. 73f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. 2010.
- ALVES, M. C. S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- BARRETO, M. B. **Estudo químico de *Croton muscicapa* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) e avaliação da composição química volátil de *Ocimum* spp (Lamiaceae)**. 2008. 233f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- BIASI, L. A.; MACHADO, E. M.; KOWALSKI, A. P. J.; SIGNOR, .; ALVES, M. A.; LIMA, F. I.; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L. C.; SCHEER, A. P. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, Brasília, n. 27, n. 1, p. 35- 39, 2009.
- BLANK A. F.; ARRIGONI-BLANK M. F.; SILVA P. A.; TORRES M. E. R.; MENEZES H. J. A. Efeitos de composições de substratos na produção de mudas de quiôio (*Ocimum gratissimum* L.) **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, p. 105-108, 2003.
- BRANT, R. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSA, L. F.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FERRI, P. H.; CORREA, R. M. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1401- 1407, 2009.
- CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. **Cerne**, Lavras, v. 16, n. 4, p. 573-584, out./dez. 2010.
- CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.
- FACTOR, T. L; PURQUERIO, L. F. V; LIMA JÚNIOR, S.; ARAÚJO, J. A. C; CURI, E. L; TIVELLI, S. W. Crescimento e teor do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2 (Suplemento - CD Rom), jul-ago, 2008.
- FARIA, T. J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J. R. P.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 867- 871, 2006.

FLÁVIO, N. S. D. S.; SALES, N. L. P.; AQUINO, C. F.; CATAO, H. C.; DOURADO, E. R.; AQUINO. Óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Annona crassiflora* no tratamento de sementes de sorgo. **Cadernos de Agroecologia**, Fortaleza, v. 6, n. 2, 2011.

FRANCO, A. L. P.; OLIVEIRA, T. B.; FERRI, P. H.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 208- 220, 2007.

GOMES, P. A.; SOUZA, M. F.; SOUZA JÚNIOR, I. T.; CARVALHO JÚNIOR, W. T. O.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de biomassa, óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam.). **Biotemas**, Santa Catarina, v. 22, n. 4, p. 9- 14, 2009.

GRAMOSA, N. V.; BARRETO, M. B.; FREITAS, J. B. S.; SILVEIRA, E. R. Análise e comparação da composição química volátil de *Ocimum* spp. In: **IV Simpósio Brasileiro de óleos essenciais**, Fortaleza, CE, 2007.

JORGE, M. H. A.; EMERY, F. S.; SILVA, A. M. **Enraizamento de estacas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.)**. Corumbá, MS. EMBRAPA, Comunicado Técnico 56, 2006.

LEMOS, J. A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, A. A. L. M. R. R. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 55- 58, 2005.

LI, Y.; CRACKER, L. E.; POTTER, T. Effect of light on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). **Acta Horticulturae**, v. 426, p. 419-426, 1996.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 670- 673, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008, 544 p.

MARTINS, J. R. **Aspectos da germinação de sementes e influência da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.** 2006, 176f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, 2006.

MBATA, T. I.; SAIKIA, A. Antibacterial activity of essencial oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*. **Internet Journal of Food Safety**. v. 7, p. 15-19, 2005.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, p.579- 586, 2004.

NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BONO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential oil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 675- 678, 1999.

NWEZE, E. I.; EZE, E. E. Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 37, 2009. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/9/37>. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

OLIVEIRA, V. C. S., MOURA, D. M. S., LOPES, J. A. D., ANDRADE, P. P., SILVA, N. H., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1053-1059, 2008.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 624-632, jul.-set. 2007.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista 'Julio de Mesquita Filho'. Botucatu, SP, 2012.

ROCHA, M. F. A.; NAGAO, E. O.; INNECCO, R.; MEDEIROS FILHO, S. M.; MATTOS, S. H. Efeito do óleo essencial de alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.) na germinação de alfaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, julho, (Suplemento 2), 2002.

ROSSET, M.; ZAMARION, V. M.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J.; PINTO, J. P.; BARBOSA, A. M.; SOUZA, J. R. P. Estudo químico da fração diclorometânica do extrato de *Ocimum gratissimum* L. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 515- 520, 2005.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antifúngica de extratos vegetais e animais da região do Cariri. **Cadernos de Cultura e Ciências**, ano v, v. 1, n. 2, p. 53- 65, 2010.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA- FILHO, R. R.; MORGADO-DIAZ, J. A.; KOREHISA, M. P.; DIAS FILHO, B. P.; GARCIA, C. D.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S.; LOPES, A. H.; ALVIANO, C. S., NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n.2, p. 99-105. 2006.

CAPÍTULO 4- PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA E USO DE MARCADORES RAPD EM ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA.

RESUMO

As várias espécies que compõem o gênero *Ocimum* (Lamiaceae), conhecidas como manjericões e alfavacas, produzem óleos essenciais, que por suas propriedades terapêuticas, são muito utilizados na medicina popular. Há dificuldade na identificação correta dos exemplares, pelo fato de existirem muitas variedades e tipos químicos dentro das espécies. A alfavaca-roxa (*Ocimum* sp), apesar de assemelhar-se à alfavaca-cravo (*O. gratissimum*), possui uma peculiaridade, a de reverter sua coloração arroxeada para verde, dependendo da condição de sombreamento, enquanto a alfavaca-cravo possui estabilidade na coloração verde. Marcadores moleculares podem ser utilizados em estudos com plantas e animais, para selecionar característica de interesse, elucidação de aspectos moleculares de evolução, mapeamento e análise de similaridade e distância genética. O objetivo deste trabalho foi propor um protocolo para extração de DNA e detectar polimorfismos utilizando-se 19 *primers* através de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em estudos preliminares de variabilidade genética de exemplares de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa. O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal do Ceará (UFC). As plântulas foram obtidas através da semeadura em bandeja de sementes coletadas durante os meses de janeiro e fevereiro de 2011 das espécies cultivadas na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana (NEPAU). Foram coletadas 10 folhas jovens de plantas de cada espécie; para a extração de DNA, seguiu-se o protocolo de Doyle & Doyle, 1990, com modificações. As amostras de material vegetal (300 mg) foram maceradas em tubos tipo “eppendorf” com tampão de extração; os tubos foram agitados suavemente e incubados em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Para a remoção de proteínas e RNA, adicionou-se 700 µL de clorofórmio álcool isoamílico, centrifugou-se por 5 minutos a 13.000 rpm, transferindo-se o sobrenadante e adicionou-se RNase na concentração final de 40µg/mL. Incubou-se em banho-maria a 37°C por cerca de 30 minutos. Utilizou-se para precipitar o DNA, isopropanol gelado ao sobrenadante (1:1), e em seguida foram incubados em freezer a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos

a 13.000 rpm. Após a remoção cuidadosa do sobrenadante, lavou-se o precipitado com 500µL de etanol 70%, onde se procedeu a uma centrifugação em velocidade máxima por 5 minutos. Fez-se a ressuspensão do DNA em água mili-Q. Após a amplificação do DNA, através da PCR, os polimorfismos foram detectados através de gel de agarose, corados com brometo de etídio sendo visualizado sob luz UV. Os resultados mostraram que os *primers* utilizados promoveram visualização das bandas, sugerindo estudos complementares para estimar a variabilidade genética de populações de alfavaca.

Palavras-chave: *Ocimum*. *Primer*. Polimorfismo.

ABSTRACT

The species that comprising the genus *Ocimum* (fam. Lamiaceae) are known as alfavaca and basil. They produce essential oils which therapeutic properties; they are used as antimicrobial, diuretic, gastrointestinal disorders, among others disorders. There is difficulty in correct identification of specimens, because of there are many varieties and chemical types within species. The alfavaca-roxa, although it is similar to alfavaca-cravo, has a peculiarity. It is able to reverse its color purple to green, depending on the condition of shading, while alfavaca-cravo has green color stable. The objective of this work was to propose a protocol for DNA extraction and polymorphism detection using 19 RAPD primers through in preliminary studies of genetic variability of specimens of *Ocimum*. The experiment was conducted at the Seed Analysis Laboratory of the Federal University of Ceará (UFC). Seedlings were obtained from seeds collected during the months of January and February of cultivated species in the NEPAU/ UFC. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), which is based on the detection of DNA polymorphisms using PCR (Polymerase Chain Reaction) was used in this assay. Young leaves of 10 plants of each species were used for DNA extraction followed the protocol of Doyle & Doyle, 1990, with modifications. DNA was extracted from samples of plant material (300 mg) were macerated in tubes like "eppendorf" with extraction buffer, the tubes were shaken gently and incubated in a water bath at 65 °C for 30 minutes. For removal of proteins and RNA, was added to 700 mL of chloroform isoamyl alcohol, centrifuge at 5 minutes at 13.000 rpm, transferring the supernatant and add to the final concentration of RNase 40µg/mL. Incubated in a water bath at 37 °C for about 30 minutes. Was used to precipitate the DNA, the supernatant cold isopropanol (1:1), and then incubated at -20 ° C for 30 minutes. Centrifuged for 10 minutes at 13.000 rpm. After careful removal of supernatant, the precipitate washed with 500µL 70% ethanol, which makes a spin at full speed for 5 minutes. After DNA amplification by PCR, polymorphisms were detected by agarose gel containing ethidium bromide and observed on a UV transluminator. The results showed that the primers used promoted tape viewing, suggesting further studies to estimate the genetic variability of populations of alfavaca.

Key words: *Ocimum*. *Primer*. Polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

A Família Lamiaceae (=Labiatae) constitui-se como uma das maiores famílias do grupo das Angiospermas e uma das principais famílias que produzem óleos essenciais com propriedades terapêuticas (VIANNA, 2009). Várias espécies que compõem o gênero *Ocimum*, pertencem a essa família botânica, e são popularmente conhecidas como manjericões e alfavacas. Produzem óleos essenciais, que por suas propriedades terapêuticas, são muito utilizados na medicina popular como antimicrobiano, diurético e para tratar paralisia, doenças gastrointestinais, reumatismo, entre outras moléstias (EFFRAIM, 2001; LORENZI, MATOS, 2008). Podem ser citados três quimiotipos para a espécie, eugenol, timol e geraniol, sendo que seus compostos aromáticos têm grande importância na indústria farmacêutica, principalmente por conter eugenol (70-80%) e geraniol (80-90%) (EFFRAIM, 2001).

Há dificuldade na identificação correta dos exemplares, pelo fato da existirem muitas variedades e tipos químicos dentro das espécies. A alfavaca-roxa, apesar de assemelhar-se à alfavaca-cravo, possui uma peculiaridade, a de reverter sua coloração arroxeada para verde, dependendo da condição de sombreamento, enquanto a alfavaca-cravo possui estabilidade na coloração verde.

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos com plantas e animais, para selecionar característica de interesse, elucidação de aspectos moleculares de evolução, mapeamento e análise de similaridade e distância genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; LOPES et al., 2002).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996) um marcador molecular é todo e qualquer fenótipo de um gene expresso (isoenzimas) ou segmento de ácido desoxirribonucléico (DNA); os marcadores moleculares podem ser classificados de acordo com a metodologia usada para sua identificação; dessa forma, temos os marcadores RFLP ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, baseados em hibridização, e aqueles baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Destes, destacam-se RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), “que são métodos sensíveis, rápidos, relativamente simples e que revelam vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética de sequências-alvo” (LOPES et al., 2002).

A PCR foi uma técnica concebida por Kary Mullis, na década de 80, que causou uma grande revolução em estudos genético-moleculares, devido a sua facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade. A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento de DNA na presença da enzima DNA polimerase resistente ao calor (*Taq* polimerase). Ocorre o anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*). A reação ocorre no interior de um termociclador e envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

No método RAPD, o polimorfismo é revelado através da amplificação de locos usando-se *primers*, que quando submetidos a condições apropriadas de temperatura se anelam a sequências genômicas complementares (LOPES et al., 2002).

Ainda conforme os autores, a sequência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, assim, este pode encontrar várias regiões complementares e revelar vários locos. Os fragmentos amplificados podem ser separados em um gel de poliacrilaminada ou agarose, e visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo (EtBr) sob luz UV. “O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização dos dois *primers*” (LOPES et al., 2002).

A eletroforese se baseia na movimentação de moléculas através de uma matriz tamponada, que pode ser a agarose, uma forma refinada de Agar extraído de alga marinha; a agarose age como se fosse um filtro, onde os fragmentos menores da amostra de DNA migrarão mais rapidamente na direção do pólo positivo, enquanto os de maior comprimento migrarão em uma velocidade mais lenta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

No caso dos ácidos nucléicos, o grupo fosfato é responsável pela forte carga negativa em condições de pH neutro, fazendo com que os fragmentos migrem para o pólo positivo (anodo) durante a eletroforese. Como a carga elétrica líquida dos fragmentos é negativa, a separação ocorrerá com base no comprimento dos fragmentos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Pode ocorrer, durante o processo de isolamento e purificação de DNA vegetal, o isolamento conjunto de fenóis, alcalóides, além de polissacarídeos, que podem comprometer a extração do DNA e inibir a ação da enzima *Taq* polimerase utilizada na PCR (MOLINARI; CROCHEMORE, 2001).

Em geral, marcadores baseados em DNA têm vantagens importantes, tais como número ilimitado, variabilidade e independência dos efeitos ambientais (RICHARDSON et al., 1995).

Dessa forma, para a aplicação de técnicas moleculares, primeiramente é necessária a obtenção de metodologias adequadas para o isolamento de ácido desoxirribonucléico (DNA), com bom rendimento e qualidade devido ao fato de essas técnicas requererem material genético de boa qualidade (DANNER et al., 2011; WALDSCHMIDT et al., 1997).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi propor um protocolo para extração de DNA e detectar polimorfismos utilizando-se 19 *primers* através da técnica RAPD em estudos preliminares de variabilidade genética de exemplares de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal do Ceará (UFC). As plântulas foram obtidas através da semeadura em bandeja, a partir de sementes coletadas durante os meses de janeiro e fevereiro de 2011 das espécies cultivadas na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana-NEPAU, no Campus do Pici (UFC).

Após coleta e beneficiamento, as sementes foram colocadas para germinar em bandeja, para a produção das plântulas (Figuras 30 e 31). Para acelerar a germinação, o substrato foi regado, imediatamente antes da semeadura, com solução de nitrato de potássio (KNO_3) a 0,2%.



Figura 30. Plântulas de alfavaca-cravo. Fortaleza, CE, 2012.



Figura 31. Plântulas de alfavaca-rosa. Fortaleza, CE, 2012.

A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que se baseia na detecção de polimorfismos de DNA através de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi utilizada nesse ensaio. Foram coletadas 10 folhas jovens de plantas de cada espécie; para a extração de DNA, seguiu-se o protocolo de Doyle & Doyle, 1990, com modificações.

Para a maceração dos tecidos vegetais e rompimento das células, as folhas coletadas, (300 mg), foram maceradas em tubos tipo “ependorf” com tampão de extração. Os tubos foram agitados suavemente e incubados em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Para a remoção de proteínas e ácido ribonucléico (RNA), adicionou-se 700 µL de clorofórmio álcool isoamílico, centrifugou-se por 5 minutos a 13.000 rpm, transferindo-se o sobrenadante e adicionou-se RNase na concentração final de 40µg/mL.

Incubou-se em banho-maria a 37°C por cerca de 30 minutos, sendo utilizado para precipitar o DNA, isopropanol gelado ao sobrenadante (1:1), e em seguida foram incubados em freezer a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm.

Após a remoção cuidadosa do sobrenadante, lavou-se o precipitado com 500 μ L de etanol 70%, onde se procedeu a uma centrifugação em velocidade máxima por 5 minutos. Fez-se a ressuspensão do DNA em água mili-Q.

Após a amplificação do DNA, através da PCR, os polimorfismos foram detectados através de gel de agarose, corados com brometo de etídio sendo visualizado sob luz UV, sendo utilizados 19 *primers* no processo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo proposto nesse trabalho para a extração de DNA de plantas de alfavaca, de forma geral, proporcionou o isolamento de DNA de qualidade, estando apresentado de maneira simplificada no esquema abaixo:

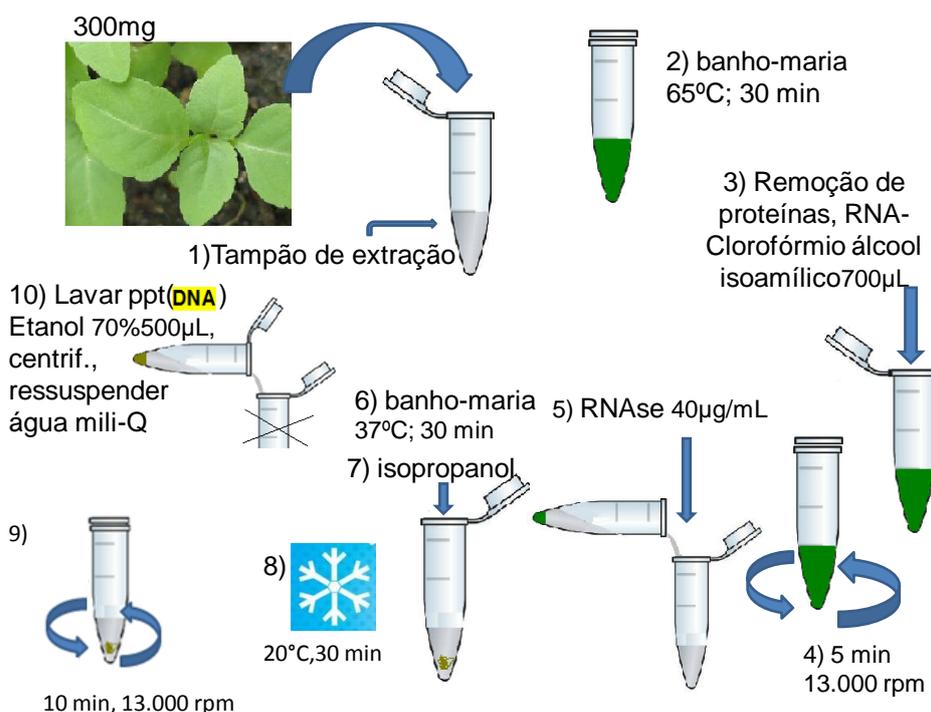


Figura 32. Esquema de extração de DNA de plantas de alfavaca.

A composição do tampão de extração utilizado e suas concentrações estão mostradas na Tabela 10:

Tabela 10. Composição do tampão de extração utilizado no estudo.

Componentes	Concentração Final
CTAB 5%	2%
NaCl 5M	1,4M
EDTA 0,5M	20mM
Tris-HCl 1M, pH 8,0	100mM
PVP 40 sólido	2%
B- mercaptoetanol	0,2%
Água destilada	

O CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) é um detergente catiônico que é utilizado para solubilizar as membranas celulares, formando um complexo com o DNA, favorecendo uma posterior precipitação desse material (WEISING et al., 1995).

A literatura mostra que a maioria dos protocolos de extração de DNA de plantas utiliza o método baseado no CTAB, com algumas modificações, de acordo com características da espécie (DANNER et al., 2011).

Após a amplificação do DNA, através da PCR, os polimorfismos foram detectados através de gel de agarose, corados com brometo de etídio sendo visualizado sob luz UV, sendo utilizados 19 *primers* no processo (Figura 33).

TESTE

Primers: OC 02, OC 03, OC 05, OC 07, OC 09, OC 11, OC 13, OC 15, OC 17, OC 19, OD 03, OD 05, OD 07, OD 09, OD 11, OD 13, OD 17, OD 19.

Genótipos: L1 e L2.

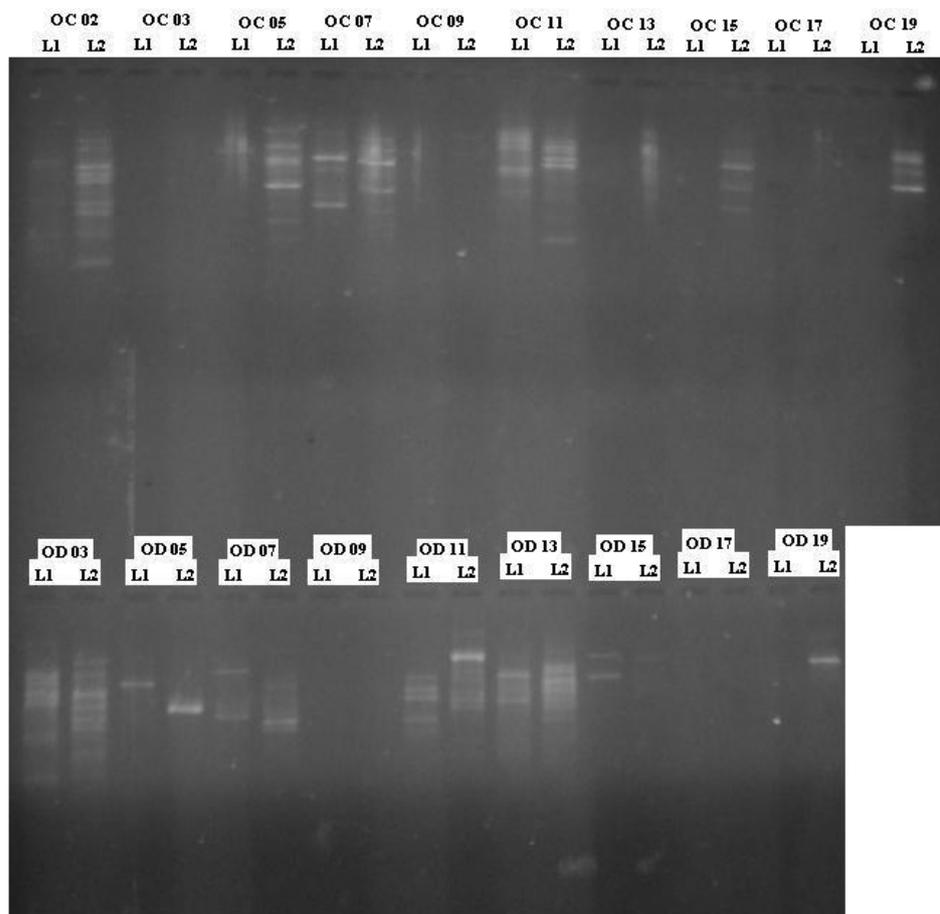


Figura 33. Eletroforese em gel de agarose mostrando polimorfismo para genótipos de alfavaca cravo (L1) e alfavaca-roxa (L2) utilizando diferentes *primers*. Fortaleza, CE, 2012.

Observa-se que o DNA obtido das folhas jovens maceradas com tampão CTAB mostrou-se amplificável pela PCR, tanto para a alfavaca-cravo como para a alfavaca-roxa.

A variação genética dentro e entre taxa é analisada pela presença ou ausência de uma banda, que é resultante de alterações na sequência de DNA em determinado locus (LIU; CORDES; 2004 citados por MENDES, 2007). Quando se utiliza marcadores moleculares, os polimorfismos detectados podem ocorrer devido a deleções na sequência de ligação do *primer* ao DNA, o que impede a amplificação do fragmento; e inserções ou deleções entre duas sequências de emparelhamento adjacentes, levando à amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos (Lacerda et al 2002 citado por MENDES, 2007).

Mendes, 2007, para a extração do DNA de folhas de *Thymus caespititius*, espécie pertencente à família Lamiaceae, utilizou o método descrito por Doyle e Doyle (1987) e modificado por Weising e colaboradores (1995). O gênero *Thymus* é um grupo taxonômico complexo de plantas aromáticas utilizadas em diferentes locais do mundo com vários fins. O protocolo foi adaptado para essa e outras espécies estudadas, macerou-se cerca de 1,5g de folhas em Nitrogênio líquido em 8ml de tampão CTAB. Clorofórmio/álcool isoamílico foi utilizado na proporção 24:1. Ao precipitado obtido adicionou-se 1ml de tampão TE (1mM EDTA pH 8,0, 10mM Tris-HCl). Para a precipitação do DNA total adicionou-se 0,1vol de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5vol de etanol puro a -20°C. Na análise molecular de 18 indivíduos de *T. caespititius*, com os 18 primers seleccionados, visualizou-se no total 241 bandas (MENDES, 2007).

4. CONCLUSÃO

Os *primers* utilizados promoveram visualização das bandas, sugerindo estudos complementares para estimar a variabilidade genética de populações de alfavaca, podendo-se utilizar o protocolo proposto por esse trabalho.

REFERÊNCIAS

- DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; BITTENCOURT, J. V. M.; CITADIN, I.; SACHET, M. R. Proposta de protocolo para extração de DNA de jaboticabeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 363-367, 2011.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12, p. 13-15, 1990.
- EFFRAIM, K. D.; JACKS, T. W.; SODIPO, O. A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. **African Journal Biomedical Research**. Borno State, Nigéria.v.6, p. 21-25, 2001.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em Análise Genética**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA/ Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia-CENARGEN, 1996. 220p.
- LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. **Biotecnologia** Ciência e Desenvolvimento, ano V, n. 29, p. 56-60, dezembro/janeiro, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008, 544 p.
- MENDES, M. D. S. **Caracterização química e molecular de espécie das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal**. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.
- MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA genômico de *Passiflora spp.* para análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23 n.2, p. 447-450. Jaboticabal, SP, 2001.
- RICHARDSON, T.; CATO, S.; RAMSER, J.; KAHL, G.; WEISING, K. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 18. p. 3798-3799, 1995.
- VIANNA, J. S. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) **Caracterização anatômica, morfológica e química de quimiotipos de *Ocimum gratissimum* Lineu**. 2009. 71 f. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.
- WALDSCHMIDT, A. M.; SALOMÃO, T. M. F.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n.3, p.421-423, 1997.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEIER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Press: Boca Raton, 1995. 220 p.

CAPÍTULO 5- NÚMERO CROMOSSÔMICO DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA OBTIDO POR ANÁLISE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

RESUMO

Devido à carência de estudos citogenéticos para as espécies do gênero *Ocimum* (Lamiaceae), esse trabalho teve como objetivo determinar o número de cromossomos de exemplares de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa. Utilizaram-se sementes de alfavaca cultivadas na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana/ NEPAU, da Universidade Federal do Ceará- UFC, Campus do Pici. Exemplares das plantas estão depositados no Herbário Prisco Bezerra- UFC. A partir de sementes germinadas em placas de Petri, raízes jovens foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2mM durante 24 horas a 4°C e fixadas em etanol absoluto/ ácido acético (3:1, v/v). Para o preparo das lâminas procedeu-se à hidrólise das raízes com ácido clorídrico (HCl) 5 N e esmagamento em uma gota de solução de ácido acético a 45%. As lamínulas foram retiradas a frio e as lâminas coradas com Giemsa a 2%. As melhores lâminas foram registradas através de fotomicroscopia. O número de cromossomos mitóticos encontrado para alfavaca-cravo foi $2n = 40$, o que está de acordo com o número registrado previamente na literatura. O mesmo valor foi detectado para a alfavaca-roxa, $2n = 40$ cromossomos.

Palavras-chave: *Ocimum*. Cromossomos. Hidrólise.

ABSTRACT

Due to the lack of cytogenetic studies for the genus *Ocimum* (Lamiaceae), in this study counting of the chromosomal number in alfavaca populations was performed. Seed lots of alfavaca were grown in the experimental area of the Teaching and Research of Urban Agriculture / NEPAU, Federal University of Ceará-UFC, Campus do Pici. Specimens of plants were deposited in the Herbarium Prisco Bezerra-UFC. Seeds of populations of alfavaca-cravo and alfavaca-roxa were collected, were put at room temperature to germinate in Petri dishes. After germinating, the root-tips were collected and pretreated with 2 mM 8-hydroxyquinoline for 24 hours at 4°C and fixed in absolute ethanol / acetic acid (3:1, v / v). For the preparation of the slides was performed the squashing technique, hydrolysis in hydrochloric acid (HCl) 5 N, acetic acid application 45% for 1min, squashing of the root-tips. The coverslips were removed from the cold and the slides were staining in 2% Giemsa. The best slides were recorded by light microscopy. The number of mitotic chromosomes found from alfavaca-cravo was $2n = 40$, which is in accordance with the number recorded previously in the literature. The same value was detected from alfavaca-roxa, $2n = 40$ chromosomes.

Keywords: *Ocimum*. Chromosomes. Hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

Composta por mais de 6900 espécies agrupadas em 258 gêneros, Lamiaceae (=Labiatae) destaca-se dentre as Angiospermas pelo seu potencial medicinal no qual se extraem substâncias que são usadas para o tratamento de diversos tipos de doenças (VIANNA, 2009; MBATA; SAIKIA, 2005). Entre os compostos majoritários dos óleos essenciais das espécies de Lamiaceae estão as substâncias fenólicas carvacrol, eugenol e timol, que possuem propriedades antimicrobianas (CLEFF et al., 2010; BAGAMBOULA; UYTENDAELE; DEBEVERE, 2004; LEMOS et al., 2005; ROLDÁN; DÍAZ; DURINGER, 2010) e mentol e linalol pertencentes à classe química dos terpenos, amplamente empregados na indústria de medicamentos com ação anestésica e antioxidante (BATTISTIN et al., 2011; PEANA et al., 2006).

De forma geral, os representantes de Lamiaceae podem ser reconhecidos pelos caules jovens quadrangulares, folhas dotadas de número elevado de tricomas glandulares, flores pentâmeras bilabiadas, além de aroma específico (JUDD et al., 2002; NAHAK; MISHRA; SAHU, 2011; PATON; HARLEY, HARLEY, 1999). Pertencem a essa família botânica várias espécies aromáticas distribuídas nos gêneros *Mentha*, *Lavandula*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Ocimum*, produtoras de óleos essenciais com valor econômico (JUDD et al., 2002).

As espécies que compõem o gênero *Ocimum* são conhecidas como manjericões e alfavacas (BRITO; PEREIRA; AMARAL, 2006), e consistem de 50 a 150 espécies de ervas e subarbustos (HILTUNEM; HOLM, 1992), amplamente distribuídas nas regiões tropical e subtropical da Ásia, África, América Central e América do Sul (PATON, 1992).

Ocimum gratissimum L., também conhecida como alfavaca-cravo, produz óleo essencial que pode ser dividido em três quimiotipos: eugenol, timol e geraniol; sendo que seus compostos aromáticos têm grande importância na indústria farmacêutica, principalmente por conter eugenol (70-80%) e geraniol (80-90%) (EFFRAIM, 2001). O eugenol confere ação antimicrobiana (IWALOKUN et al., 2003; LEMOS et al., 2005; NAKAMURA et al., 1999), propriedades anestésicas, hipotérmicas, miorrelaxantes e anticonvulsivas (DALLMIERI; CARLINI, 1981).

A alfavaca-roxa (*Ocimum* sp) não é muito citada na literatura. Assemelha-se à alfavaca-cravo, porém, possui uma peculiaridade, a de reverter sua coloração arroxeada para verde, dependendo da condição de sombreamento, enquanto a alfavaca-cravo possui estabilidade na coloração verde.

A nomenclatura botânica correta para as espécies e variedades de *Ocimum* da família Lamiaceae é de grande interesse, pois apesar de várias espécies e formas terem sido relatadas, apresentam, no geral, fecundação cruzada (alogamia) (ALMEIDA et al., 2004; BLANK et al., 2004; NATION; JANICK; SIMON, 1994), o que facilita a hibridação e a poliploidização de espécies do gênero, causando dificuldades na classificação e na determinação do relacionamento entre os táxons. Soma-se a isso o fato de existirem muitas variedades e tipos químicos dentro das espécies, que podem não se diferenciar morfológicamente, dificultando ainda mais a identificação taxonômica (SIMON et al., 1999). Vieira, Goldsbrough e Simon (2003) afirmam que as diferenças morfológicas entre as espécies podem ser tênues e tentativas de resolver esses problemas somente com morfologia são inócuos.

No caso de *O. gratissimum*, a espécie pode apresentar larga variedade morfológica, especialmente em relação ao indumento das folhas e inflorescências, o que torna difícil o uso desses caracteres como indicador taxonômico (VIEIRA et al., 2002). De acordo com Wetzel et al. (2002), a taxonomia de *Ocimum* não é bem entendida, sendo necessário que as complexas relações entre as espécies do gênero e sua alta variabilidade infra-específica em caracteres morfológicos, químicos e moleculares sejam caracterizados.

Como outras espécies do gênero, *O. gratissimum* é alógama (EHLERT; LUZ; INNECCO, 2004) e hibridiza-se facilmente (CORREA JÚNIOR, 1994), a exemplo de *O. gratissimum* x *O. sanctum* (SOBTI; PUSHPANGADAN, 1982). Vieira et al. (2001), por meio de estudos morfológicos, químicos e genéticos de 12 acessos de *O. gratissimum*, mostraram que os quimiotipos timol, eugenol e geraniol são geneticamente distintos. Paton (1992) argumenta que apesar dos estudos a respeito dos constituintes químicos dos óleos essenciais da espécie, a taxonomia infra-específica da mesma ainda é confusa. É importante combinar estudos morfológicos, químicos, moleculares e citogenéticos para identificação correta da espécie.

A determinação do número cromossômico é útil para estudos de caracterização citológica de uma espécie, podendo auxiliar em sua delimitação taxonômica (PEDROSA et al., 1999). Números similares de cromossomos sugerem

uma estreita relação de parentesco entre os taxa enquanto números diferentes de cromossomos implicam em uma maior distância de parentesco devido aos níveis elevados de isolamento reprodutivo desses taxa (FIRETTI-LEGGIERI et al., 2011).

Para o gênero *Ocimum*, as informações citogenéticas são escassas ou pouco divulgadas. Sobti e Pushpangadan (1982) propuseram uma classificação dos cromossomos de espécies do gênero *Ocimum* baseados em seu comprimento absoluto. O Grupo A seria caracterizado pelo comprimento de 3 µm a tamanhos maiores; enquanto o Grupo B, entre 2 µm e 2,5 µm e o Grupo C, cromossomos de 1,5 µm e menores. Estudos mostram que o número básico de cromossomos pode ser utilizado para agrupar evolutivamente as espécies de *Ocimum* em duas seções: Grupo do *Basilicum*, com $X= 12$ cromossomos e o Grupo do *Sanctum*, com $X= 8$, que constam de espécies diplóides e poliplóides (PUSHPANGADAN et al., 1975; SINGH; SHARMA, 1981; PUSHPANGADAN; SOBTI, 1982; KHOSLA, 1988 citados por SILVA, 2007).

Foi proposto para *O. gratissimum* os seguintes complementos cromossômicos e cariótipos (SOBTI; PUSHPANGADAN, 1982).

Tabela 11. Complementos cromossômicos e cariótipos de *Ocimum gratissimum* L.

Espécie caracterizada	Número de cromossomos	Fórmula cariotípica
Grupo do Sanctum $X= 8$		
<i>O. gratissimum</i> L. (Raça 1)	$2n = 40$	2 A + 18 B + 20 C
<i>O. gratissimum</i> L. (Raça 2)	$2n = 40$	26 B + 14 C

(Adaptado de SOBTI, PUSHPANGADAN, 1982).

Apesar da riqueza da diversidade de plantas com propriedades medicinais no Brasil, e da ampla utilização pelas populações da medicina natural há número reduzido de estudos sobre o tema. Tendo em vista a importância medicinal e escassez de informações sobre espécies de *Ocimum*, o objetivo desse trabalho consiste em caracterizar, através de análise citogenética convencional, o número de cromossomos de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L) e alfavaca-roxa (*Ocimum* sp), para fornecer subsídios que possam contribuir para o melhor entendimento dos espécimes, devido à grande importância econômica e medicinal que representam.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará- UFC, no período de setembro a novembro de 2011.

2.1 Material botânico

Foram utilizadas sementes coletadas durante os meses de janeiro e fevereiro de exemplares de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa cultivadas na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana (NEPAU), localizado na Universidade Federal do Ceará- UFC. Exemplares das plantas foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra da UFC sob o nº 49804, *Ocimum* sp e nº 49805, *Ocimum gratissimum*.

2.2 Contagem de cromossomos metafásicos

As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri, de 90 mm de diâmetro forradas com papel de filtro qualitativo (em duas camadas) umedecido com água destilada, sendo mantidas em temperatura entre 28-30°C. Quando as radículas apresentaram cerca de 1 cm de extensão, foram coletadas e pré-tratadas com 2 mM de hidroxiquinoleína por 24 h a 4°C. Em seguida foram fixadas em etanol absoluto/ ácido acético (3:1, v/v) por no mínimo 24 h e estocadas em -20°C na mesma solução. Para o preparo das lâminas as raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 5 N por 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e esmagadas em uma gota de solução de ácido acético a 45%. As lamínulas foram retiradas a frio e o material foi corado com Giemsa a 2% e foi feita a fixação da lamínula em Entellan (GUERRA, 1983; GUERRA; SOUZA, 2002).

Os números de cromossomos foram determinados através da análise de no mínimo 10 metáfases por indivíduo. As observações foram feitas em microscópio Axioscope A1 (Carl Zeiss ®), capacidade de aumento 100x.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A alfavaca-cravo e a alfavaca-roxa apresentaram $2n = 40$ em células metafásicas (Figuras 34 e 35). Houve dificuldade em realizar a contagem devido ao pequeno tamanho dos cromossomos. Omidbaigi et al. (2010) trabalhando com outra espécie do gênero, também relataram a dificuldade em contar os cromossomos de *O. basilicum* e mencionaram que a tarefa consome muito tempo, devido ao pequeno tamanho dos cromossomos e pela baixa frequência de metáfases em células de pontas de raiz de plântulas da espécie.

Sobti e Pushpangadan (1982) realizaram um comparativo dos números cromossômicos para espécies e variedades do gênero *Ocimum* L, os resultados estão apresentadas abaixo.

Tabela 12. Número de cromossomos de espécies e variedades do gênero *Ocimum*.

Espécie	2n
<i>O. canum</i> Sims	24
<i>O. canum</i> Sims	26
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>minima</i> Benth.	48
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>glabratum</i> Benth.	48
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>thyrsiflora</i> Benth.	49
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>purpurascence</i> Benth.	48
<i>O. americanum</i> L.	72
<i>O. sanctum</i> L (roxa)	32
<i>O. sanctum</i> L (verde)	32
<i>O. gratissimum</i> L	40

(Adaptado de SOBTI, PUSHPANGADAN, 1982).

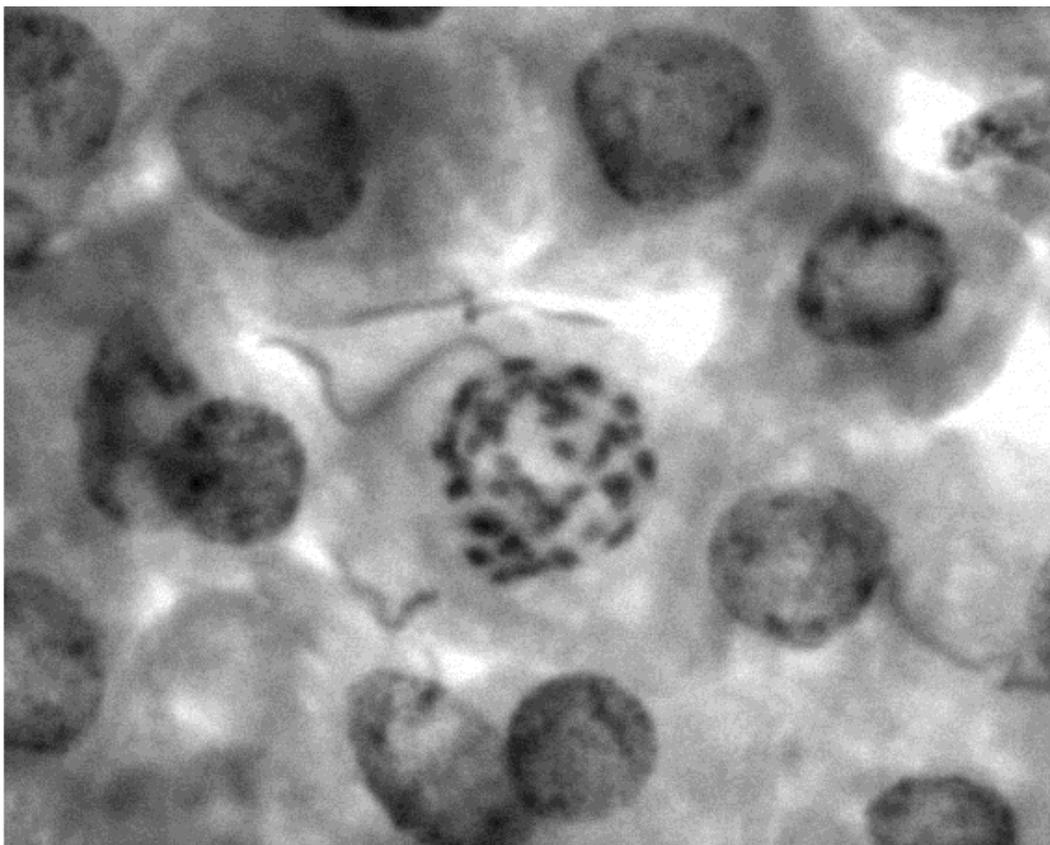


Figura 34. Cromossomos metafásicos de Alfavaca-cravo. Fortaleza, CE, 2012.

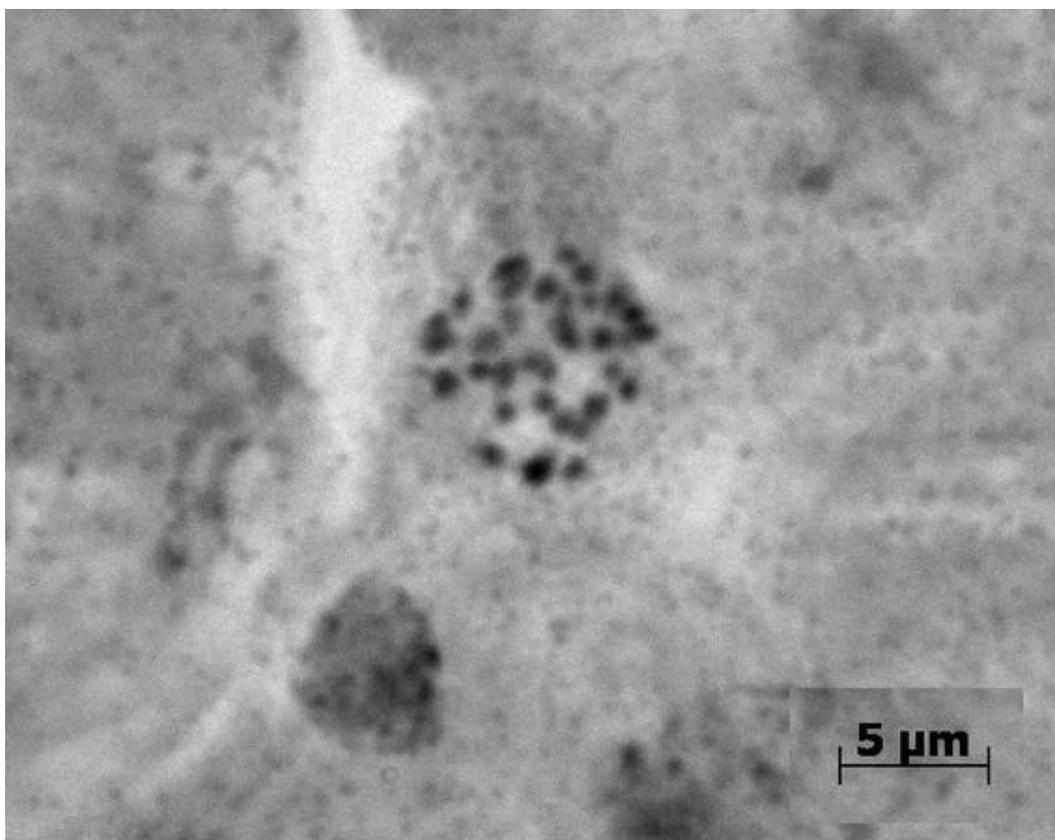


Figura 35. Cromossomos metafásicos de Alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012.
Barra: 5µm.

Análises meióticas documentaram variação no número de cromossomos em *Ocimum basilicum* L. na forma de $2n=72$ cromossomos em *O. basilicum* var. *citriodorum* e $2n=52$ na variedade *crispum*, bem como $x=12$ como número cromossômico básico para as variedades estudadas (MUKHERJEE; DATTA; MAITI, 2005).

Mukherjee e Datta, (2006) citam número cromossômico para *Ocimum tenuiflorum* (verde) ($2n=36$), *O. canum* ($2n=26$), *O. kilimandscharicum* ($2n=76$) e *O. gratissimum* ($2n=40$), o mesmo encontrado nesse estudo. Souza et al. (2005) citam que há grande variabilidade de *O. gratissimum* quanto ao número cromossômico ($2n = 40, 48$ e 64), enquanto para *O. selloi* os autores apresentaram um número cromossômico diplóide de 36 cromossomos.

Carović-Stanko et al. (2010) obtiveram dados cromossômicos que podem indicar que o número básico de cromossomos para espécies pertencentes a *Ocimum* é $x = 12$. Conforme os autores, esta sugestão implica que as espécies pertencentes ao clado *O. basilicum* são tetraplóides, enquanto as espécies pertencentes ao clado *O. americanum* são hexaplóides. Os autores especulam que o número básico de cromossomos para *O. gratissimum* poderia ser $x = 10$ e que as diferenças no tamanho do genoma e número de cromossomos em *Ocimum* indicam que a evolução de seus genomas foi acompanhada por deleção / amplificação e rearranjos cromossômicos e poliploidização.

4. CONCLUSÃO

O número cromossômico $2n = 40$ também foi encontrado nesse estudo para a alfavaca roxa, o que pode ser um indicativo de proximidade genética com a alfavaca-cravo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, O. S.; SILVA, A. H. B.; SILVA, A. B.; SILVA, A. B.; AMARAL, C. L. F. Estudo da biologia floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão (*Ocimum officinalis* L) visando o melhoramento genético. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 26, n. 3, p. 343- 348, 2004.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. A. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p.33-42, 2004.
- BATTISTIN, A.; FERMINO, M. H.; SILVEIRA, J. R. P.; GONÇALVES, R. S.; PASQUETTI, M. V.; SANTOS, A. C.; ROTTA, L. PAULETTI, G.; BARNI, V. Espécies de *Mentha* com propriedades medicinais, aromáticas e condimentares. **Circular Técnica da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária FEPAGRO**; Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio – Porto Alegre, 2011.
- BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.113-116, 2004.
- CAROVIC- STANKO, K.; LIBER, Z.; BESENDORFER, V.; JAVORNIK, B.; BOHANEC, B.; KOLAC, I.; SATOVIC, Z. Genetic relations among basil taxa (*Ocimum* L.) based on molecular markers, nuclear DNA content, and chromosome number. **Plant System Evol**, v. 285,p. 13-22, 2010.
- CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; XAVIERE, M.; SCHUCH, L. F.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, R. B. In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 116-123, 2010.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**, Jaboticabal-SP, 1994, 151 p.
- COSTA, V. B. S.; CORREA, P. G.; DUTRA, M. ; CHAGAS, M. G. S. ; PIMENTEL, R. M. M. Anatomia da folha e do caule de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) sob condições naturais. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009, Recife. Anais da IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.
- DALLMIERI, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113- 127, 1981.
- EFFRAIM, K. D.; JACKS, T. W.; SODIPO, O. A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. **African. Journal Biomedical Research**. Borno State, Nigéria, v.6, p. 21-25, 2001.

EHLERT, P. A. D.; LUZ, J. M. Q.; INNECCO, R. Propagação vegetativa de alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2004.

FIRETTI-LEGGIERI, F.; COSTA, I. R.; LOHMANN, L. G.; SEMIR, J.; FORNI-MARTINS, E. Chromosome Studies in Bignoniaceae (Bignoniaceae): The First Record of Polyploidy in *Anemopaegma*. **Cytologia**, v. 76, n. 2, p. 185- 191, 2011.

GUERRA, M. S. O uso de Giemsa em citogenética vegetal- comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciênc. Cult.** v. 35, p. 190-193, 1983.

GUERRA, M. S; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 131 p.

HILTUNEM, R.; HOLM, Y. **Basil**: the genus *Ocimum*. Editora Harwood Academic, 1999, 167 p.

IWALOKUN, R. A.; GBENLE, G. O.; ADEWOLE, T. A.; SMITH, S. I.; AKINSINDE, K. A.; OMONIGHEHIN, E. O. Effects of *Ocimum gratissimum* L essential oil at sub-inhibitory concentration on virulent and multi drug resistant *Shigella strains* from Lagos, Nigeria, **APMIS**. V. 111, n. 4, p. 477- 482, 2003.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS. P.; DONOGHUE, M. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. 2 ed Sinauer Associates, Inc. Sunderland. p 466-468, 470-473, 2002.

LEMOS, J. A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, A. A. L. M. R. R. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 55- 58, 2005.

MBATA, T. I.; SAIKIA, A. Antibacterial activity of essencial oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*. **Internet Journal of Food Safety**. v. 7, p. 15-19. 2005.

MUKHERJEE, M.; DATTA, A. K Secondary Chromosome Associations in *Ocimum* spp. **Cytologia**, v. 71, n. 2, p. 149- 152, 2005.

MUKHERJEE, M.; DATTA, A. K; MAITI, G. G. Chromosome Number Variation in *Ocimum basilicum* L. **Cytologia**, v. 70, n. 4, p. 455-458, 2005.

NAHAK, G.; MISHRA, R. C.; SAHU, R. K. Taxonomic distribution, medicinal properties and drug development potentiality of *Ocimum* (Tulsi). **Drug Invention Today**, v. 3, n. 6, p. 95- 113, 2011.

NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BONO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential oil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 675- 678, 1999.

NATION, G. R.; JANICK, J.; SIMON, E. J. Estimation of outcrossing in basil. **HortScience**, v. 27, n. 11, p. 1221-1222, 1992.

OMIDBAIGI, R.; MIRZAEI, M.; HASSANI, M. E.; MOGHADAM, M. S. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L) medicinal plant by colchicines treatment. **International Journal of Plant Production**, Gorgan, v. 4, n. 2, 2010.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 403- 435, 1992.

PATON, A.; R. M. HARLEY; M. M. HARLEY. *Ocimum*: an overview of relationships and classification. In **Medicinal and aromatic plants and industrial profiles**. The genus *Ocimum* (HOLM, Y., HILTUNEN, R. eds). Harwood Academic Press: Amsterdam, 1999. 167 p.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, p. 719-723, 2006.

PEDROSA, A.; GITAÍ, J.; SILVA, A. E. B.; FELIX, L. P.; GUERRA, M. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco- V. **Acta bot. bras.** v. 13, n. 1, p. 49-60, 1999.

PUSHPANGADAN, P.; SOBTI, S. N. Cytogenetical studies in the genus *Ocimum*. I: Origin of *O. americanum*, cytotaxonomical and experimental proof. **Cytologia**, v.47, p. 575–583. 1982.

ROLDAN, L. P.; DIAZ, J. G.; DURINGER, J. M. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 23, p. 451-461, 2010.

ROSSET, M.; ZAMARION, V. M.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J.; PINTO, J. P.; BARBOSA, A. M.; SOUZA, J. R. P. Estudo químico da fração diclorometânica do extrato de *Ocimum gratissimum* L. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 515- 520, 2005.

SILVA, A. B. **Biologia Reprodutiva e Citogenética de Alfavaca do Campo (*Ocimum campechianum* Mill.)**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista, 2007.

SIMON, J. E.; MORALES, M. R.; PHIPPEN, W. B.; VIEIRA, R. F.; HAO, Z. Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: JANICK, J. **New crops and new uses: biodiversity and agricultural sustainability**. Alexandria: ASHS Press, 1999. P 12- 159.

SOBTI, S.; PUSHPANGADAN, P. Studies in the genus *Ocimum*: cytogenetics, breeding and production of new strains of economic importance. In: **Cultivation and Utilization of Aromatic Plants** (ATAL, C.K., KAPUR, B.M., eds.), Regional Laboratory Council of Scientific and Industrial Research, Jammu-Tawi, p. 457-472, 1982.

SOUZA, L. G. R.; JACOBINA, U. P.; SANTOS, J. T.; BRITO, R. O.; SILVA, R. B.; SILVA-JUNIOR, J. C.; PEREIRA, D. G. **Caracterização citogenética de *Ocimum selloi* benth (Lamiaceae) no município de Jequié (BA)**. Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP, 7 a 10 de setembro de 2005.

VIANNA, J. S. **Caracterização anatômica, morfológica e química de quimiotipos de *Ocimum gratissimum* Lineu**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2009.

VIEIRA, F. V.; GRAYER, R. J.; PATON, A.; SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287- 304, 2001.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATON, A.; SIMON, J. E. Uso de marcadores químicos no estudo da diversidade genética de *Ocimum gratissimum* L **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, supl., p. 126-129, 2002.

VIEIRA, R. F.; GOLDSBROUGH, P.; SIMON, J. E. Genetic diversity of basil (*Ocimum* spp.) based on RAPD markers. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v. 128, n. 1, p. 94- 99, 2003.

WETZEL, S.; KRÜGER, H.; HAMMER, K.; BACHMANN, K. Investigations on morphological, biochemical and molecular variability of *Ocimum* L. species. P. 183-186. In: **Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants** (JOHNSON, C. B.; FRANZ, C. eds). Haworth Herbal Press, New York, 2002.

CAPÍTULO 6- ESTUDOS DE VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN E DAS TÉTRADES DE ALFAVACA-CRAVO E ALFAVACA-ROXA POR COLORAÇÃO COM CARMIM ACÉTICO

RESUMO

O estudo dos grãos de pólen é fundamental em taxonomia, melhoramento genético e estudos de relacionamento entre os táxons. As espécies do gênero *Ocimum* (família Lamiaceae), conhecidas como manjericões e alfavacas, produzem óleos essenciais amplamente utilizados pelas populações por suas propriedades terapêuticas. Apesar da grande utilização das plantas medicinais pelas populações, o cultivo ainda é muito incipiente, muitas vezes a identificação das espécies coletadas não é feita de maneira correta, além do que há escassez de estudos envolvendo plantas medicinais no território brasileiro. Visando contribuir com informações sobre aspectos reprodutivos do gênero *Ocimum*, o presente trabalho tem como objetivo determinar a viabilidade dos grãos de pólen e das tétrades de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa. Para estimar a viabilidade polínica, as anteras foram maceradas sobre lâminas e coradas com carmim acético a 2%. Foram avaliadas 5 lâminas para cada espécie e considerados como pólen viável os corados, e como inviáveis os não corados, utilizando-se o aumento de 40x. Para o estudo da viabilidade das tétrades foi utilizado o mesmo procedimento, porém, utilizou-se para a observação e contagem, uma antera por flor e utilizando-se 6 lâminas para cada espécie, em um total de 114 tétrades para alfavaca-cravo e 113 para alfavaca-roxa. Os resultados foram expressos em porcentagem. Foram observadas altas porcentagens de viabilidade de grãos de pólen e tétrades nas espécies estudadas, além de apresentarem tamanhos similares.

Palavras-chave: Acetólise. Antera. Lamiaceae.

ABSTRACT

Study of pollen grains is essential in taxonomy, genetic improvement and studies of relationships among taxa. *Ocimum* belonging to family Lamiaceae is commonly used in folk medicines to treat different diseases. Despite its importance, there is lack of information on its biology. The objective of this work was to study the viability of the pollen and tetrads of *O. gratissimum* L (alfavaca-cravo) and *Ocimum* sp (alfavaca-roxa). To verify pollen viability, anthers were macerated on a slide and pollen staining was done with 2% acetic carmine. Stained pollen grains were counted to estimate pollen viability were evaluated for each species. To study tetrad viability we used the same procedure. The results were expressed in percentage. Showed high percentages of viability of pollen grains and tetrads in the studied species, besides having similar sizes.

Keywords: Acetolysis. Anthers. Lamiaceae.

1. INTRODUÇÃO

As espermatófitas compreendem plantas vasculares produtoras de sementes, que apresentam heterosporia e gametófito reduzido (SADAVA et al., 2011). A geração gametofítica no interior da antera é representada pelos grãos de pólen ou gametófitos masculinos imaturos (DETTKE; SANTOS; 2011).

A formação do grão de pólen se inicia quando as células precursoras aumentam de volume e sofrem meiose. Cada célula, após a primeira divisão meiótica, origina duas células haploides que juntas formam as díades. Após a segunda divisão, formam-se quatro micrósporos, que juntos formam as tétrades e, após diferenciação, originam os grãos de pólen (ARAÚJO; BRUCKNER, 2008; DETTKE; SANTOS; 2011).

Os grãos de pólen variam consideravelmente em tamanho e forma, desde menos de 20 μm até alcançar valores superiores a 250 μm em diâmetro. Muitas famílias, gêneros e espécies de plantas podem ser identificados somente pelos seus grãos de pólen, baseando-se em características como tamanho, número e tipo de abertura através das quais os tubos polínicos crescem, estrutura e ornamentação da parede (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; GASPARINO; CRUZ-BARROS, 2006) e a unidade polínica, onde os grãos de pólen podem se apresentar isolados (mônade), ou agrupados em díades, tétrades, políades (GASPARINO; CRUZ-BARROS, 2006). A viabilidade do grão de pólen, por sua vez, pode ser testada através da capacidade de germinação, bem como pela presença de citoplasma (ABREU et al., 2008).

Dettke e Santos (2011) identificaram espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) através das características morfológicas e histoquímicas de antera e grão de pólen de espécies nativas da Região Sul do Brasil, contribuindo para as análises taxonômicas e sistemáticas do grupo. Nos estudos de Azevedo et al. (2011), características morfológicas do grão de pólen foram úteis na diferenciação de espécies do gênero *Centrosema* (Fabaceae). Moura et al. (2004), por sua vez, constataram variada morfologia polínica nas espécies coletadas de ecossistemas de várzea e igapó, contribuindo para ampliar os estudos botânicos de espécies da Amazônia Central.

Comportamento meiótico e viabilidade dos grãos de pólen foram estudados por Praça-Fontes e Viccini (2011) em espécies medicinais do gênero

Lippia (Verbenaceae) e por Corrêa et al. (2005), em Araceae, visando proporcionar subsídios para o estudo taxonômico dos grupos. Enquanto Sacoman et al. (2011) analisaram os efeitos da toxicidade da poluição atmosférica no material genético e a viabilidade polínica de *Tradescantia pallida*, Piccinini et al. (2010) estudaram a estimativa da viabilidade polínica de *Eragrostis plana* visando contribuir com informações sobre a biologia reprodutiva dessa gramínea invasora.

O fato da morfologia polínica não estar sujeita às alterações ambientais sendo desta forma bastante estável, torna o estudo dos grãos de pólen altamente eficaz à Taxonomia Vegetal colaborando para o entendimento das relações entre os diferentes grupos de plantas, na tentativa de traçar as linhas evolutivas entre os táxons (GASPARINO; CRUZ-BARROS, 2006).

Assim, o estudo e a caracterização dos grãos de pólen são fundamentais em estudos taxonômicos, melhoramento genético, filogenia e paleobotânica (NUNES; BUSTAMANTE; MITTELMANN, 2012).

Lamiaceae é uma importante família botânica que possui vários representantes com propriedades medicinais (ALMEIDA, 2002; JUDD et al., 2002); entre os gêneros que compõem a família destaca-se *Ocimum*, cujas espécies produzem óleos essenciais muito utilizados na medicina popular no tratamento de doenças e na utilização na indústria de fitoterápicos, perfumes e cosméticos (VIEIRA, 2009).

No Brasil, cerca de 20% de nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1996 citado por MARINHO et al., 2007).

Apesar da grande utilização das plantas medicinais pelas populações, o cultivo ainda é muito incipiente e muitas vezes nem a identificação das espécies coletadas é feita de maneira correta (BLANK et al., 2003). Nas condições brasileiras, a maioria das plantas medicinais ainda não é cultivada, e sim, coletada através do extrativismo, e das que são cultivadas, grande parte encontra-se no estágio inicial de domesticação (CHAVES, 2002).

Quanto ao gênero *Ocimum* não há muitos trabalhos disponíveis (CHAVES, 2002), além disso, há dificuldades na classificação das espécies, sendo a taxonomia e nomenclatura bastante confusa (PATON; HARLEY; HARLEY, 1999), devido apresentarem grande variabilidade morfológica (VIEIRA et al., 2002) e muitos quimiotipos (BIASI et al., 2009). Além disso, ocorre com frequência a hibridização e a poliploidização de espécies do gênero, o que dificulta ainda mais a classificação e a determinação do relacionamento entre os táxons (ALMEIDA et al., 2004).

Dessa forma, conhecer os aspectos da biologia reprodutiva das espécies é importante não só para subsidiar programas de melhoramento, mas também para compreender o processo de domesticação das espécies (FACANALI et al., 2009).

O presente trabalho tem como objetivo estimar a viabilidade das tétrades e dos grãos de pólen de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) e alfavaca-roxa (*Ocimum* sp), visando ampliar o conhecimento acerca de aspectos reprodutivos de espécies medicinais pertencentes à família Lamiaceae.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo da viabilidade dos grãos de pólen e das tétrades por coloração foi realizado em julho e agosto de 2012 no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará- UFC. Foram coletadas inflorescências de diferentes indivíduos de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) e alfavaca-roxa (*Ocimum* sp) cultivados na área experimental do Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana- NEPAU/ UFC. Os testemunhos botânicos foram depositados no Herbário Prisco Bezerra da UFC registradas sob nº 49804 e nº 49805, para *Ocimum* sp e *Ocimum gratissimum*, respectivamente.

As inflorescências, em diferentes fases de desenvolvimento, foram coletadas pela manhã e fixadas no local de coleta, em etanol: ácido acético (3:1) durante um período de 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foram colocadas em álcool 70% e mantidas sob refrigeração até o momento do ensaio.

O número de grãos de pólen por flor e a estimativa da viabilidade polínica foram determinados a partir de botões florais em pré-antese. As anteras (quatro por botão) foram dissecadas com auxílio de microscópio estereoscópico e os grãos de pólen foram transferidos para lâminas de microscopia. A análise da viabilidade dos grãos de pólen foi realizada segundo a técnica de coloração de Medina & Conagin (1974), o qual consiste no esmagamento de anteras em carmim acético a 2% e observação em microscópio óptico.

Foram avaliadas 5 lâminas para cada espécie. Foram examinados e contados como pólen viável os corados, e como inviáveis os não corados, utilizando-se o aumento de 40x. Foram contados, no total, 6.130 grãos de pólen de alfavaca-cravo e 4.452 de alfavaca-roxa.

Com os números obtidos calculou-se a porcentagem de viabilidade, considerando-se como 100% o total de grãos contados:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{nº de grãos de pólen corados}}{\text{Nº de grãos de pólen total}} \times 100$$

Para o estudo da viabilidade das tétrades foi utilizado o mesmo procedimento, porém, utilizou-se para a observação e contagem, uma antera por flor. Foram utilizadas 6 lâminas para cada espécie e quantificou-se, em cada lâmina, o total das tétrades, sendo 114 para alfavaca-cravo e 113 para alfavaca-roxa, sendo os resultados da viabilidade expressos em porcentagem.

As observações e captura das imagens dos grãos de pólen e das tétrades foram feitas através de microscópio óptico Axioscope A1 (Carl Zeiss ®), capacidade de aumento 100x, acoplado à câmera fotográfica digital (Figura 36).

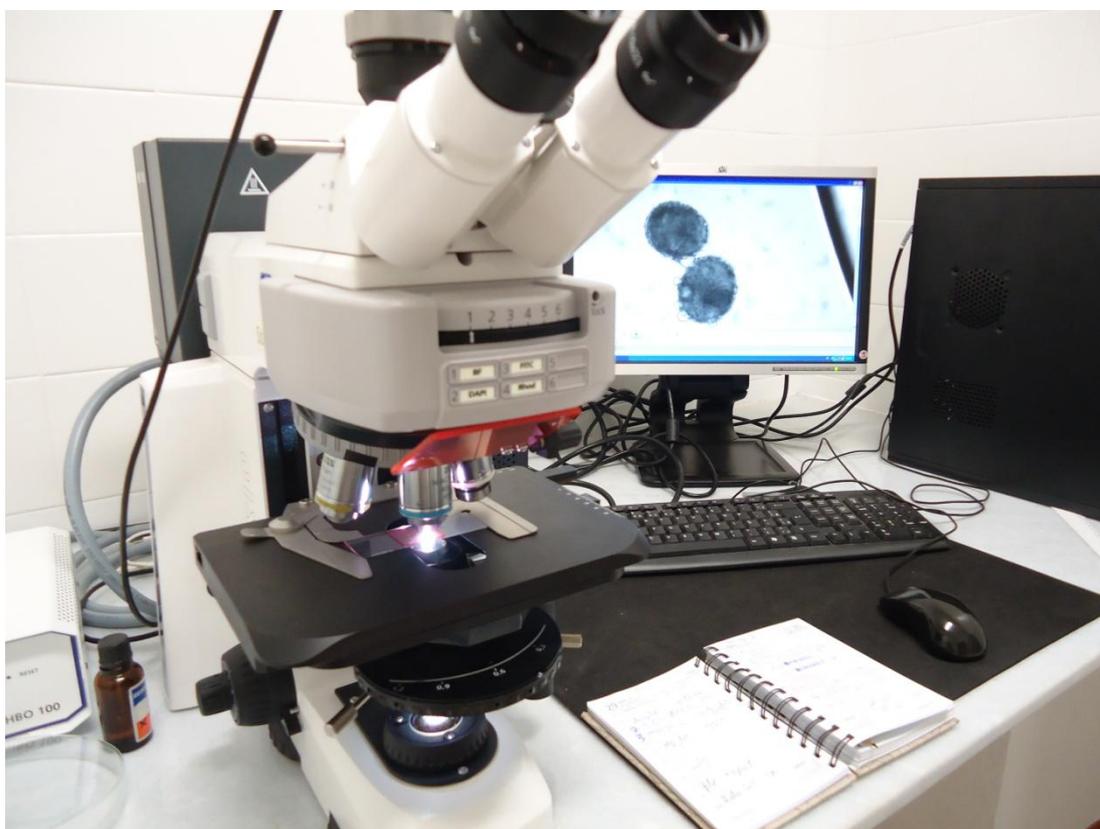


Figura 36. Observações de grãos de pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 13. Viabilidade média de grãos de pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.

Espécie	Nº total	Média de viabilidade do pólen (%)
Alfavaca-cravo	6.130	99,71
Alfavaca-roxa	4.452	98,47

Tabela 14. Viabilidade média das tétrades de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.

Espécie	Nº total	Média de viabilidade das tétrades (%)
Alfavaca-cravo	114	54,66
Alfavaca-roxa	113	74,86

Na avaliação da viabilidade polínica, pode-se perceber que houve alta taxa da viabilidade dos grãos de pólen para as duas espécies. Quanto maior a viabilidade, maior o índice de fertilização (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002). Piccinini et al. (2010), na avaliação da estimativa da viabilidade dos grãos de pólen de capim-annoni (*Eragrostis plana*) pelo método de coloração com orceina acética 2%, observaram que todos os indivíduos analisados apresentaram 100% de viabilidade, não encontrando grãos de pólen não corados.

Almeida et al. (2004), analisando a viabilidade dos grãos de pólen de alfavacão (*O. officinalis* L.) obtiveram porcentagem média de viabilidade de 97% na pré antese, 97% na antese e 98% na pós-antese.

O corante carmim acético possui a característica de impregnar parede, citoplasma e o núcleo de células com potencial embriogênico (SACOMAN et al., 2011). Os grãos de pólen considerados viáveis são os que não possuem alterações estruturais, apresentam citoplasma totalmente corado e distribuídos homogeneamente (TWELL, 1995 citado por SACOMAN et al., 2011).

Quanto à viabilidade das tétrades, o resultado mostra que as porcentagens ficaram acima de 54%.

Corrêa et al. (2005) verificaram altas percentagens tanto de tétrades normais (93,1 a 100%) como de grãos de pólen viáveis (81,6 a 100%) em estudos com 17 espécies pertencentes à família Araceae, sendo que em todas as espécies, sem exceção, a média dos grãos de pólen viáveis foi significativamente superior à de inviáveis.

De acordo com os autores, uma alta percentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletiriam diretamente um processo meiótico regular.

Observa-se nas Figuras 37 e 38 amostras de grãos de pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.

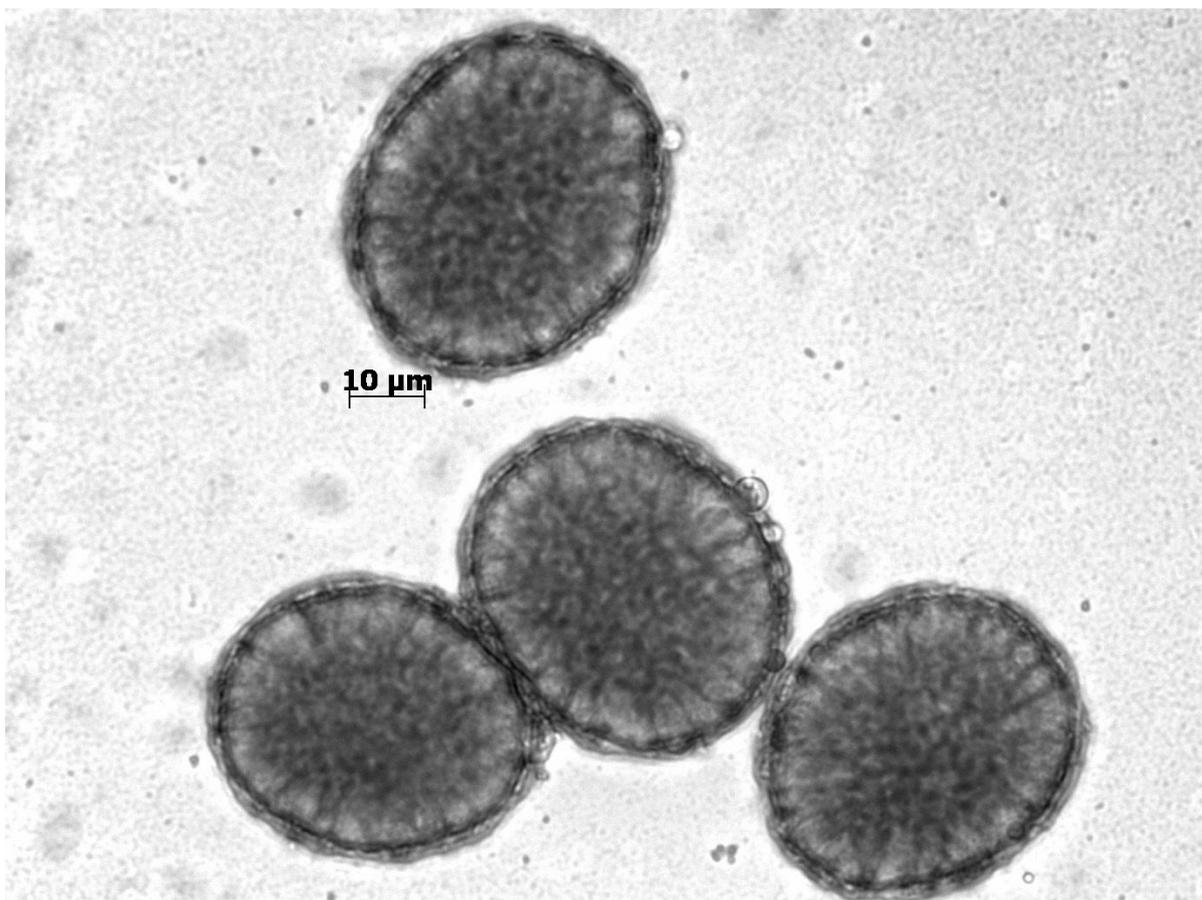


Figura 37. Grãos de pólen corados com carmim acético 2% de alfavaca-cravo. Fortaleza, CE, 2012.

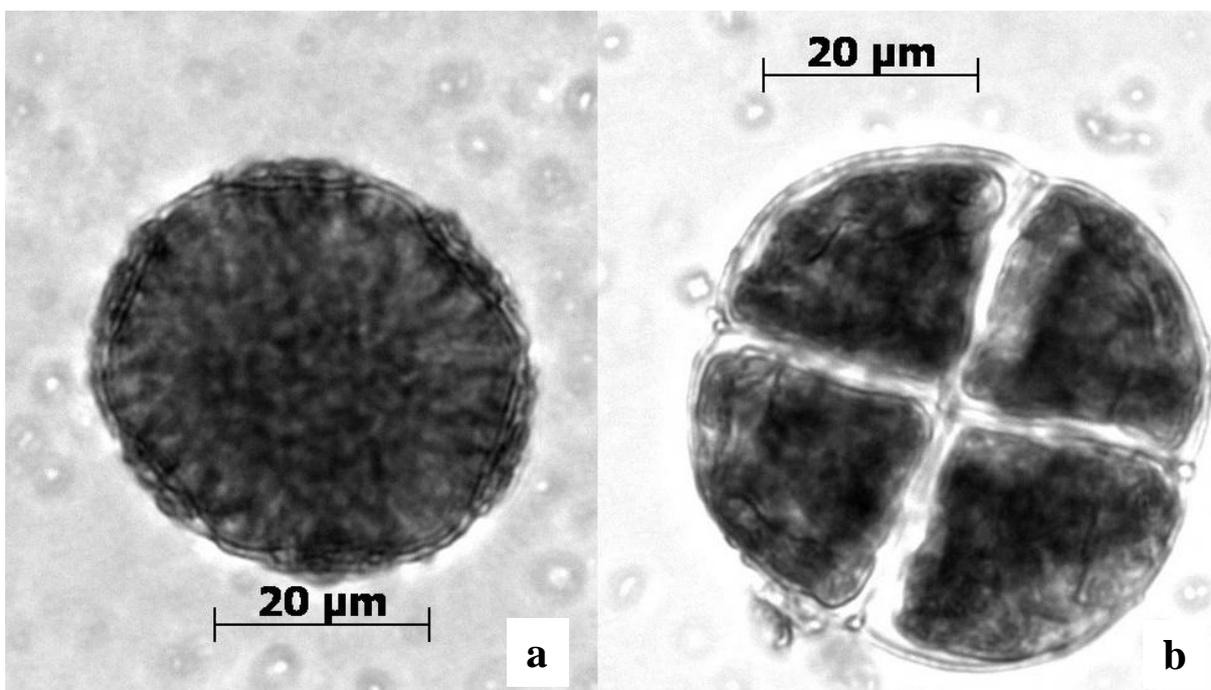


Figura 38. Grão de pólen e tétrade corados com carmim acético 2% de alfavaca-roxa. Fortaleza, CE, 2012.

4. CONCLUSÃO

Foram observadas altas porcentagens de viabilidade de grãos de pólen e das tétrades em alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.

REFERÊNCIAS

- ABREU, T. B.; NUNES, G. H. S.; DANTAS, M. S. M.; COSTA FILHO, J. H.; COSTA, G. G.; ARAGÃO, F. A. S. Fenologia floral, viabilidade do grão de pólen e receptividade do estigma do meloeiro. **Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.**, v. 52, p. 43-46, 2008.
- ALEXANDER, M. P. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v.55, p.13-8, 1980.
- ALMEIDA, M. A. Z. **Resposta do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) à aplicação de preparações homeopáticas**. 2002. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- ALMEIDA, O. S.; SILVA, A. H. B.; SILVA, A. B.; SILVA, A. B.; AMARAL, C. L. F. Estudo da biologia floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão (*Ocimum officinalis* L) visando o melhoramento genético. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 26, n. 3, p. 343- 348, 2004.
- ARAÚJO, R. C.; BRUCKNER, C. H. Biologia reprodutiva de fruteiras. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.) **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. p. 13- 38.
- AZEVEDO, C. F.; BRUNO, R. L. A.; ALMEIDA, V. P.; QUIRINO, Z. G. M.; FELIX, L. P. Caracterização morfológica dos órgãos reprodutivos de duas espécies de *Centrosema* (Fabaceae). **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 4, n. 2, p. 42- 52, 2011.
- BIASI, L. A.; MACHADO, E. M.; KOWALSKI, A. P. J.; SIGNOR, .; ALVES, M. A.; LIMA, F. I.; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L. C.; SCHEER, A. P. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, n. 27, n. 1, p. 35- 39, 2009.
- BLANK A. F.; ARRIGONI-BLANK M. F.; SILVA P. A.; TORRES M. E. R.; MENEZES H. J. A. Efeitos de composições de substratos na produção de mudas de quióio (*Ocimum gratissimum* L.) **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, p. 105-108, 2003.
- CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte**. 2002. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônomicas. Botucatu, 2002.
- CORRÊA, M. G. S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J. B.; ÁVILA, P. F. V.; BUSATO, G. R.; LEMES, J. S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta bot. bras.** v. 19, n. 2, p. 295-303, 2005.
- DETTKE, G. A.; SANTOS, R. P. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 48-74, abr. 2011.

FACANALI, R.; CAMPOS, M. M. S.; POCIUS, O.; MING, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; MARQUES, M. O. M. Biologia reprodutiva de populações de *Ocimum selloi* Benth. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.2, p.141-146, 2009.

FERREIRA, D. F. **SISVAR- Sistema de análise de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.1. Lavras: UFLA, 2000.

GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Palinologia** (apostila). Instituto de Botânica, São Paulo, 2006. 9p.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS, P.; DONOGHUE, M. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. 2 ed Sinauer Associates, Inc. Sunderland. p 466-468, 470-473, 2002.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em Medicina Veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MOURA, C. O.; ABSY, M. L.; SANTOS, F. A. R.; MARQUES-SOUZA, A. C. Morfologia polínica de espécies de várzea e de igapó da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 1, p. 15- 19, 2004.

NUNES, R. C.; BUSTAMANTE, F. O.; MITTELMANN, A. MORPHOLOGY AND POLLEN VIABILITY OF *Lolium multiflorum* Lam. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 180 -188, mar./abr., 2012.

PATON, A.; R. M. HARLEY; M. M. HARLEY. *Ocimum*: an overview of relationships and classification. In **Medicinal and aromatic plants and industrial profiles**. The genus *Ocimum* (HOLM, Y., HILTUNEN, R. eds). Harwood Academic Press: Amsterdam, 1999. 167 p.

PICCININI, F.; TEDESCO, B. S.; PEREZ, N. B.; BORTOLY, E. D. Estimativa da viabilidade polínica de *Eragrostis plana* Nees. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas 19 a 23 de julho de 2010 - Centro de Convenções - Ribeirão Preto, SP.

PRAÇA-FONTES, M. M.; VICCINI, L. F. Estudo meiótico e viabilidade do pólen de três espécies de *Lippia* (Verbenaceae) da Cadeia do Espinhaço- MG. In: **XI Encontro Latino Americano de Pós-graduação**, XV INIC, VINICJr. As contribuições da Ciência para a Sustentabilidade do Planeta, 2011, São José dos Campos -SP. XI Encontro Latino Americano de Pós-graduação, XV INIC, VINICJr. As contribuições da Ciência para a Sustentabilidade do Planeta, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

SACOMAN, N. N.; SILVA, M. L.; SILVA, G. M.; PEREIRA, S. L. S.; CARVALHO, I. F.; SISENANDO, H. A.; HUNHOFF, V. L. Teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida* e de viabilidade polínica aplicado ao biomonitoramento da qualidade do ar no município de Tangará da Serra- MT. **Uniciências**, v. 15, n. 1, 2011.

SADAVA, D.; HILLIS, D. M.; HELLER, H. C.; BERENBAUM, M. **Life: the science of Biology**. Ninth Edition, W. H. Freeman, 2011.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* degener). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.26, n.6, p.1209-1217, nov./dez., 2002.

TWELL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. *Protoplasma*, **Leicester**, v. 187, n. 4, p. 144-154, 1995.

VIEIRA, P. R. N. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente a cepas de *Candida* spp e *Microsporum canis***. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2009.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATONB, A.; SIMON, J. E. Uso de marcadores químicos no estudo da diversidade genética de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 126-129, 2002.

APÊNDICES

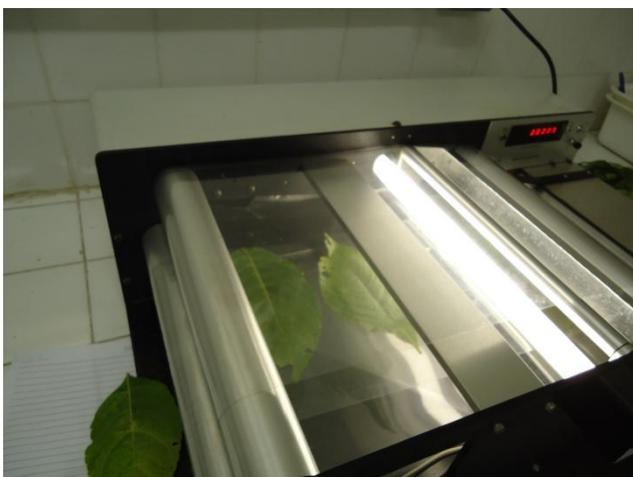
1. Etapas do Transplântio das mudas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa. Pág. 179.
2. Ambiente externo e em casa de vegetação. Pág. 179
3. Determinação de área foliar através de integrador de área foliar. Detalhe das folhas de alfavaca-cravo cultivadas em pleno sol. Pág. 180
4. Estudo da viabilidade do pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa no Laboratório de Citogenética (UFC). Inflorescências fixadas em etanol: ácido acético 3:1. Pág. 180
5. Lâminas prontas para serem observadas em microscópio. Pág. 181
6. Sementes de Alfavaca-cravo (L2) e Alfavaca-roxa (L3). Pág. 181
7. Textura da semente de Alfavaca-cravo. Pág. 182



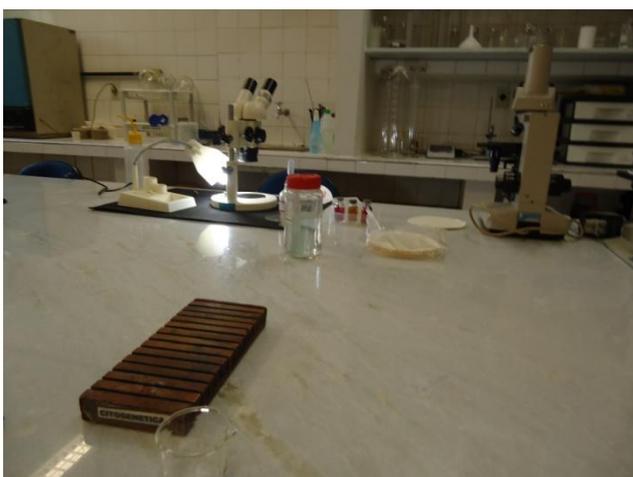
Anexo 1. Etapas do Transplântio das mudas de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa.



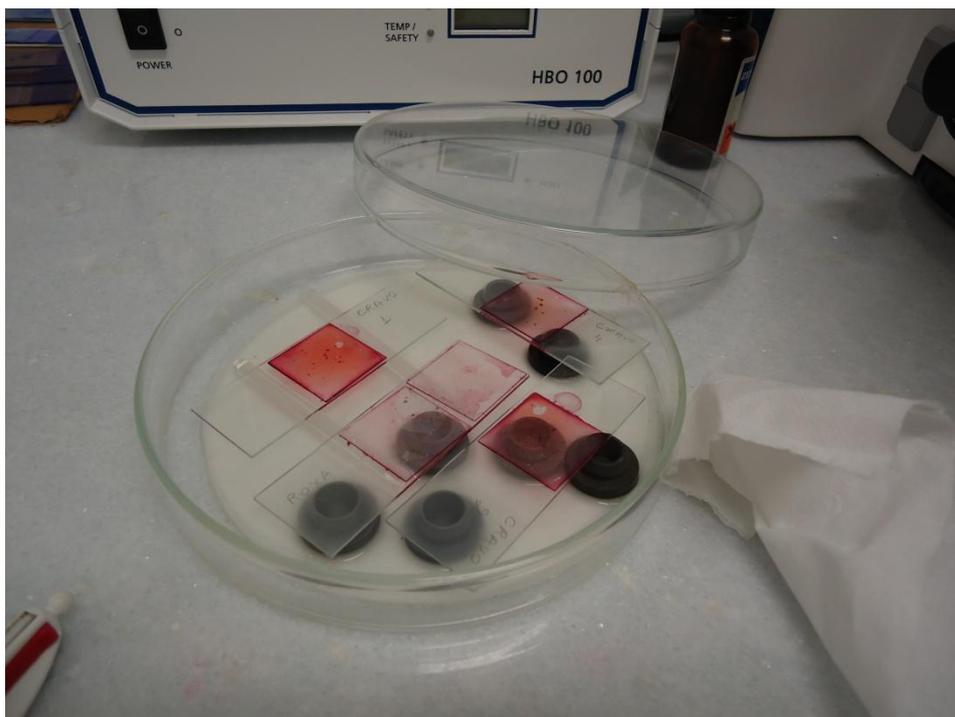
Anexo 2. Ambiente externo e em casa de vegetação.



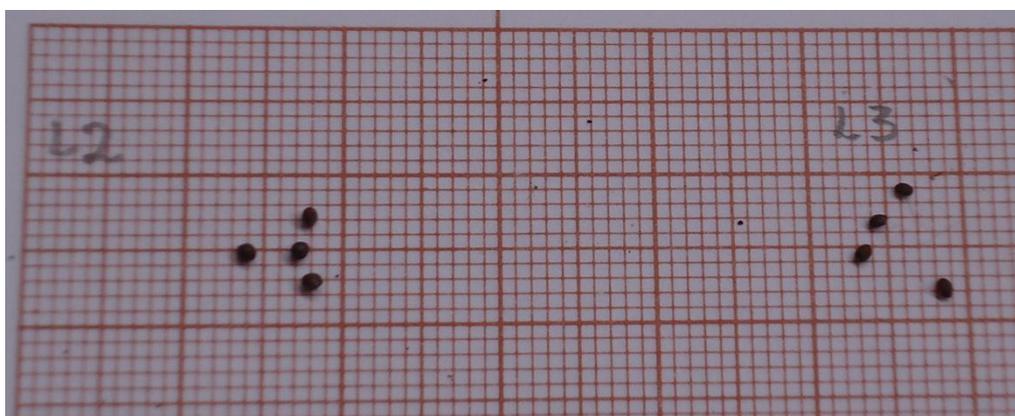
Anexo 3. Determinação de área foliar através de integrador de área foliar. Detalhe das folhas de alfavaca-cravo cultivadas em pleno sol.



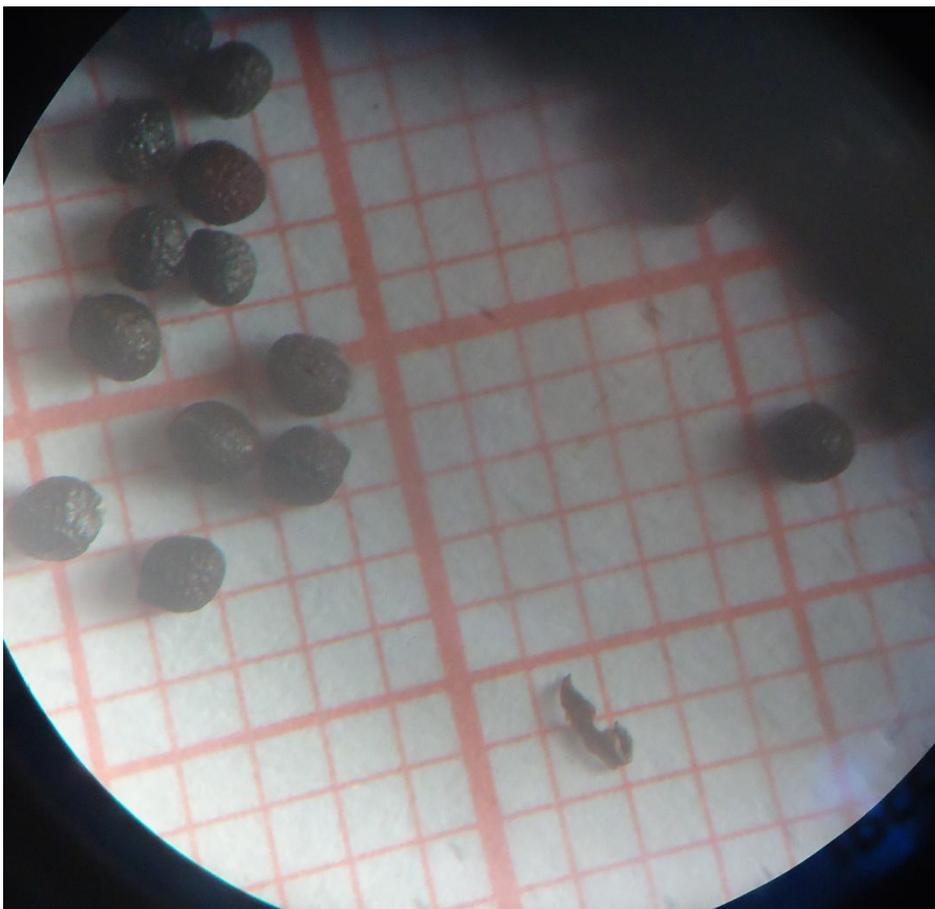
Anexo 4. Estudo da viabilidade do pólen de alfavaca-cravo e alfavaca-roxa no Laboratório de Citogenética (UFC). Inflorescências fixadas em etanol: ácido acético 3:1.



Anexo 5. Lâminas prontas para serem observadas em microscópio.



Anexo 6. Sementes de Alfavaca-cravo (L2) e Alfavaca-roxa (L3)



Anexo 7. Textura da semente de Alfavaca-cravo.