

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE FOLHAS, ÓLEO ESSENCIAL E ANATOMIA FOLIAR
QUANTITATIVA DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (VERBENACEAE) EM
DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E ÉPOCAS DE
COLHEITA**

MARÍLIA CONTIN VENTRELLA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU-SP
Novembro – 2000

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE FOLHAS, ÓLEO ESSENCIAL E ANATOMIA FOLIAR
QUANTITATIVA DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (VERBENACEAE) EM
DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E ÉPOCAS DE
COLHEITA**

MARÍLIA CONTIN VENTRELLA

Orientador: **Prof. Dr. Lin Chau Ming**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU-SP
Novembro - 2000

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Lin Chau Ming, pela orientação, sugestões, confiança, incentivo e amizade;
- Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Rodella, pela disponibilidade, pelas sugestões, pelo auxílio no estudo anatômico e pela realização da análise estatística multivariada;
- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Horticultura, pelos ensinamentos e incentivo;
- À Prof^a Dr^a Sheila Zambello de Pinho, pelo auxílio no delineamento estatístico do experimento;
- À Dr^a Marcia Ortiz Mayo Marques, pesquisadora do Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas, responsável pelas análises de cromatografia e espectrometria do óleo essencial;
- Aos funcionários do Departamento de Horticultura e da Fazenda Experimental de São Manuel, pela colaboração e pela atenção;
- Aos professores da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília (UNIMAR), pelas sugestões, auxílios, incentivo, carinho e paciência;
- À Universidade de Marília pelas facilidades concedidas durante o Curso de Doutorado e à Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP/Botucatu, que viabilizaram este trabalho;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/DF, CNPQ/DF, pela concessão de Bolsa durante a realização do Curso;
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e incentivo;
- Aos meus pais, irmãos e amigos, que foram um incentivo constante e incondicional;
- A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha irmã Luciana

Ofereço

Aos meus alunos dos Cursos de
Engenharia Agrônômica e de
Zootecnia da UNIMAR

Dedico

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
SUMMARY	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Caracterização da espécie	7
2.2 Relação entre os fatores ambientais, a produção de princípios ativos e a anatomia	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Local do experimento	23
3.2 Delineamento experimental	26
3.3 Instalação e condução do ensaio	26
3.3.1 Material botânico	26
3.3.2 Obtenção das mudas	26
3.3.3 Plantio das mudas	28
3.4 Tratamentos	28
3.4.1 Sombreamento das plantas	28
3.4.2 Épocas de colheita	29
3.5 Características avaliadas	29
3.5.1 Produção de folhas e de óleo essencial	29
3.5.1.1 Área foliar.....	29
3.5.1.2 Biomassa foliar	30
3.5.1.3 Área foliar individual	30
3.5.1.4 Massa foliar específica	31
3.5.1.5 Teor de óleo essencial	31
3.5.2 Composição do óleo essencial	31
3.5.2.1 Constituintes químicos do óleo essencial.....	31

3.5.3 Anatomia foliar	32
3.5.3.1 Anatomia quantitativa da região do limbo foliar	33
3.5.3.2 Anatomia quantitativa da região da nervura central	34
3.6 Análise estatística	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Produção de folhas e de óleo essencial	37
4.2 Composição do óleo essencial	42
4.3 Anatomia foliar	48
4.3.1 Caracterização anatômica da folha de <i>Lippia alba</i>	48
4.3.2 Anatomia quantitativa da região do limbo foliar	53
4.3.3 Anatomia quantitativa da região da nervura central	65
5 CONCLUSÕES	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Análise química do solo coletado na Fazenda Experimental São Manuel – FCA/UNESP, nas profundidades de 0 a 20 cm (amostra 1) e 20 a 40 cm (amostra 2). Botucatu-SP, 2000.....	24
2	Temperatura e precipitação registrados na Fazenda Experimental São Manuel – FCA/UNESP e radiação solar global registrada na Fazenda Experimental Lageado- FCA/UNESP, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 1998. Botucatu-SP, 2000.....	25
3	Valores médios das características da produção de folhas e de óleo essencial de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Botucatu-SP, 2000.....	40
4	Correlações entre as 5 variáveis originais referentes à produção de folhas e de óleo essencial em <i>Lippia alba</i> , e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 , e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.....	40
5	Valores médios (%) dos componentes químicos identificados no óleo essencial de folhas de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Botucatu-SP, 2000.....	45
6	Correlações entre as 9 variáveis originais referentes à composição do óleo essencial de folhas de <i>Lippia alba</i> , e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 , e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.....	46
7	Valores médios das características anatômicas da seção transversal do limbo foliar de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Botucatu-SP, 2000.....	61
8	Correlações entre as 12 variáveis originais referentes à anatomia da seção transversal do limbo foliar de <i>Lippia alba</i> , e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 , e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.....	62
9	Número de estômatos por centímetro quadrado da superfície do limbo foliar de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento. Botucatu-SP, 2000.....	64

Quadro		Página
10	Número de tricomas tectores por centímetro quadrado da superfície do limbo foliar de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento. Botucatu-SP, 2000.....	64
11	Número de tricomas secretores por centímetro quadrado da superfície do limbo foliar de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento. Botucatu-SP, 2000.....	64
12	Valores médios das características anatômicas da seção transversal da nervura principal da folha de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Botucatu-SP, 2000.....	70
13	Correlações entre as 7 variáveis originais referentes à anatomia da secção transversal da nervura da folha de <i>Lippia alba</i> , e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 , e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ramos floridos de <i>Lippia alba</i> . São Manuel-SP, 2000.....	27
2	Instalação do experimento no campo. Plantas sob sombrites (A) e à pleno sol (B). São Manuel -SP, 2000.....	28
3	A: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de <i>Lippia alba</i> . B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de <i>L. alba</i> , utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 5 variáveis referentes à produção de folhas e de óleo essencial. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000.....	41
4	Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>Lippia alba</i> (0% sombreamento/ janeiro 98) indicando os principais componentes químicos. 1: 6-metil-5-hepten-2-ona; 2: mircenol; 3: linalol; 4: nerol; 5: neral; 6: geraniol; 7: geranial; 8: t-cariofileno; 9: óxido de cariofileno. Botucatu-SP, 2000.....	44
5	A: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de <i>Lippia alba</i> . B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de <i>L. alba</i> , utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 9 variáveis referentes à composição do óleo essencial. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000.....	47
6	Epiderme da face adaxial (A) e da face abaxial (B) da folha de <i>Lippia alba</i> . Célula comum da epiderme (cc); estômato (e); tricoma tector (t); tricoma secretor (ts). Botucatu-SP, 2000.....	49

Figura		Página
7	Tricomas observados em seções transversais da folha de <i>Lippia alba</i> . Tricoma tector (t); tricoma secretor (ts); óleo essencial (o). Botucatu-SP, 2000.....	50
8	Seção transversal da folha (A) e detalhes do limbo (B) e da nervura principal (C) da folha de <i>Lippia alba</i> . Botucatu-SP, 2000.....	51
9	Seção transversal da nervura principal (A) e do limbo (B) da folha de <i>Lippia alba</i> . Epiderme da face adaxial (fad); epiderme da face abaxial (fab); colênquima (co); parênquima fundamental (pf); parênquima clorofiliano (pc); feixe vascular (fv); tricoma (t); estômato (e); bainha do feixe vascular (b); parênquima paliçádico (pp); parênquima lacunoso (pl). Botucatu-SP, 2000.....	52
10	Seções transversais do limbo foliar de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=300µm. Botucatu-SP, 2000.....	59
11	Diagramas representativos de seções transversais do limbo foliar de <i>Lippia alba</i> em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=100µm. Botucatu-SP, 2000.....	60
12	Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de <i>Lippia alba</i> . B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de <i>L. alba</i> , utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 12 variáveis referentes à anatomia da seção transversal do limbo foliar. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000.....	63

Figura**Página**

- 13 Seções transversais da nervura central da folha de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=500µm. Botucatu-SP, 2000..... 68
- 14 Diagramas representativos de seções transversais da nervura central da folha de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=200µm. Botucatu-SP, 2000..... 69
- 15 A: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de *Lippia alba*. B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de *L. alba*, utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 7 variáveis referentes à anatomia da seção transversal da nervura da folha. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000..... 72

RESUMO

A comercialização de plantas condimentares, medicinais e aromáticas tem se expandido muito nos últimos anos, principalmente, no mercado externo. Constata-se uma grande carência de informações sobre essas plantas, desde a área botânica até a área agrônômica. Entre essas plantas, destaca-se a erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.), uma planta medicinal brasileira, reconhecida por sua atividade calmante e antiespasmódica.

Foi conduzido um experimento na Fazenda Experimental de São Manuel (UNESP - Botucatu), com delineamento experimental em blocos ao acaso, com parcelas subdivididas no tempo. As parcelas constituíram-se de 4 níveis de sombreamento (0, 30, 50 e 70%) e as subparcelas de 4 épocas de colheita (out/97, jan/98, abr/98, jul/98), com 4 blocos. Foram avaliadas as características de produção de folhas e de óleo essencial, a composição do óleo essencial e as características anatômicas quantitativas da região do limbo e da nervura principal da folha. Para a análise estatística, foram utilizados os métodos multivariados de Análise de Componentes Principais e de Análise de Agrupamento ou a Análise de Variância com teste de comparação de médias.

Para todos os conjuntos de variáveis analisadas neste experimento, houve interação dos níveis de sombreamento com as épocas de colheita, porém, algumas tendências foram observadas. Os dados de produção de folhas e de óleo essencial indicaram melhor adaptação da planta a condições de alta intensidade luminosa. A determinação das condições de cultivo mais adequadas para a extração de óleo essencial em *L. alba* depende do interesse no rendimento ou na qualidade do óleo. Dos 9 compostos mais abundantes no óleo, o neral, o geranial, o óxido de cariofileno, o linalol e o t-cariofileno apresentaram alta correlação com os níveis de sombreamento e épocas de colheita. Em relação às características anatômicas, *L. alba* revelou grande plasticidade foliar entre as combinações de níveis de sombreamento e épocas de colheita. A área da seção transversal do limbo e da nervura principal, a % de epiderme de ambas as faces do limbo, a % de parênquima paliçádico, o comprimento das células do parênquima paliçádico, a % de extensão da bainha do feixe, a % de parênquima fundamental da nervura foram as características que apresentaram maior correlação com os tratamentos. O número de estômatos e de tricomas secretores da face abaxial da folha tende a diminuir com o aumento do sombreamento.

LEAVES AND ESSENTIAL OIL YIELD, AND LEAF QUANTITATIVE ANATOMY OF *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (VERBENACEAE) GROWN UNDER DIFFERENT SHADE LEVELS AND HARVEST TIMES. Botucatu, 2000. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia / Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARÍLIA CONTIN VENTRELLA

Adviser: LIN CHAU MING

SUMMARY

The market of spice, medicinal and aromatic plants has been increased in last years, especially in exterior market. There is a big lack on information about these plants, since botany until agronomic areas. Among these plants, it is emphasized *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., a brazilian medicinal plant, recognized by its calmativy and antispasmodic activity.

The essay was carried out in São Manuel Experimental Farm (UNESP- Botucatu), with randomized blocks design using split plot in time. The plots were composed by 4 shade levels (0, 30, 50 and 70%) and split plot were composed by 4 harvest times (Oct/97, Jan/98, Apr/98, Jul/98), with 4 replications. The evaluated characteristics were leaves and essential oil yield, essential oil composition, and quantitative anatomy features of midrib and leaf blade. Multivariate methods of principal components and clustering analysis or analysis of variance were used. There was interaction between shade levels and harvest times, although, some trends were observed. The leaves and essential oil yield data suggested a better plant adaptation on full sunlight conditions. The determination of the better cultivation conditions for *L. alba* essential oil

production depends on the interesting on essential oil yield or quality. Among the more abundant essential oil constituents, neral, geranial, caryophyllene oxide, linalool and t-caryophyllene showed high correlation with shade levels and harvest times. On anatomy features, *L. alba* exposed great leaf plasticity among the shade levels and harvest times arrangements. Leaf blade and midrib cross-section area, leaf blade upper and lower epidermis, palisade parenchyma, palisade parenchyma cells length and bundle sheath extension percentage, and midrib colourless parenchyma percentage were the characteristics with greater correlation among the treatments. Number of stomata and secretory trichomes on the lower side of the leaf decreased with the shading.

Keywords: *Lippia alba*, medicinal plant, essential oil, quantitative anatomy.

1 INTRODUÇÃO

Hoje o mundo passa por uma reavaliação dos valores de vida, onde os aspectos naturais e ecológicos reaparecem com força em todas as áreas do conhecimento científico e na vida prática. Na medicina, os produtos oriundos de plantas medicinais ocupam um espaço cada vez maior na terapêutica, sobressaindo-se pela sua eficácia e, principalmente, pelo menor número de contra indicações e menores efeitos colaterais, quando comparados ao uso de medicamentos sintéticos.

Dados da OMS indicam que cerca de 75% dos medicamentos de origem vegetal foram obtidos devido a estudos realizados a partir de informações originadas da medicina popular. Isso demonstra, de maneira inequívoca, que o conhecimento popular é altamente objetivo e eficaz (Ming, 1994).

Em vista disso, a comercialização de plantas aromáticas e medicinais tem se expandido muito nos últimos anos, principalmente no mercado externo, envolvendo cifras de bilhões de dólares por ano e com tendência de demanda crescente (Correa Júnior et al., 1994).

Constata-se uma grande carência de informações fitotécnicas sobre o cultivo de plantas medicinais, desde os métodos de propagação, exigências climáticas, nutricionais, modo de plantio, época correta de colheita, secagem até a comercialização.

Contribuições em áreas básicas de pesquisa, como a Botânica e a Farmacologia ainda são escassas e requerem maior atenção.

Algumas Secretarias de Saúde de Estado, como a do Paraná, vêm desenvolvendo “Programas de Fitoterapia”, a serem aplicados na rede pública de atendimento, visando atingir as demandas mais solicitadas pela população. Nestes programas várias espécies vegetais foram relacionadas para serem pioneiramente estudadas, entre elas, *Lippia alba*, a erva cidreira brasileira (Correa Júnior et al., 1991).

Considerando-se a importância farmacológica de *Lippia alba*, é necessário que se desenvolvam estudos direcionados aos seus aspectos de cultivo e colheita, procurando-se estabelecer as condições adequadas para a produção de folhas e de óleo essencial. Também é de grande importância conhecer a anatomia desta planta, as células e as estruturas secretoras envolvidas na produção do óleo, fornecendo informações que possam ser úteis para as áreas de Botânica e Farmacognosia.

Este trabalho teve como objetivo estudar as características da produção de folhas e de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., e sua anatomia foliar quantitativa, em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita, procurando conhecer o potencial produtivo e a plasticidade foliar desta planta nas diferentes situações que o ensaio propõe.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da espécie

De acordo com a região do país, a espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) pode apresentar os mais variados nomes populares. Segundo Corrêa Júnior et al. (1994), esta é conhecida como erva cidreira do campo, salsa brava, salsa limão, alecrim do mato, alecrim, alecrim do campo, camará, capitão do mato, cidreira brava, cidreira crespa, chá do rio grande do sul, cidreira melissa, sálvia, chá da febre, chá de frade, cidrão, cidreira, sálvia da gripe, salvia limão, cidró, cidrila. Em vista do grande número de sinonímias populares, aparece uma confusão generalizada com outras plantas que também apresentam cheiro de limão (citrato), como *Cymbopogon citratus* e *Melissa officinalis* (Ming, 1992).

A espécie ainda apresenta várias sinonímias científicas, como *Lippia geminata* H.B.K., *Lantana molissima* Desf., *Lantana odorata* Weigelt., *Lantana lippoides* Hook, *Lippia citrata* Cham., *Lippia lantanoides* Hook et Arn. (Ming, 1992).

Originária da América do Sul (Brasil), vegeta em solos arenosos e nas margens dos rios, açudes, lagos e lagoas, em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Corrêa Júnior et al., 1994).

Segundo Correa (1969), *Lippia alba* é um arbusto de 2 a 3 m, de caule e ramos primários alongados, ascendentes, quadrangulares quando novos, pubescentes, emitindo raízes quando em contato com o solo; folhas de 3 a 5 cm de largura,

ovais ou ovado-oblongas, agudas, serrilhadas, cuneadas na base, pubescente em ambas as faces, sendo a face inferior mais clara; curtamente pecioladas; inflorescência capituliforme; brácteas ovais e pilosas, densamente imbricadas; corolas violáceas, com lábio inferior duas vezes mais longo que o superior. De acordo com a descrição de Barroso et al. (1999), o gênero *Lippia* apresenta cálice carenado e densamente ciliado; gineceu súpero, com dois carpelos cenocápicos e biloculares, formando fruto esquizocarpáceo do tipo mericarpo, com dois carpídeos, cada qual com uma semente.

È descrita por Correa (1969) como uma planta medicinal antiespasmódica, estomáquica e emenagoga, sucedânea da *Salvia* e da *Melissa officinalis* em quase todo o país.

As partes mais utilizadas da planta são as folhas frescas ou secas e as inflorescências, na forma de chás, infusões e pomadas (Bustamante, 1993).

Terblanché & Kornelius (1996), estudando a constituição do óleo essencial do gênero *Lippia*, listaram 66 compostos citados na literatura, apenas para a espécie *Lippia alba*: 1,8 cineol, α -pineno, β -pineno, 6-metil-5-hepten-2-ona, 1-octen-3-ol, 2-undecanona, α -terpineol, δ -3-careno, (z)- β -ocimeno, γ -terpineno, dihidrocarvona, p-cimemo, (E)- β -ocimemo, (E)-metil cinamato, trans-sabineno hidrato, borneol, bornil acetato, canfeno, cânfora, carvona, citronelal, citronelol, citronelil acetato, eugenol, metil eugenol, geranial, geraniol, geranil-2-metil-propionato, geranil acetato, geranil butirato, isoborneol, limoneno, linalol, linalil acetato, mirceno, neral, nerol, óxido de piperitona, piperitona, óxido de piperitona, sabineno, terpinoleno, terpinen-4-ol, α -humuleno, α -copaeno, α -bisabolol, α -cadinol, trans-cadinol, α -gurjuneno, α -muroloeno, β -bisaboleno, (Z)- α -bisaboleno, β -bourboneno, β -cariofileno, óxido de cariofileno, β -cubebeno, β -

elemeno, δ -cadineno, allo-aromadendreno, (E)-nerolidol, γ -cadineno, γ -elemeno, γ -muroleno, cubenol, germacrene-D, muurolol.

Segundo Gomes et al. (1993), o óleo essencial obtido das folhas de *Lippia alba* coletada no Estado do Paraná, analisado por cromatografia gasosa, apresentou como principais constituintes: γ -terpineno, ρ -cimeno, β -cariofileno, mirceno, geraniol e neral. O óleo essencial de *L. alba* coletada num município do Maranhão, analisado por espectrômetro de massa e cromatografia gasosa, apresentou β -cariofileno, geranial, neral, mirceno, δ -cadineno e α -humuleno como principais constituintes, nessa ordem (Craveiro et al., 1981). Matos et al. (1996), extraindo e analisando o óleo essencial de 6 amostras de *L. alba* do nordeste brasileiro, consideraram 2 quimiotipos distintos, um caracterizado por altas concentrações de citral (formado pelos isômeros neral e geranial) e outro com altas concentrações de carvona. Plantas coletadas em 3 localidades do Pará também apresentaram grande variação na composição química de seu óleo essencial, sendo que *L. alba* coletada no município de Chaves também apresentou grandes quantidades de neral e geranial, porém, com grandes quantidades de germacrene (Zoghbi et al., 1998). Dellacasa et al. (1990), analisando a composição do óleo essencial de *L. alba* de origem uruguaia, verificou como principais constituintes cânfora, 1-8-cineol e β -cubebeno. O óleo de *L. alba* de origem cubana, analisado por Hno & Ortega (1996) apresentou limoneno, carvona, piperitenona e β -guaiano como constituintes mais abundantes entre os 42 identificados.

Resultados obtidos para a composição do óleo essencial, nem sempre são coincidentes, pois encontram-se vinculados à diferentes metodologias de extração e de análise, a diferentes condições ambientais, edáficas e de cultivo das plantas analisadas. A colheita também representa um fator importante, pois a sazonalidade, o período do dia e as condições climáticas são fatores relacionados às características

quantitativas e qualitativas do óleo essencial (Fluck, 1954). A presença de variedades ou quimiotipos diferentes dentro da mesma espécie merece atenção especial.

Alguns efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Lippia alba* já foram comprovados, como a redução do tempo de indução ao sono em cerca de 49,3% e aumento na duração do sono em 70,19% em camundongos (Angelucci et al., 1990). *Lippia alba* também apresenta ação comprovada como antifúngico (Kishore et al., 1986; Dwivedi et al., 1990; Kishore & Dubey, 1990; Kishore & Mishra, 1991) e repelente de insetos (Prakash & Rao, 1986).

2.2 Relação entre os fatores ambientais, a produção de princípios ativos e a anatomia

As plantas são ricas em substâncias químicas que aparentemente não estão relacionadas com os processos metabólicos normais como a fotossíntese, a respiração e o crescimento. Estas, chamadas de substâncias químicas secundárias, devem estar relacionadas, pelo menos parcialmente, com a imobilidade das plantas, uma vez que elas não podem escapar das pressões ambientais pelo movimento, sendo suas únicas defesas as estruturas físicas e a composição química (Edwards & Wratten, 1981).

Gottlieb (1990) sugere que as plantas sintetizam apenas metabólitos primários e genéricos, sendo todos igualmente necessários à vida vegetal, mesmo em um ambiente estéril. Esses metabólitos genéricos, chamados por Gottlieb de metabólitos especiais, também poderiam adaptar o organismo vegetal à pressão de herbivoria, mas sua função de proteção seria apenas acidental, e não predestinada a essa atividade.

Sagers & Coley (1995) admitem uma relação entre benefícios e custos para as plantas com a produção de metabólitos secundários. Estudando a produção de tanino e a taxa de crescimento do arbusto *Psychotria horizontalis* sob pressão de herbivoria ou não, esses autores verificaram vantagens na produção de tanino enquanto mecanismo de defesa contra a herbivoria, porém, com custos refletidos no menor desenvolvimento, dado pela alocação de recursos para a síntese do metabólito secundário.

Embora o nível de metabólitos secundários seja controlado geneticamente, a quantidade e a concentração desses compostos varia acentuadamente em função das condições ambientais. Apresentam-se como importantes fatores ambientais, a luz (intensidade e fotoperíodo), a latitude, a temperatura (mínima, máxima e média), o solo (propriedades químicas e físicas), os ventos, os macro e micro nutrientes e a disponibilidade hídrica. Esses fatores apresentam respostas diferenciadas nas diversas espécies estudadas, devendo-se considerar as condições ambientais ótimas para a máxima produção de cada espécie (Palevitch, 1987). Segundo o autor, a produção de biomassa e de fitoquímicos também está estreitamente relacionada com aspectos agrônômicos como o preparo do solo, data de plantio, fertilização, irrigação, espaçamento, uso de herbicidas e pesticidas, reguladores vegetais, tratamento de sementes e técnicas de colheita e pós colheita.

Fluck (1954) destaca, ainda, a importância da variação sazonal (período do ano), diária e ontogenética do metabolismo vegetal e, especialmente, na variação do conteúdo de princípios ativos. Enfatiza, também, a necessidade de se coletar plantas no mesmo estágio de desenvolvimento, em datas correspondentes e em períodos do dia sob mesmas condições atmosféricas, a fim de se possibilitar a comparação entre trabalhos diferentes e se ter maior segurança em relação aos resultados obtidos.

De acordo com Salamon (1994), variação nas condições edáficas (fertilidade, teor de matéria orgânica e pH) e climáticas (temperatura e precipitação) no cultivo influenciariam a produção de óleo essencial em flores de camomila. Esses fatores não alteraram as características qualitativas do óleo essencial, mas sim o teor de óleo e a proporção dos seus constituintes.

Ming (1992), estudando a adubação orgânica em *Lippia alba*, verificou maiores produções de biomassa em níveis crescentes de incorporação de matéria orgânica e uma relação inversa quanto aos teores de óleo essencial. O autor discute um papel de defesa dos óleos essenciais em ambientes desfavoráveis, enquanto em ambientes mais favoráveis, a energia da planta estaria voltada para atividades de crescimento e desenvolvimento, do metabolismo primário.

Em *Artemisia annua* (Asteraceae), planta medicinal importante no tratamento da malária, os níveis mais elevados de artemisinina, seu princípio ativo, foram obtidos em plantas totalmente floridas, podendo-se relacionar ainda melhor o acúmulo de artemisinina com um fotoperíodo específico de 12 horas de luz, para as condições do experimento (Morales et al., 1993).

De acordo com Singh et al. (1989), a idade e a posição da folha no caule são fatores importantes na determinação da quantidade e composição do óleo essencial em *Cymbopogon flexuosus* (capim limão). Esses mesmos autores encontraram produções máximas de óleo essencial na segunda folha, enquanto que as de posição inferior apresentaram produções decrescentes. Valores semelhantes foram obtidos para as folhas de até 20 dias de idade, com valores máximos de óleo essencial, sendo que os níveis de óleo decresceram quantitativamente com o aumento da idade das folhas analisadas. Isso sugere, em *C. flexuosus*, que a segunda folha no caule, com até 20 dias de idade, apresente

maior síntese de óleo, ainda que a produção de constituintes específicos do óleo tenha um comportamento independente da produção total.

Folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em diferentes níveis de inserção no caule foram estudadas sob os aspectos anatômicos e de produção de óleo essencial. (Ventrella, 1998). Verificou-se que as folhas de posição superior, ou seja, as mais novas, apresentam produção de óleo significativamente maior que as folhas de posição inferior, embora a proporção dos tecidos e estruturas secretoras envolvidas na produção do óleo não tenha variado com o nível de inserção da folha no caule. Esses dados sugerem uma relação estreita da produção de óleo com a idade da folha e não apenas com a proporção dos tecidos e/ou estruturas secretoras.

O tipo de estrutura secretora e a sua frequência também podem ser relacionados com a quantidade e a qualidade de substâncias produzidas por determinada espécie. Assim, vários autores, através de estudos com microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, aliados à testes histoquímicos, puderam associar a composição química de metabólitos produzidos a diferentes idioblastos e/ou tricomas em Labiatae (Werker et al, 1985), Piperaceae (Silva, 1992), *Sambucus racemosa* (Zobel, 1986) e *Artemisia annua* (Ferreira & Janick, 1995).

Ahmed & Fahmy (1949), estudando fatores ambientais envolvidos na produção e conteúdo de alcalóides de *Hyoscyamus muticus*, mostraram que solos limosos, sob irrigação moderada e com aplicação de fertilizantes nitrogenados aumentam tanto a produção de biomassa quanto a de alcalóides. Estes autores enfatizam a superioridade de plantas desenvolvidas a pleno sol na produção de alcalóides em relação a plantas sombreadas. Em condições de alta luminosidade, haveria aumento na atividade metabólica do vegetal refletida na rápida formação de tricomas, oxalato de cálcio e alcalóides.

Halva et al. (1992) utilizaram quatro níveis de luminosidade no cultivo de *Anethum graveolens*: 100% (pleno sol), 70%, 50% e 30%. Verificaram que níveis decrescentes de luminosidade resultaram em decréscimos no número de folhas, na área foliar específica, na altura da planta, na precocidade do desenvolvimento dos botões florais e no acúmulo de óleo essencial. Os dados deste experimento sugerem uma relação direta entre a produção de biomassa foliar e a produção de óleo essencial com a atividade fotossintética da planta, mas não necessariamente com a constituição do óleo.

Um exemplo da plasticidade fenotípica do material vegetal foi a determinação de *Lippia geminata* como sinonímia científica de *Lippia alba*, considerada, por alguns autores como espécie distinta (Correa, 1992). Neste trabalho, a autora utilizou características histoquímicas e características anatômicas como a estriação da cutícula, o número de estômatos e de tricomas relacionadas ao local de origem dos espécimes estudados para a conclusão do trabalho.

Num estudo sobre a produção de óleo essencial em *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*, as plantas foram submetidas a intensidades luminosas de 15%, 27%, 45% e 100% durante o cultivo (Li et al., 1996). Observou-se uma concentração máxima de óleo essencial em *T. vulgaris* cultivado a 100% de luminosidade, sendo que o óleo apresentou altos teores de timol e de mirceno. A maior concentração de óleo essencial em *S. officinalis* foi encontrada no cultivo com 45% de luminosidade, onde o acúmulo de tujanona foi máximo e o de cânfora, mínimo. Os autores também verificaram que com a diminuição da intensidade luminosa, houve diminuição no comprimento e largura da folha e, também, diminuição na densidade dos tricomas peltados, tanto em *T. vulgaris* como em *S. officinalis*.

As mudanças na composição do óleo essencial de *Achillea crithmifolia* foram estudadas sob diferentes condições ambientais durante diferentes fases

de desenvolvimento (Nemeth et al., 1993). Estes autores verificaram que altas temperaturas e alta intensidade luminosa causaram aumento na concentração de cânfora e diminuição na concentração de 1,8-cineol. A concentração do borneol foi variável no óleo. Neste experimento, durante o desenvolvimento das folhas em roseta até o florescimento, a concentração de cânfora diminuiu, a de 1,8-cineol aumentou e a de borneol se manteve inalterada. Todavia, a concentração de cânfora foi maior nas flores, a concentração de 1,8-cineol maior nas folhas, enquanto o borneol se apresentou bem distribuído nesses dois órgãos.

Vogel et al. (1996) observaram maiores teores de alcalóide e óleo essencial em *Peumus boldus* cultivado em ambiente sombreado quando comparado com a produção a pleno sol.

Tabernaemontana pachysphon (Apocynaceae) apresentou comportamento semelhante a *P. boldus* em relação à produção de alcalóide, onde maiores níveis de luminosidade durante o cultivo causaram decréscimo na concentração de alcalóides, embora o crescimento das plantas tenha sido superior nessa situação (Hoft et al., 1996). Todavia, *Capsicum annuum*, cultivado sob 25%, 66% e 100% de luminosidade, apresentou aumento no teor de capsaicinóides em frutos em função do aumento de luminosidade no cultivo (Jeong et al., 1995).

Acock et al. (1996), estudando o comportamento de *Erythroxylum* spp. em diferentes níveis de luminosidade, não observaram alterações na concentração de cocaína. Porém, o tratamento com maior intensidade luminosa apresentou maior massa foliar, sendo que a produção de cocaína por planta é dependente da massa foliar.

Datura stramonium var. *tatula* foi estudada quanto a produção e acúmulo de alcalóides em diferentes regimes de luminosidade (Demeyer & Dejaegere, 1997). A diminuição da intensidade luminosa proporcionou maiores teores de hiosciamina

e de escopolina, em caules e folhas, até a 20ª semana de cultivo. O aumento da intensidade luminosa refletiu num aumento do teor de alcalóides em frutos e sementes, entre a 12ª e 16ª semanas de cultivo. Segundo os autores, a concentração de alcalóides não se alterou muito nas raízes, nos diferentes tratamentos.

A variação na concentração de alcalóides em diferentes condições de luminosidade no cultivo sugere não só alteração na rota biossintética desse produto, mas também redistribuição diferenciada dos alcalóides entre os diferentes órgãos da planta, uma vez que, inevitavelmente, a luz interfere na taxa de crescimento e na diferenciação da planta.

A produção de taninos em *Hypericum perforatum* foi estudada por Makovetskaya (1992) sob diferentes regimes de luminosidade. As plantas mais sombreadas (18.000 lux) apresentaram maior acúmulo de tanino em relação às plantas expostas à maior luminosidade (50.000 lux). Segundo os autores, o maior acúmulo de tanino em todos os órgãos ocorreu durante o florescimento, sendo que o tanino foi acumulado principalmente nas folhas.

Zhang (1994) avaliou a produção de saponinas em *Panax pseudoginseng* cultivado sob 5%, 20%, 35% e 50% de luminosidade. Verificou-se aumento no teor de saponinas com o aumento da luminosidade até 20%. Plantas cultivadas sob intensidades luminosas iguais ou superiores a 35%, mostraram decréscimo no teor deste metabólito, mostrando relação estreita entre o sombreamento e a produção deste princípio ativo.

A camomila (*Matricaria chamomilla* L.) cultivada sob diferentes níveis de luminosidade, apresentou redução do número, tamanho e peso seco dos capítulos florais nos tratamentos com menor intensidade luminosa, características estas,

acompanhadas pelo decréscimo da porcentagem de óleo essencial e camazuleno nas mesmas condições de luminosidade (Saleh, 1973).

Smith et al. (1997) conseguiram reunir, numa belíssima revisão sobre a plasticidade foliar frente as variações de luminosidade, inúmeros trabalhos que lhes permitiram uma série de generalizações sobre o assunto. Entre estas generalizações, pode-se citar o espessamento das folhas quando expostas à maior incidência luminosa, a presença de estômatos e camadas de parênquima paliçádico em ambas as faces da folha, colaborando para um aumento da simetria foliar. A presença dos estômatos em ambas as faces da folha incrementaria a difusão de dióxido de carbono no mesofilo e o aumento nas proporções de parênquima paliçádico facilitaria a propagação da luz em profundidade na folha. Desse modo, a taxa fotossintética por unidade de área foliar seria otimizada com a maior eficiência na utilização da luz e do dióxido de carbono disponível na atmosfera.

A alta plasticidade da morfologia foliar pode ser observada em muitas espécies arbóreas de florestas tropicais, que possuem folhas de sombra, largas e finas, quando juvenis, e folhas de sol, pequenas e espessas, quando emergem sobre a copa à pleno sol (Crawley, 1997). Segundo este autor, algumas características anatômicas foliares são observadas com certa frequência, como epiderme unisseriada, estômatos grandes e pouco numerosos, células do parênquima paliçádico largas e curtas e baixa frequência de feixes vasculares com uma discreta bainha ao redor dos feixes em folhas jovens de sombra. Em árvores adultas, com folhas expostas à pleno sol, estas apresentam a epiderme multisseriada, densamente indumentadas por tricomas, células do parênquima paliçádico com células longas e finas, alta frequência de feixes vasculares com bainha bastante pronunciada.

Na natureza, a baixa luminosidade de florestas sombreadas é enriquecida em vermelho longo, e a espessura do parênquima paliçádico de folhas em

expansão pode ser influenciada pela composição espectral da luz. Assim, a redução da espessura do parênquima paliçádico pode ser ocasionada tanto pela baixa relação entre vermelho e vermelho longo como numa simulação com baixa radiação luminosa (Thompson et al., 1992).

A anatomia foliar de plântulas de quatro espécies arbóreas de *Shorea* (Dipterocarpaceae) e de três espécies arbóreas de *Quercus* (Fagaceae), foi estudada por Ashton & Berlyn (1992) e Ashton & Berlyn (1994), respectivamente, sob diferentes espectros e intensidades luminosas. Verificou-se que as espécies, de modo geral, produziram lâminas foliares mais espessas, com maior espessura de cutícula e maior número de estômatos por unidade de área quando desenvolvidas a pleno sol. Para os dois grupos de plantas estudados, a espessura do parênquima paliçádico apresentou-se superior nas folhas expostas a pleno sol quando comparadas com as folhas submetidas a sombreamento.

De modo geral, a largura e o comprimento dos estômatos não apresentam variação significativa entre folhas expostas a pleno sol e folhas sombreadas (Voltan et al., 1992; Ashton & Berlyn, 1994).

Estudando os efeitos da intensidade luminosa no crescimento, anatomia e qualidade como forrageira de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* var. *trichoglume*, Deinum et al. (1996) observaram um grande aumento no número de células esclerenquimáticas, assim como na espessura e constituintes da parede das células deste tecido em caules e folhas, sob intensidades luminosas mais elevadas.

Populações de *Lolium perenne* e *L. multiflorum*, espécies temperadas, foram submetidas a diferentes regimes de luminosidade durante o seu desenvolvimento, apresentando, em condições de máxima luminosidade, decréscimo na espessura e largura da folha e na proporção de tecido epidérmico e aumento do tecido

vascular (Charles-Edwards et al., 1974). A alteração da espessura foliar é atribuída à variação no tamanho das células do mesofilo, uma vez que o número de camadas de células manteve-se constante em todos os tratamentos. Esses autores ainda sugerem que a taxa fotossintética pode ser expressa com base na área foliar, no volume foliar e no volume do tecido parenquimático.

Duas espécies de *Argyrodendron*, adaptadas à sombra, apresentaram aumento na espessura da folha e relativo aumento nas células da extensão da bainha do feixe vascular quando submetidas a níveis de luminosidade mais intensos (Thompson et al., 1992). Segundo os autores, as extensões da bainha do feixe vascular, que ligam a face superior com a face inferior da epiderme, possam oferecer um caminho óptico para a radiação incidente, podendo dispersar parte da radiação potencialmente prejudicial. Nestas espécies, a espessura do parênquima paliçádico e a capacidade fotossintética também aumentaram com a intensidade luminosa, sendo acompanhados pelo maior adensamento das células dos parênquimas lacunoso e paliçádico, pelo aumento do número de camadas deste último e, conseqüentemente, pela redução dos espaços intercelulares.

Strauss-DeBenedetti & Berlyn (1994) estudaram o efeito da luz na anatomia foliar em cinco gêneros de Moraceae tropicais de posições sucessionais diferentes. Observaram que as cinco espécies estudadas responderam ao aumento do regime luminoso produzindo folhas mais espessas, com parênquima paliçádico mais desenvolvido, seja pelo alongamento celular ou pelo aumento do número de camadas de células, independente da posição sucessional que ocupavam no local de origem e, portanto, não constituindo um indicativo da performance fotossintética dessas plantas. Estes autores sugerem que a plasticidade foliar resultante de diferentes tratamentos luminosos consiste apenas numa adaptação estrutural que proporciona balanço hídrico mais adequado,

condutividade de luz interna e trocas gasosas mais apropriadas para a nova situação, ao invés de alterar significativamente a atividade fotossintética.

Ziegenhagen & Kausch (1995) analisaram a produtividade e a anatomia foliar de carvalhos (*Quercus robur* L.) desenvolvidos sob quatro intensidades luminosas diferentes: 100%, 50%, 25% e 10% da luz solar. Nos tratamentos com maior sombreamento, houve grande redução da espessura das folhas, na espessura do parênquima paliçádico, cujas células tornaram-se mais largas com o aumento do sombreamento. As faces superior e inferior da epiderme não mostraram gradiente linear através dos níveis de sombreamento, porém a epiderme apresentou espessura máxima nas plantas que receberam 25% da luz solar. Nas condições de extremo sombreamento, o número de cloroplastos por células do parênquima paliçádico diminuiu, porém apresentaram-se mais compridos e largos. Nas folhas mais sombreadas houve redução de duas para uma única camada de parênquima paliçádico, levando a uma relação de 1:1 entre os parênquimas paliçádico e lacunoso, sendo que em folhas de sol é comum a predominância do parênquima paliçádico.

Baseando-se não só na intensidade luminosa, mas também na qualidade espectral da luz, Buisson & Lee (1993) estudaram o desenvolvimento de folhas de mamão (*Carica papaya* L.) sob diferentes condições de sombreamento, simulando a diminuição da intensidade luminosa com ou sem a diminuição da relação do comprimento de onda vermelho: vermelho longo. Quando as plantas desenvolveram-se sob sombreamento acompanhado da diminuição da relação vermelho:vermelho longo, houve, em relação aos demais tratamentos, significativa diminuição da espessura foliar, do peso específico da folha, do comprimento das células do parênquima paliçádico, no número de células deste parênquima e na espessura do mesofilo e aumento no teor de clorofila e na largura das células do parênquima paliçádico na parte adaxial. Segundo os autores, o formato cônico das células do parênquima paliçádico favoreceriam a disposição mais

adequada dos cloroplastos e a absorção mais eficiente da luz em condições de sombreamento intenso.

Estudando a variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas, Voltan et al. (1992) verificaram que em condições de maior intensidade luminosa ocorre espessamento foliar promovido pela expansão das células mesófilo, assim como a redução do número de estômatos por unidade de área foliar. Segundo estes autores, o sombreamento aumentou as dimensões das células da epiderme, não alterando significativamente o comprimento e a largura das células do parênquima.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de São Manuel, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas (UNESP – Botucatu), e as análises laboratoriais referentes aos estudos fitoquímicos realizadas no Departamento de Horticultura da Faculdade de Ciências Agrônômicas (UNESP – Botucatu) e no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas. O estudo anatômico através de microscopia de luz foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília (UNIMAR) e no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências (UNESP- Botucatu).

Situada no município de São Manuel, a Fazenda Experimental de São Manuel encontra-se sobre solo do tipo latossol vermelho amarelo, fase arenosa, cuja análise química é apresentada no Quadro 1. Tem como coordenadas geográficas: 22°44' de latitude sul e 48°34' de longitude oeste, numa altitude média de 750 metros, com clima tipo Cfa, segundo a classificação de Koeppen, com precipitação anual média de 1450 mm e temperatura média anual de 21°C (Espindola et al., 1974). Os dados de temperatura, precipitação e radiação solar no período de janeiro de 1997 a dezembro 1998 estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 1 Análise química referente ao solo coletado na Fazenda Experimental São Manuel – FCA/UNESP, nas profundidades de 0 a 20 cm (amostra 1) e 20 a 40 cm (amostra 2). Botucatu-SP, 2000.

Amostra	pH CaCl ₂	MO (g/dm ³)	P (mg/dm ³)	H+Al	mmol/dm ³ de terra					V (%)
					K	Ca	Mg	SB	CTC	
01	5,9	12	15	12	1,3	27	19	47	59	80
02	5,9	14	35	11	1,0	21	12	34	45	75

Quadro 2 Temperatura e precipitação registrados na Fazenda Experimental São Manuel – FCA/UNESP e radiação solar global registrada na Fazenda Experimental Lageado- FCA/UNESP, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 1998. Botucatu-SP, 2000.

Data	Temperatura (°C)			Precipitação (mm)	Radiação Solar Global (cal.cm ⁻² .dia ⁻¹)
	Mínima	Máxima	Média		
Janeiro/97	18,65	28,26	23,46	552,00	456,19
Fevereiro/97	18,70	29,57	24,13	113,00	508,75
Março/97	17,97	29,62	23,79	72,00	519,32
Abril/97	15,35	27,56	21,45	35,50	463,73
Maio/97	12,48	25,58	19,03	105,00	408,10
Junho/97	11,13	23,36	17,24	160,00	293,67
Julho/97	11,45	25,58	18,52	26,00	382,81
Agosto/97	12,12	27,82	19,97	9,00	434,90
Setembro/97	15,31	29,51	22,41	115,00	457,70
Outubro/97	16,10	28,41	22,25	136,50	477,48
Novembro/97	18,48	29,96	24,22	147,00	492,23
Dezembro/97	19,11	30,02	24,56	114,00	525,03
Janeiro/98	19,15	29,98	24,56	77,00	488,00
Fevereiro/98	19,41	29,69	24,55	330,00	411,86
Março/98	19,76	29,53	24,64	266,50	467,29
Abril/98	16,65	28,02	22,33	66,00	412,00
Maio/98	13,38	23,42	18,39	107,00	333,55
Junho/98	11,31	22,20	16,74	15,00	333,36
Julho/98	11,63	24,39	18,01	15,00	345,74
Agosto/98	13,53	25,43	19,47	53,00	325,90
Setembro/98	15,51	25,33	20,42	106,00	344,22
Outubro/98	15,74	25,54	20,63	159,50	384,58
Novembro/98	16,56	28,03	22,29	35,50	499,41
Dezembro/98	17,93	28,21	23,07	294,50	432,68

3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com parcelas subdivididas no tempo (“split plot in time”). Foram avaliados 16 tratamentos, considerando-se as plantas sob 4 níveis de sombreamento e 4 épocas de colheita, com 4 blocos, totalizando 64 parcelas.

3.3 Instalação e condução do ensaio

3.3.1 Material botânico

Foram utilizadas mudas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae), popularmente conhecida como erva cidreira brasileira (Figura 1), obtidas a partir de plantas matrizes da Fazenda Experimental São Manuel (UNESP - Botucatu). O exemplar do material estudado está depositado no Herbário BOTU nº 23125.

3.3.2 Obtenção das mudas

Para a obtenção das mudas, foram utilizadas estacas de plantas matrizes da Fazenda Experimental de São Manuel (UNESP), evitando-se as que apresentavam sinais de danos mecânicos, ataque de pragas ou doenças. As estacas, com 20-25 cm de comprimento e diâmetro superior a 0,5 cm, foram colocadas para enraizar em bandejas de isopor com substrato comercial (Plantmax®) por, aproximadamente, 35 dias.



Figura 1 Ramos floridos de *Lippia alba*. São Manuel-SP, 2000.

3.3.3 Plantio das mudas

As mudas foram plantadas num espaçamento de 0,60m na linha e 0,90m entre linhas, com 25 plantas por parcela, sendo 9 plantas úteis por parcela e um total de 400 mudas no experimento.

Durante o experimento, foram realizadas capinas para a eliminação das plantas daninhas, quando necessário.

3.4 Tratamentos

3.4.1 Sombreamento das plantas

Foram utilizados quatro níveis de sombreamento sobre as plantas, através de sombrites com 30, 50 e 70% de sombreamento (Figura 2-A), sustentados por palanques de 1,4 m de altura, unidos por arames e, com 0% de sombreamento, as mudas foram cultivadas em parcelas a pleno sol (Figura 2-B).

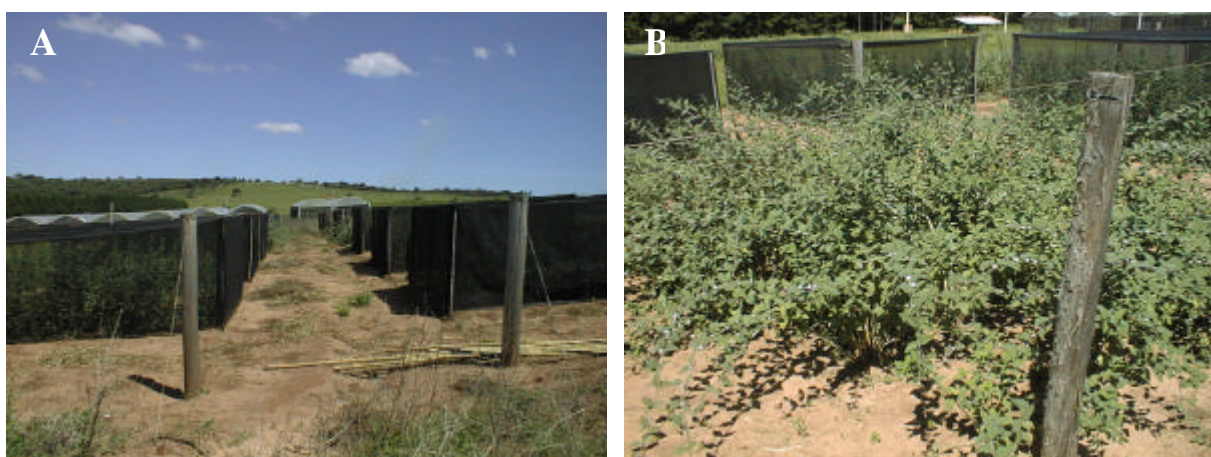


Figura 2 Instalação do experimento no campo. Plantas sob sombrites (A) e à pleno sol (B). São Manuel-SP, 2000.

3.4.2 Épocas de colheita

Foram realizadas colheitas de material vegetal em cinco épocas distintas, sendo a primeira em 02 de julho de 1997, quatro meses após o plantio (03 de março de 1997) e as colheitas subsequentes com um intervalo de três meses entre si, nas seguintes datas: 01 de outubro de 1997, 05 de janeiro de 1998, 01 de abril de 1998 e 01 de julho de 1998. A primeira colheita, em 02 de julho de 1997, foi desprezada, com o objetivo de proporcionar para todos os tratamentos material vegetal desenvolvido após a poda.

A colheita do material vegetal, para todas as avaliações, foi realizada simultaneamente, sempre no período da tarde. Os ramos foram colhidos a 10 cm do solo, imediatamente acondicionados em sacos plásticos e transferidos para a câmara fria do Departamento de Horticultura da F.C.A. (UNESP/Botucatu). No laboratório, as folhas foram separadas manualmente dos ramos. Para o estudo anatômico, o material vegetal foi colhido e acondicionado em vidros com fixador, ainda no campo.

3.5 Características avaliadas

3.5.1 Produção de folhas e de óleo essencial

3.5.1.1 Área foliar

Para o cálculo da área foliar foi separada uma amostra de 150 folhas, ao acaso, por parcela. A área foliar das amostras foi medida através de um aparelho de medição de área foliar (aparelho digital- Automatic Area Meter- Model AAM-7 da Hayashi Denkoh Co. LTD- Tokyo, Japan), que expressa a área em dm^2 . Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação de ar a 40°C até

a estabilização do peso. As demais folhas de cada parcela também foram acondicionadas em sacos de papel e secas da mesma maneira.

O cálculo da área foliar de cada parcela foi feito através de uma regra de três, considerando-se o peso seco das folhas mensuradas através do aparelho de medição de área foliar e o peso seco total das folhas de cada parcela. Os valores foram convertidos para 1 m² de área cultivada.

3.5.1.2 Biomassa foliar

A biomassa foliar de cada parcela foi obtida através da pesagem total das folhas já secas. Os valores foram convertidos para 1 m² de área cultivada.

3.5.1.3 Área foliar individual

Dividiu-se o valor da área foliar da amostra (de 150 folhas) pelo número de folhas da mesma, a fim de se determinar a área foliar individual nos diferentes tratamentos.

3.5.1.4 Massa foliar específica

Para a obtenção desse índice, o peso da amostra de folhas (150 folhas) foi dividida pelo número de folhas, a fim de se determinar o peso individual das folhas nos diferentes tratamentos.

3.5.1.5 Teor de óleo essencial

Foram utilizados 100g de folhas secas por parcela, trituradas manualmente. Em seguida, as amostras foram colocadas em balões de vidro de 2000mL, juntamente com 1500mL de água destilada, sobre manta aquecedora e acoplados a aparelhos do tipo Clevenger modificado, para a hidrodestilação do óleo. Após um período ininterrupto de 3 horas de destilação, foi anotado o volume de óleo essencial obtido em cada parcela.

3.5.2 Composição do óleo essencial

3.5.2.1 Constituintes químicos do óleo essencial

Após a hidrodestilação, o óleo foi acondicionado em vidros âmbar e estocado em freezer. Antes da análise cromatográfica, o óleo sobrenadante foi separado da água e extraído com éter etílico.

A análise da composição química do óleo essencial nos diferentes tratamentos foi conduzida num cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu, QP 5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar DB-5 (J & Wiley Scientific, 30m x 0,25mm x 0,25µm), hélio como gás de arraste (1,7mL.min⁻¹), split 1/30, injetor e detector a 240°C e 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C (5min) – 180°C, 4°C.min⁻¹; 180°C – 280°C, 15°C. min⁻¹. A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação dos espectros de massas das substâncias com o banco do sistema CG-EM (Nist 62.lib.) e literatura (Adams, 1995).

3.5.3 Anatomia foliar

Para o estudo anatômico quantitativo da folha de *Lippia alba* foi coletado material vegetal correspondente à 3ª folha completamente expandida, contada a partir do ápice do ramo, em 4 repetições. Foram tomadas porções da região mediana da lâmina foliar, correspondentes à nervura central e à região do limbo entre a nervura central e o bordo, fixados em Karnovsky (Karnovsky, 1965).

O material foi emblocado em historresina (glicol metacrilato JB-4 – Polyscience, Inc.) de acordo com as recomendações do fabricante e de Carmello-Guerreiro (1995) e cortado em seções transversais com micrótomo rotatório, corado com Azul de Toluidina e montado entre lâmina e lamínula com Entelan. Os contornos dos diferentes tecidos foliares foram desenhados em cartolina com o auxílio de um microscópio de projeção, assim como as medidas lineares e as contagens (Rodella et al., 1982, 1984). A área dos diferentes tecidos foi obtida através da adaptação do método dos contornos foliares (Benincasa, 1988). Os contornos dos tecidos, assim como áreas conhecidas, foram recortados em cartolina. Através de uma regra de três simples entre os pesos dos contornos dos tecidos e os pesos das áreas conhecidas, determinaram-se as áreas dos tecidos foliares. A partir da área total de cada seção transversal, foi calculada a porcentagem de cada tecido.

Para a contagem das células/estruturas secretoras, tricomas e estômatos, na epiderme da face adaxial e abaxial do limbo, foram utilizadas porções da região mediana da folha, submetidas ao processo de diafanização (Handro, 1964; Felipe & Alencastro, 1966) e montadas entre lâmina e lamínula com gelatina glicerinada. Considerou-se, para cada repetição, a média de 10 campos. Essa contagem foi feita apenas para a colheita de julho de 1998.

Para confirmar as células, tecidos ou estruturas responsáveis pela produção de óleo essencial em *L. alba*, algumas seções transversais da folha foram clarificadas com hipoclorito de sódio, lavadas em água corrente e submetidas ao corante Sudan IV, que evidencia substâncias lipídicas e terpênicas (óleos essenciais) através da coloração alaranjado-avermelhado.

3.5.3.1 Anatomia quantitativa da região do limbo foliar

Na região do limbo foliar, foram determinadas as seguintes características:

- área total da seção transversal,
- % da epiderme das faces abaxial e adaxial,
- % dos parênquimas lacunoso e paliçádico,
- % do feixe vascular,
- % da bainha do feixe vascular
- % da extensão da bainha do feixe vascular,
- comprimento e largura de células do parênquima paliçádico (média de 20 medições por repetição),
- espessura da epiderme das faces abaxial e adaxial (média de 20 medições por repetição).

3.5.3.2 Anatomia quantitativa da região da nervura central

Na região da nervura central, foram determinadas as seguintes características:

- área total da seção transversal,
- % da epiderme das faces abaxial e adaxial,
- % do feixe vascular (incluindo xilema, floema e fibras),
- % do parênquima fundamental,
- % do colênquima,
- % do parênquima clorofiliano (região da nervura que compreende os parênquimas paliádico e lacunoso).

3.6 Análise estatística

Os dados referentes às variáveis da produção de folhas, da composição do óleo essencial e da anatomia quantitativa do limbo e da nervura principal da folha de *Lippia alba* nos 4 níveis de sombreamento e 4 épocas de colheita foram submetidos à análise estatística utilizando-se os métodos multivariados de Análise de Componentes Principais e de Análise de Agrupamento (Sneath & Sokal, 1973), procurando-se agrupar os tratamentos de acordo com o seus graus de similaridade.

A Análise de Componentes Principais possibilita verificar a capacidade discriminatória das variáveis originais no processo de formação dos agrupamentos, sendo empregada para reduzir o conjunto dos indicadores a duas novas variáveis não correlacionadas, que são os componentes principais, indicados por Y_1 e Y_2 .

A Análise de Agrupamento foi realizada com os dados transformados, calculando-se a Distância Euclidiana Média entre os tratamentos, para o conjunto dos indicadores e utilizando o algoritmo UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average), recomendado por Rohlf (1970), sendo o resultado final da análise apresentado na forma de um dendrograma.

Os dados referentes à contagem de estômatos, tricomas tectores e tricomas secretores nos diversos níveis de sombreamento (na coleta de julho) foram submetidos à Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Pimentel-Gomes, 1976).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para proporcionar melhor aproveitamento e visualização dos dados, foram utilizados dois métodos de análise multivariada, a Análise de Agrupamento (AA) e a Análise de Componentes Principais (ACP), onde os resultados finais estão apresentados na forma de figuras (dendrogramas e gráficos). Estes métodos permitem discutir a importância de cada variável dentro dos tratamentos, pela construção de combinações lineares das variáveis originais, visando reduzir o espaço das variáveis e possibilitar a localização dos tratamentos em figuras.

O resultado das análises permite o agrupamento de *L. alba* nos diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita, de forma que os tratamentos pertencentes a um mesmo grupo apresentem maior similaridade que tratamentos de grupos diferentes (Curi et al., 1992).

4.1 Produção de folhas e de óleo essencial

O Quadro 3 apresenta os valores médios das características de produção de folhas e óleo essencial, como a biomassa foliar, a área foliar, a área foliar unitária, a massa foliar específica e o teor de óleo essencial de *L. alba* nos diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. As correlações entre essas 5 variáveis e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), resultantes da Análise de Componentes Principais, são apresentadas no Quadro 4.

Para o primeiro componente principal Y_1 , plantas de *L. alba* cultivadas a pleno sol e colhidas em outubro, janeiro ou abril, com dispersão gráfica representada pela Figura 3-B, apresentam maiores valores de biomassa, área foliar, óleo essencial e massa foliar específica, e menores valores de área foliar unitária. As plantas cultivadas sob 70% de sombreamento, independente da época de colheita, têm comportamento contrário, apresentando baixos valores de biomassa, de área foliar, de óleo essencial e de massa foliar específica, e o maior valor de área foliar unitária. O aumento da área foliar unitária e a diminuição da área foliar total como consequência do sombreamento são comumente relacionados na literatura (Fahn, 1982; Cutter, 1987; Mauseth, 1988; Crawley, 1997). A diminuição da área foliar unitária em condições de maior radiação seria causada pela diminuição do tamanho das células (Fahn, 1982; Mauseth, 1988), ou seja, pela menor expansão celular em condições de alta luminosidade. Como a luz favorece a degradação de auxinas (Ferri, 1985), o alongamento celular ficaria comprometido em condições de alta luminosidade, porém, favorecendo o balanço hídrico da planta, com a diminuição da área transpirante. Por outro lado, o aumento da área foliar total em condições de alta luminosidade é resultado do maior número de folhas por planta nessas condições (Fahn, 1982). Apesar das generalizações, as adaptações de cada espécie

para condições de maior ou menor intensidade luminosa durante o desenvolvimento devem ser consideradas. O experimento de Voltan et al. (1992) com cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas é um caso típico, pois as plantas apresentaram maior área foliar individual em condições intermediárias de sombreamento (50% da luz solar total).

Para o segundo componente principal Y_2 , plantas cultivadas sob diversos níveis de sombreamento e colhidas em julho e plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em outubro e janeiro, com dispersão gráfica representada pela Figura 3-B, apresentam altos valores de massa foliar específica e baixos valores de área foliar unitária. Voltan et al. (1992) também encontraram maiores valores de massa foliar específica em folhas de cafeeiro cultivadas a pleno sol. Como mostra o Quadro 3, o teor de óleo essencial variou de 0,1 (70%/outubro) a 0,35% (pleno sol/janeiro), estando de acordo com a literatura, que aponta, em geral, rendimentos de 0,1 a 1,0% do peso das folhas secas, dependendo da origem do material ou dos tratos culturais (Dellacassa et al., 1990; Terblanché & Kornellius, 1996; Ming, 1998; Zoghbi et al., 1998). Considerando que todo o parênquima clorofiliano da folha de *L. alba* apresenta óleo essencial (Figura 8 A-B), pode-se sugerir uma relação direta entre a taxa fotossintética e a produção de óleo essencial nessa espécie. Luminosidade intensa durante o desenvolvimento de folhas de *L. alba* possibilitaria uma atividade fotossintética mais eficiente, indicada por maiores produções de biomassa e de óleo essencial. Em *Anethum graveolens* (Halva et al., 1992), *Thymus vulgaris* (Li et al., 1996) e *Matricaria chamomilla* (Saleh, 1973) o aumento na produção de óleo essencial também está condicionado ao aumento da luminosidade durante o cultivo.

Os dois componentes principais (Y_1 e Y_2) são responsáveis por 93,71% da informação contida no conjunto das cinco variáveis originais analisadas (Quadro 4). Para os dois primeiros componentes principais, as variáveis com maior poder

discriminatório, em ordem decrescente de importância, são: a área foliar, a biomassa foliar e a massa foliar específica. O teor de óleo essencial e a área foliar unitária são variáveis pouco discriminatórias entre os tratamentos.

A interpretação conjunta do dendrograma (Figura 3-A) e da dispersão gráfica dos componentes principais (Figura 3-B), possibilita a formação de grupos entre os tratamentos que apresentam maior similaridade quanto às características de produção de folhas e de óleo essencial, como segue: Grupo I – constituído por plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em outubro, janeiro e abril; Grupo II – constituído por plantas cultivadas sob 30% e 50% de sombreamento e colhidas em outubro, janeiro e abril; Grupo III – plantas cultivadas sob 70% de sombreamento, independente da época de colheita e Grupo IV – plantas cultivadas sob 0, 30 ou 50% de sombreamento e colhidas em julho.

Considerando as condições ambientais que caracterizam o trimestre de rebrota das plantas colhidas em julho (Quadro 2), como menores temperaturas, pouca precipitação e menor radiação solar global em relação aos demais períodos considerados, este revela características de produção similares mesmo entre as plantas cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento. Segundo Paul et al. (1995), em *Rosa damascena*, uma planta aromática produtora de óleo essencial, a produção apresentou correlação com o período de poda, mas a correlação foi negativa com a intensidade de poda. Na coleta de julho, associado às condições ambientais, as plantas sofreram o maior número de podas, todas elas intensas (a 10 cm do solo). O cultivo sob sombreamento intenso (70%) também define características de produção muito similares entre as plantas. Essa similaridade de características também é verificada entre as plantas cultivadas a pleno sol (com exceção das colhidas em julho) e entre as plantas cultivadas sob 30 e 50% de sombreamento.

Quadro 3 Valores médios das características da produção de folhas e de óleo essencial de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Botucatu-SP, 2000.

Tratamentos	Biomassa foliar* (g)	Área foliar* (cm ²)	Área foliar unitária (cm ²)	Massa foliar específica (g.dm ⁻²)	Teor de óleo essencial (mL.kg ⁻¹ MS)
1. 0% - out/97	144,49	18395,98	8,64	0,79	0,21
2. 30% - out/97	82,41	15150,17	14,31	0,54	0,17
3. 50% - out/97	82,45	15663,19	15,42	0,53	0,11
4. 70% - out/97	42,57	10035,82	21,25	0,42	0,10
5. 0% - jan/98	188,23	24089,95	10,33	0,79	0,35
6. 30% - jan/98	116,09	21017,52	14,00	0,56	0,20
7. 50% - jan/98	83,72	15413,58	16,44	0,54	0,20
8. 70% - jan/98	25,91	6290,84	24,13	0,41	0,17
9. 0% - abr/98	161,27	23694,75	12,87	0,68	0,22
10. 30% - abr/98	119,80	21884,29	17,35	0,55	0,20
11. 50% - abr/98	111,93	22159,45	20,06	0,50	0,20
12. 70% - abr/98	41,21	9243,46	23,42	0,45	0,15
13. 0% - jul/98	74,21	9084,93	9,82	0,82	0,29
14. 30% - jul/98	51,46	7927,46	13,19	0,65	0,20
15. 50% - jul/98	44,10	7087,90	14,50	0,62	0,21
16. 70% - jul/98	11,37	2274,46	16,23	0,52	0,11

*obtida em 1 m² de área cultivada

Quadro 4 Correlações entre as 5 variáveis originais referentes à produção de folhas e de óleo essencial em *Lippia alba*, e os dois primeiros componentes principais (Y₁ e Y₂). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y₁ e Y₂, e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.

Variáveis	Y ₁	Y ₂	Ordem
Biomassa foliar	0,9898	0,0952	2
Área foliar	0,9083	0,4108	1
Massa foliar específica	0,6656	-0,7316	3
Área foliar unitária	-0,6401	0,6802	5
Teor de óleo essencial	0,7217	-0,4453	4
% Informação Retida	73,17	20,54	
% Informação Acumulada	73,17	93,71	

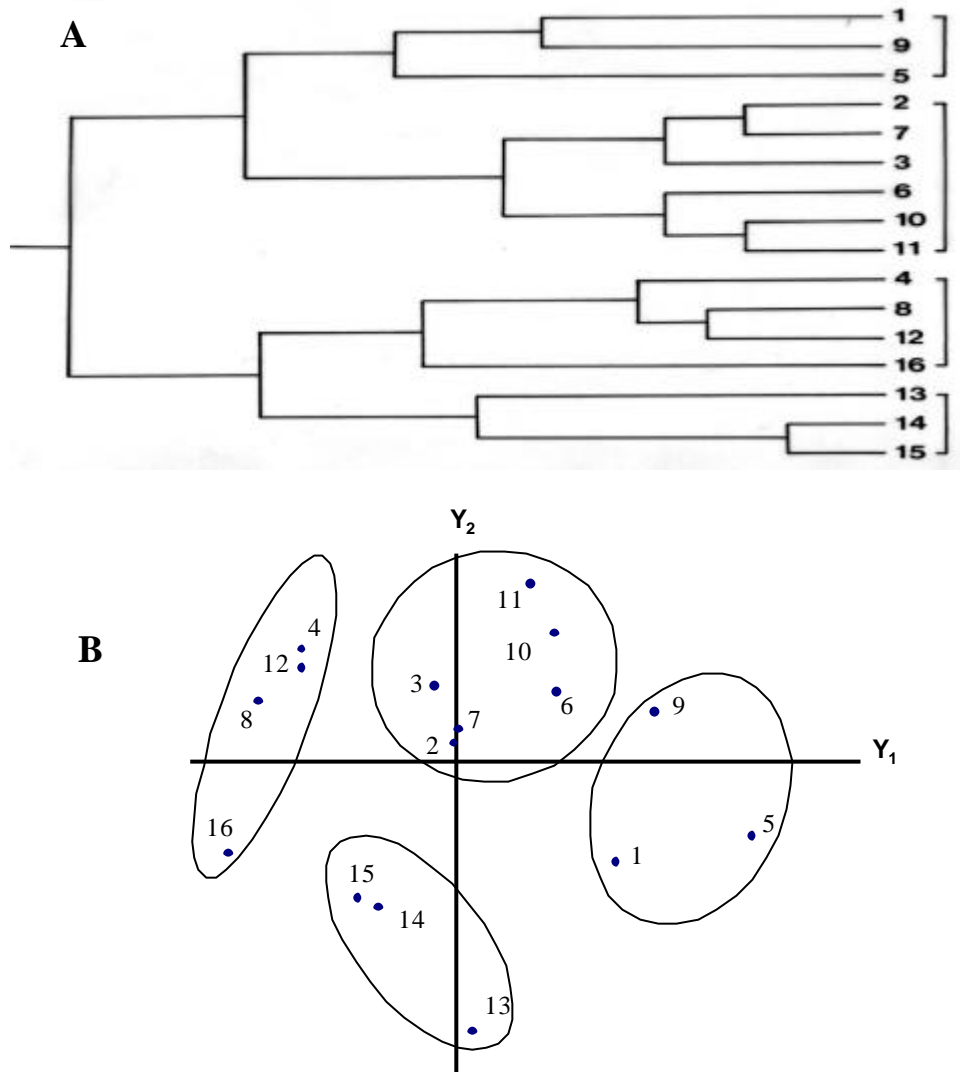


Figura 3 A: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de *Lippia alba*. B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de *L. alba*, utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 5 variáveis referentes à produção de folhas e de óleo essencial. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000.

4.2 Composição do óleo essencial

A Figura 4 apresenta o cromatograma do óleo essencial de folhas de *L. alba* indicando os componentes químicos mais abundantes, enquanto o Quadro 5 apresenta os valores médios de todos os componentes químicos identificados no óleo nos diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. As correlações entre as 9 variáveis originais (9 componentes químicos mais abundantes no óleo) e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), resultantes da Análise de Componentes Principais, são apresentados no Quadro 6.

Para o primeiro componente principal Y_1 , as plantas cultivadas a 0, 30, 50 e 70% de sombreamento e colhidas em outubro, e as plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em julho, com dispersão gráfica representada pela Figura 5-B, apresentam maiores porcentagens de óxido de cariofileno, linalol e t-cariofileno e menores porcentagens de neral e geranial. Por outro lado, plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em janeiro, abril e julho, apresentam maiores porcentagens de neral e geranial e menores porcentagens de óxido de cariofileno, linalol e t-cariofileno. O óleo com abundância de citral, formado pelos isômeros neral e geranial, se assemelha bastante ao óleo de um dos quimiotipos de *L. alba* encontrados por Matos et al. (1996) e por Zoghbi et al. (1998).

Para o segundo componente principal Y_2 , os coeficientes de correlação entre todas as variáveis são muito baixos, de modo que Y_2 não relaciona bem a composição do óleo essencial com os tratamentos.

Os dois componentes principais (Y_1 e Y_2) são responsáveis por 94,73% da informação contida no conjunto das 9 variáveis originais analisadas (Quadro 6). Para os dois primeiros componentes principais, as variáveis com maior poder

discriminatório, em ordem decrescente de importância, são: % de neral, % de geranial, % de óxido de cariofileno, % de linalol e % de t-cariofileno. Os demais compostos analisados estatisticamente são menos discriminatórios entre os tratamentos.

A interpretação conjunta do dendrograma (Figura 5-A) e da dispersão gráfica dos componentes principais (Figura 5-B), possibilita a formação de grupos entre os tratamentos que apresentam maior similaridade quanto à composição do óleo essencial, como segue: Grupo I – constituído por plantas cultivadas sob 0, 30 e 50% de sombreamento e colhidas em outubro; Grupo II – plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em outubro e julho; Grupo III – plantas cultivadas sob 50% de sombreamento e colhidas em julho e plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em abril; Grupo IV – plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em janeiro, abril e julho, e plantas cultivadas sob 50% de sombreamento e colhidas em janeiro; Grupo V – plantas cultivadas sob 30% de sombreamento e colhidas em janeiro, abril e julho, plantas cultivadas sob 50% de sombreamento e colhidas em abril e plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em janeiro.

Pela formação dos grupos entre os tratamentos, pode-se observar claramente que não há um efeito isolado do nível de sombreamento ou da época de colheita sobre a síntese dos componentes químicos do óleo essencial de *L. alba*, mas uma interação entre esses dois fatores, o que impede uma generalização das condições ambientais e de cultivo que favorecem a síntese de um ou de outro composto. Entretanto, pode-se observar que os fatores que condicionam a síntese do óxido de cariofileno, do t-cariofileno e do linalol, os dois primeiros sesquiterpenos e o último um monoterpene, são diferentes dos que direcionam o metabolismo da planta para a síntese do geranial e do neral, ambos monoterpene. A síntese do óxido de cariofileno, do t-cariofileno e do linalol parece estar mais relacionada com condições de maior sombreamento, menor

disponibilidade hídrica e temperatura e radiação solar global relativamente baixas (Quadro 5) que caracterizam os meses que antecedem a colheita de outubro e de julho, enquanto que a síntese do neral e do geranial parece estar mais relacionada com condições de boa luminosidade, boa disponibilidade hídrica, temperatura e radiação solar global mais altas, que caracterizam os meses que antecedem a colheita de janeiro e de abril.

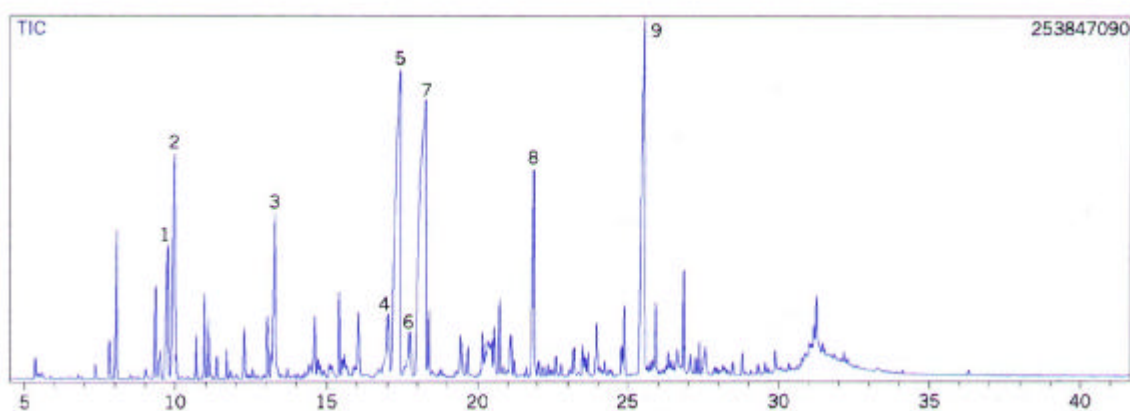


Figura 4 Cromatograma do óleo essencial de folhas de *Lippia alba* (0% sombreamento/janeiro) indicando os principais componentes químicos. 1: 6-metil-5-hepten-2-ona; 2: mirceno; 3: linalol; 4: nerol; 5: neral; 6: geraniol; 7: geranial; 8: t-cariofileno; 9: óxido de cariofileno. Botucatu-SP, 2000.

Quadro 6 Correlações entre as 9 variáveis originais referentes à composição do óleo essencial de folhas de *Lippia alba*, e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 , e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.

Variáveis	Y_1	Y_2	Ordem
% Óxido de cariofileno	0,9469	0,3148	3
% Geranial	-0,9815	0,1758	2
% Neral	-0,9820	0,1835	1
% 6 metil 5 hepten-2-ona	0,4351	-0,3758	6
% Mirceno	-0,2132	-0,3940	9
% t-cariofileno	0,6563	-0,5436	5
% Linalol	0,8732	-0,0547	4
% Geraniol	0,2468	-0,5461	8
% Nerol	0,2803	-0,5398	7
% Informação Retida	87,22	7,51	
% Informação Acumulada	87,22	94,73	

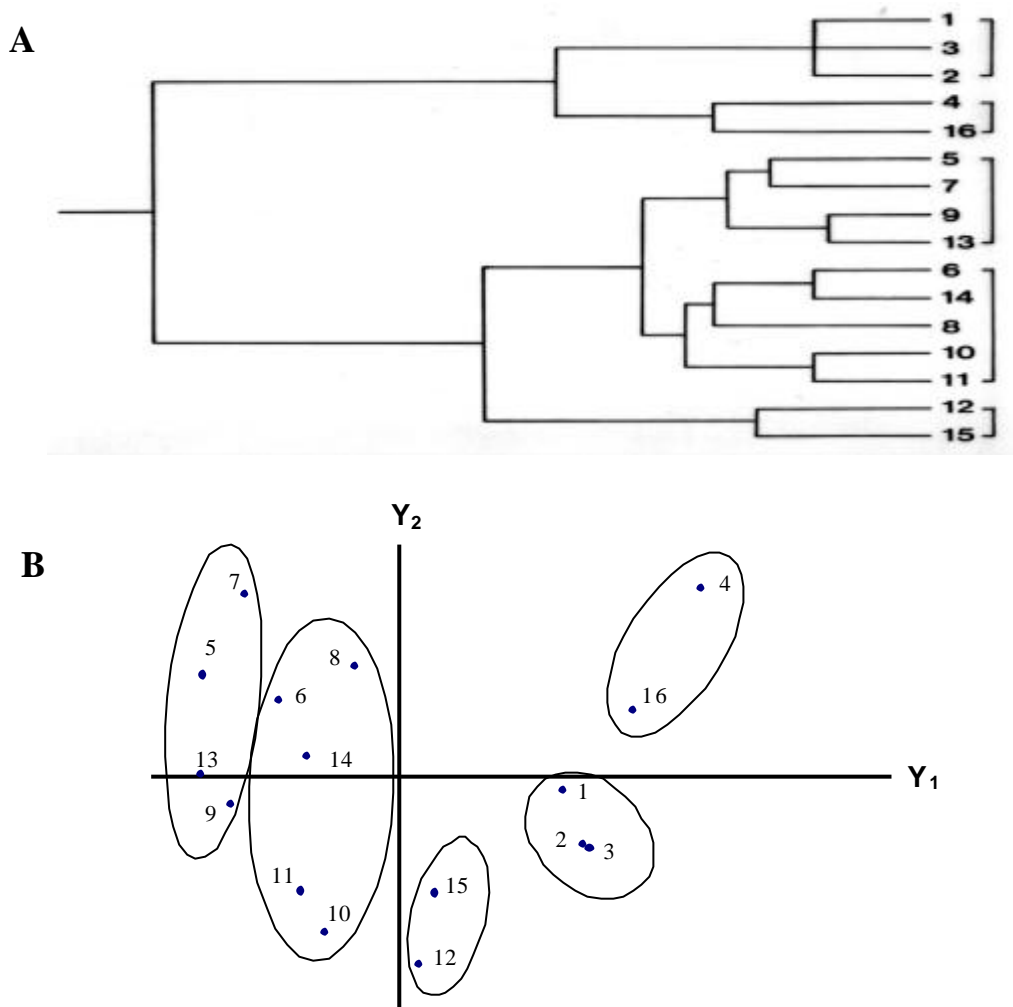


Figura 5 A: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de *Lippia alba*. B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de *L. alba*, utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 9 variáveis referentes à composição do óleo essencial. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000.

4.3 Anatomia foliar

4.3.1 Caracterização anatômica da folha de *Lippia alba*

A anatomia foliar de *L. alba* foi bem explorada por Gomes et al. (1993). Estes autores descrevem a lâmina foliar como anfihipoestomática e pilosa, com células epidérmicas irregulares na região internervural em ambas as faces, sendo curvas na face adaxial (Figura 6-A) e sinuosas e menores na face abaxial (Figura 6B). Os estômatos formam complexos paracíticos, diacíticos e anomocíticos.

As folhas, em ambas as faces, apresentam tricomas tectores, que podem variar de acordo com o número de células basais e tricomas secretores capitados, com número de células basais e da cabeça também variáveis (Figura 7). Nos tricomas secretores pode-se observar a presença de gotas de óleo (Figura 7-D). A cutícula apresenta-se mais espessa na epiderme da face adaxial que na abaxial (Figura 8A,B), com estrias epicuticulares em ambas as faces. A Figura 8-C permite a visualização das estrias epicuticulares em corte transversal, na região da nervura central.

O mesofilo caracteriza-se pelo parênquima paliçádico em contato com a face adaxial e pelo parênquima lacunoso na face abaxial (Figura 9B), ambos apresentando gotas de óleo, evidenciadas pela tonalidade laranja-avermelhada que o corante Sudan IV confere, como mostra a Figura 8. Os feixes vasculares de pequeno porte são envolvidos por uma bainha parenquimática sem cloroplastos (Figura 9-B).

Na região do bordo, os estômatos e tricomas estão ausentes, e em posição subepidérmica estão presentes o parênquima clorofiliano e feixes vasculares de pequeno porte.

A nervura central, em corte transversal, é proeminente em ambas as faces, apresentando o sistema vascular colateral em forma de arco central com um ou mais feixes vasculares menores voltados à face adaxial (Figuras 9-A, 13 e 14). Acompanhando o sistema vascular, aparece uma bainha interrompida sobre o floema, formada por células pequenas, precursoras de fibras. Os tricomas tectores e secretores também estão presentes na nervura central.

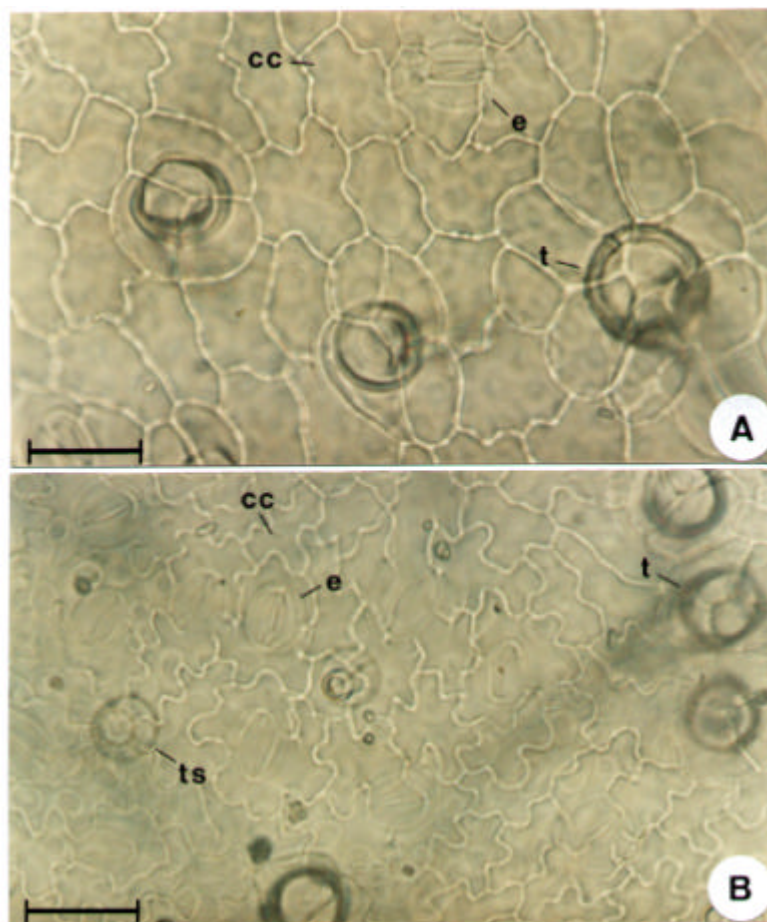


Figura 6 Epiderme da face adaxial (A) e da face abaxial (B) da folha de *Lippia alba*. Célula comum da epiderme (cc); estômato (e); tricoma tector (t); tricoma secretor (ts). Barra= 50 μ m. Botucatu-SP, 2000.

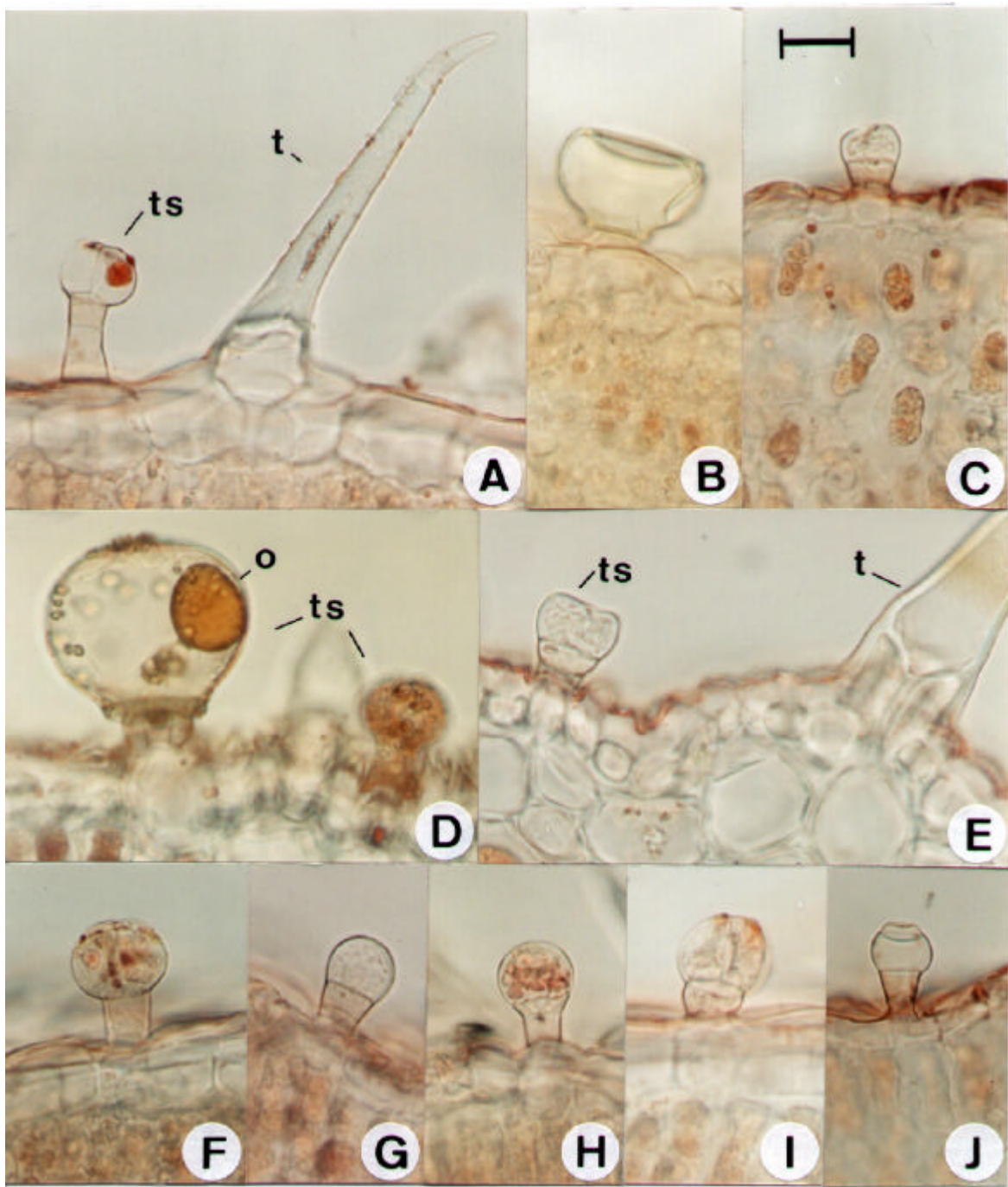


Figura 7 (A-J) Tricomas observados em seções transversais da folha de *Lippia alba*. Tricoma tector (t); tricoma secretor (ts); óleo essencial (o). Barra= 25µm. Botucatu-SP, 2000.

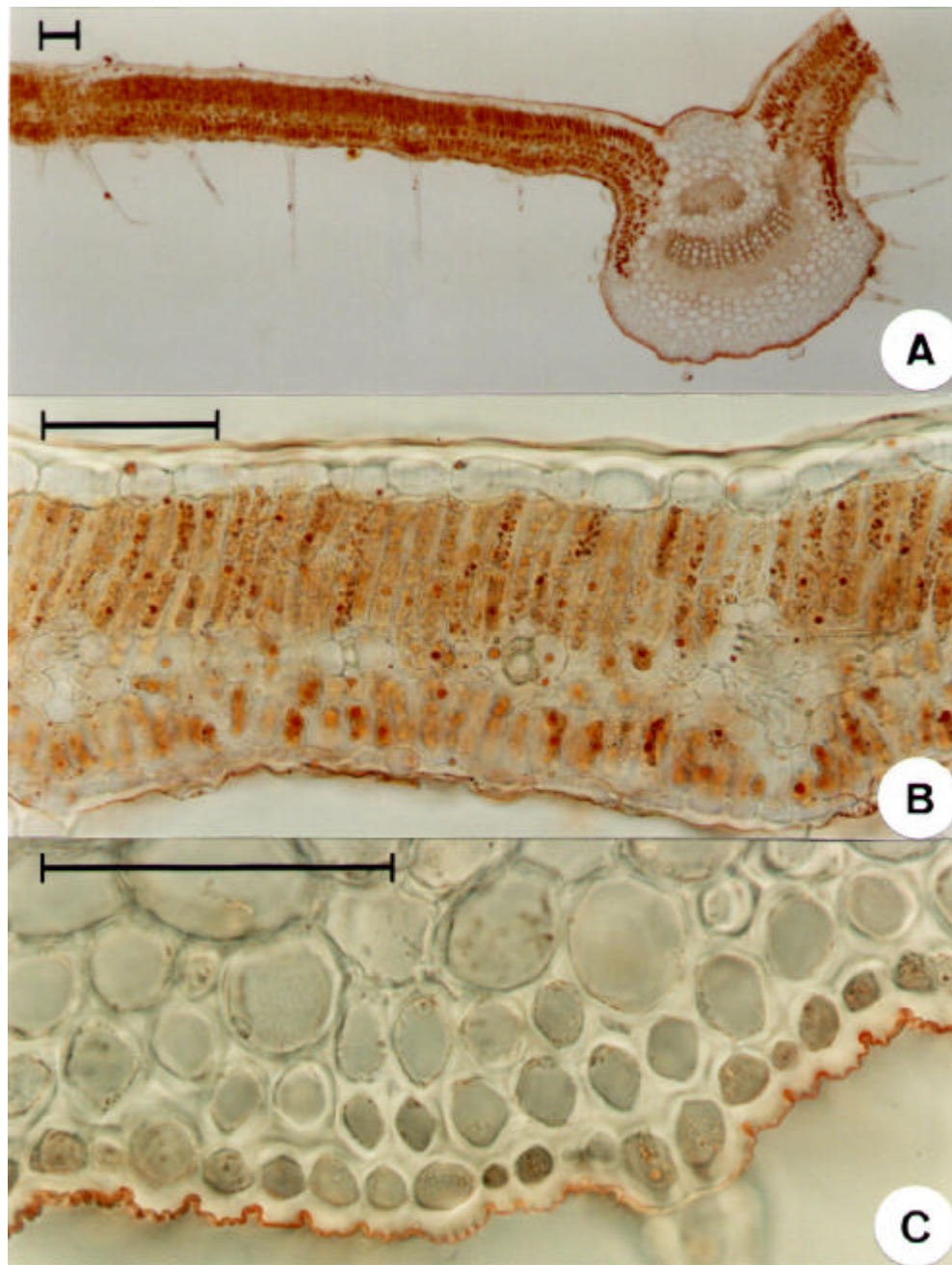


Figura 8 Seções transversais da folha de *Lippia alba* mostrando o limbo (A e B) e a nervura principal (A e C). Em A e B, observam-se os parênquimas lacunoso e paliçádico apresentando óleo essencial evidenciado pela cor laranja-avermelhada conferida pelo corante sudan IV. Em C, observam-se as estrias epicuticulares. Barra= 125 μ m. Botucatu-SP, 2000.

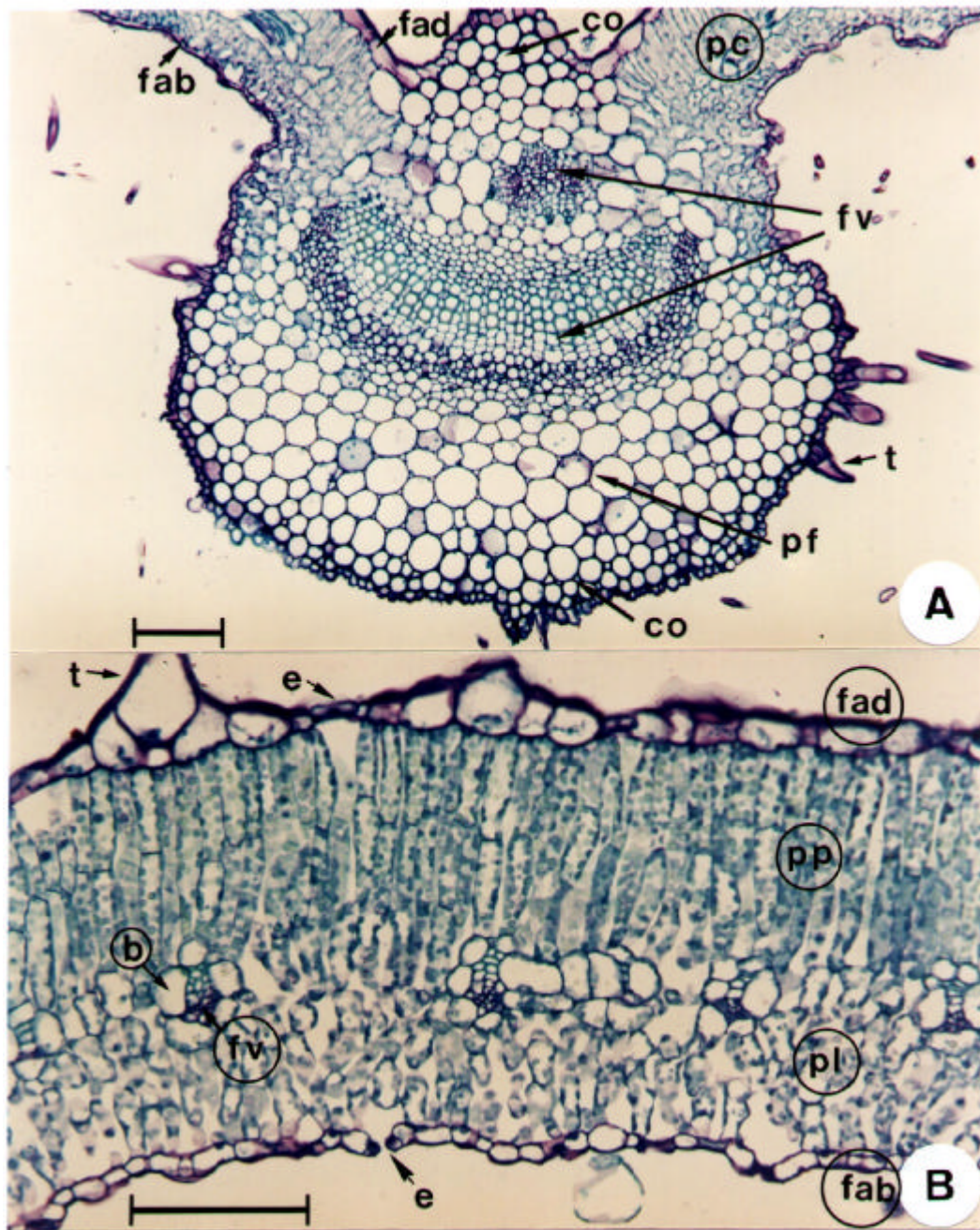


Figura 9 Seção transversal da nervura principal (A) e do limbo (B) da folha de *Lippia alba*. Epiderme da face adaxial (fad); epiderme da face abaxial (fab); colênquima (co); parênquima fundamental (pf); parênquima clorofiliano (pc); feixe vascular (fv); tricoma (t); estômato (e); bainha do feixe vascular (b); parênquima paliçádico (pp); parênquima lacunoso (pl). Barra= 125 μ m. Botucatu-SP, 2000.

4.3.2 Anatomia quantitativa da região do limbo foliar

Um perfil da configuração anatômica da seção transversal do limbo foliar de *L. alba* nos diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita pode ser observado na Figura 10. Os diagramas representativos da seção transversal do limbo foliar nos diferentes tratamentos, indicando a delimitação dos tecidos mensurados na avaliação anatômica quantitativa podem ser observados através da Figura 11.

O Quadro 7 apresenta os valores médios das características anatômicas da seção transversal do limbo foliar de *L. alba* nos diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. As correlações entre as 12 variáveis originais (características anatômicas) e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), resultantes da Análise de Componentes Principais, estão apresentados no Quadro 8.

Para o primeiro componente principal Y_1 , observa-se que as plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em janeiro e abril, com dispersão gráfica representada pela Figura 12-B, apresentam maiores porcentagens da extensão da bainha do feixe vascular, uma vez que essa variável apresenta elevado coeficiente de correlação (próximo de 1). Segundo Mauseth (1988), o principal papel da extensão da bainha do feixe vascular em uma folha seria a distribuição de água do xilema para o mesófilo, sendo que o movimento de água das nervuras para a epiderme ocorreria por simples ação da capilaridade do apoplasto. Para Esau (1982), plantas mesomórficas que se desenvolvem sob luz intensa e desenvolvem um certo grau de xeromorfismo apresentariam menor frequência de extensões da bainha do feixe, provavelmente como medida contra a perda excessiva de água. Thompson et al. (1992) verificaram um aumento das células da extensão da bainha em plantas de *Argyrodendron*

cultivadas sob iluminação intensa, e segundo os autores, facilitaria e filtraria a radiação solar incidente.

No entanto, quando cultivadas a pleno sol e colhidas em outubro e julho, *L. alba* desenvolve folhas com menor proporção de extensão da bainha do feixe, reforçando o efeito da época que antecede a colheita, e não apenas do sombreamento, na configuração anatômica. Tanto o trimestre que antecede a colheita de outubro, como o trimestre que antecede a colheita de julho apresenta menores valores de radiação solar global, de precipitação e de temperatura, o que poderia alterar o efeito dos tratamentos com 100% de luz nessas épocas em relação aos demais tratamentos.

Dois outros fatores ainda devem ser considerados na análise da proporção da extensão da bainha do feixe nos diferentes tratamentos: a descontinuidade deste tecido ao longo das nervuras e o padrão de venação da folha. Com um padrão de venação do tipo caspedódroma (Gomes et al., 1990) a possibilidade de um corte transversal de folha atingir a extensão da bainha tangencialmente ou transversalmente é muito grande.

Através do Quadro 8, observa-se para o segundo componente principal Y_2 , que as plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em outubro, janeiro e abril e cultivadas sob 30% de sombreamento e colhidas em abril, com dispersão gráfica representada pela Figura 12-B, apresentam maior porcentagem da epiderme da face abaxial e adaxial e menor área total da seção transversal do limbo, menor porcentagem de parênquima paliçádico e menor comprimento das células do parênquima paliçádico. Assim como o efeito do sombreamento intenso no desenvolvimento das folhas resulta numa massa foliar específica menor, é de se esperar uma menor área da seção transversal do limbo, que também pode ser comparada à espessura da folha. A diminuição da espessura da folha e da porcentagem de

parênquima paliçádico em folhas submetidas a sombreamento são consideradas evidências nítidas da plasticidade foliar nessas condições (Esau, 1982; Fahn, 1982; Cutter, 1987; Mauseth, 1988; Ashton & Berlyn, 1992, 1994; Strauss-Debenedetti & Berlyn, 1994; Crawley, 1997). A diminuição do parênquima paliçádico em folhas sombreadas sugere o menor alongamento das células deste tecido ou o aumento do número de camadas de células (Ashton & Berlyn, 1992; Strauss-Debenedetti & Berlyn, 1994). Em *L. alba*, a menor porcentagem de parênquima paliçádico em folhas de plantas submetidas a sombreamento mais intenso (70%) parece estar relacionada com o menor alongamento das células deste tecido, pois apresentaram-se mais curtas. De modo geral, o aumento da proporção do parênquima paliçádico em plantas desenvolvidas a pleno sol parece estar associada a uma melhor propagação e distribuição da luz através do mesofilo e uma maior taxa fotossintética por unidade de área foliar (Smith et al., 1997). Em folhas mais sombreadas, com menor disponibilidade de radiação solar, a propagação e distribuição da luz incidente se dá satisfatoriamente em menor proporção de parênquima paliçádico. A proporção do parênquima lacunoso, não apresentou alta correlação com os níveis de sombreamento ou épocas de colheita, embora a plasticidade deste tecido seja melhor caracterizada pela variação na quantidade de espaços intercelulares e, conseqüentemente, na difusão da luz e absorção de gás carbônico, de acordo com o ambiente (Smith et al., 1997). Strauss- Debenedetti & Berlyn (1994) sugerem que o aumento da proporção do parênquima paliçádico em folhas sob iluminação intensa favoreceria um balanço hídrico mais eficiente.

Considerando-se o parênquima clorofiliano como a principal região produtora de óleo essencial em *L. alba*, o aumento da proporção do parênquima paliçádico sugere que haja incremento na produção deste metabólito em condições de alta luminosidade.

Embora haja interação das épocas de colheita com os níveis de sombreamento, as médias da produção de óleo essencial apresentadas no Quadro 3 mostram nitidamente essa tendência.

A maior porcentagem da epiderme das faces abaxial e adaxial da folha de plantas submetidas a sombreamento intenso também foi verificada por Voltan et al. (1992) em cafeeiros. Para outros autores, a plasticidade na espessura da epiderme de ambas as faces da folha está estreitamente relacionada à tolerância da espécie às condições de sol ou de sombra, sendo que para espécies adaptadas à luminosidade intensa, a espessura da epiderme aumentaria com os acréscimos de luz (Ashton & Berlyn, 1992).

Apesar das especulações sobre os efeitos do sombreamento sobre a plasticidade do limbo foliar, deve-se considerar que não houve efeito isolado do sombreamento ou da época de colheita, mas uma interação.

Os dois componentes principais (Y_1 e Y_2) são responsáveis por 78,40% da informação contida no conjunto das 12 variáveis originais analisadas (Quadro 8). Para os dois primeiros componentes principais, as variáveis com maior poder discriminatório, em ordem decrescente de importância, são: a porcentagem da extensão da bainha do feixe vascular, da epiderme da face adaxial, o comprimento das células do parênquima paliádico, a espessura da epiderme da face adaxial e área total da seção transversal do limbo. A interpretação conjunta do dendrograma (Figura 12-A) e da dispersão gráfica dos componentes principais (Figura 12-B), possibilita a formação de grupos entre os tratamentos que apresentam maior similaridade quanto às características anatômicas da seção transversal do limbo, como segue: Grupo I – constituído por plantas cultivadas a 0, 30 e 50% de sombreamento e colhidas em outubro e em julho e plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em julho; Grupo II – constituído por plantas cultivadas sob 30% de

sombreamento e colhidas em abril, plantas cultivadas sob 50% de sombreamento e colhidas em janeiro e plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em outubro, janeiro e abril; Grupo III – constituído por plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em janeiro e abril, plantas cultivadas sob 30% de sombreamento e colhidas em janeiro e plantas cultivadas sob 50% de sombreamento e colhidas em abril.

A contagem de estômatos, tricomas tectores e tricomas glandulares em ambas as faces da folha, nos diferentes níveis de sombreamento é apresentada nos Quadros 9, 10 e 11, respectivamente. Os dados revelam que o número de estômatos, na epiderme da face abaxial, é menor quando as plantas são cultivadas sob 70% de sombreamento. Na epiderme da face adaxial, a variação no número de estômatos não parece estabelecer uma relação direta com os diferentes níveis de sombreamento. O maior número de estômatos na epiderme abaxial confirma seu caráter anfihipoestomático (Gomes et al., 1990). A densidade dos tricomas tectores foi estatisticamente semelhante entre os níveis de sombreamento e as faces do limbo foliar. Já o número de tricomas secretores diminuiu gradativamente com a intensidade de sombreamento na epiderme da face abaxial, onde são mais abundantes. Na epiderme da face adaxial, a densidade de tricomas secretores manteve-se constante mesmo sob a variação da intensidade luminosa no cultivo.

Vários autores relatam o aumento da indumentação e, principalmente, da densidade de estômatos em folhas de plantas cultivadas sob iluminação intensa (Esau, 1982; Fahn, 1979; 1982; Crawley, 1997). Isso seria consequência da diminuição do tamanho das células da folha, aumentando assim o número de estômatos por unidade de área (Ashton & Berlyn, 1992) ou uma demanda fisiológica para proporcionar um suprimento mais intenso de

dióxido de carbono, sustentando uma maior taxa fotossintética nessas condições (Smith et al., 1997).

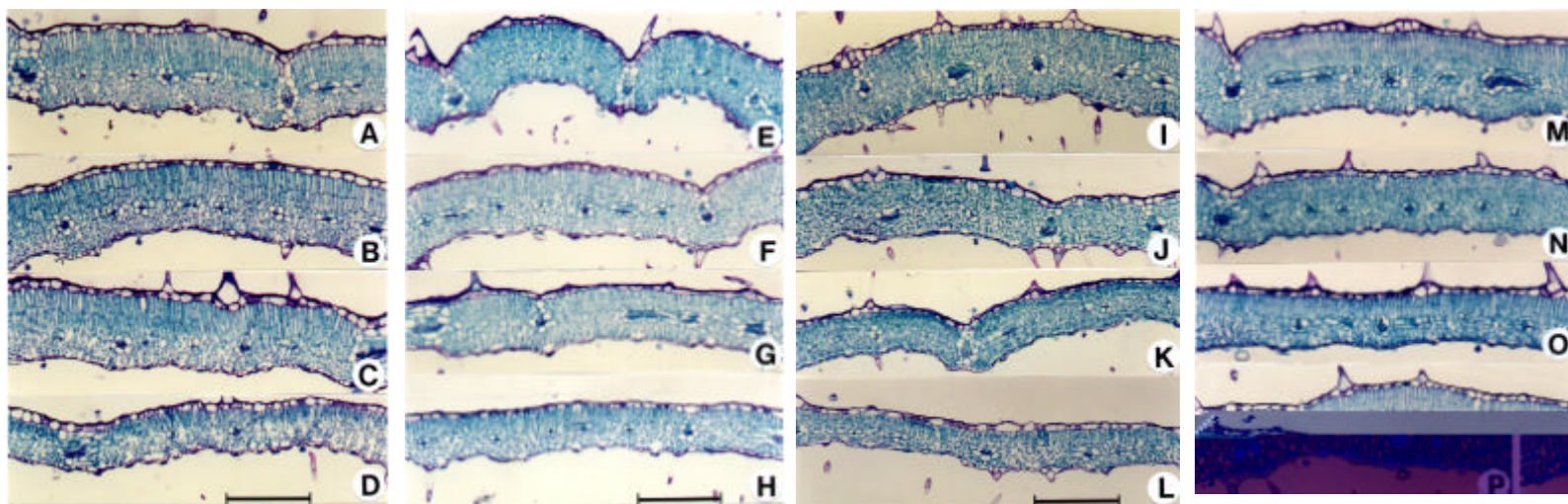


Figura 10 Seções transversais do limbo foliar de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=300 μ m. Botucatu-SP, 2000.

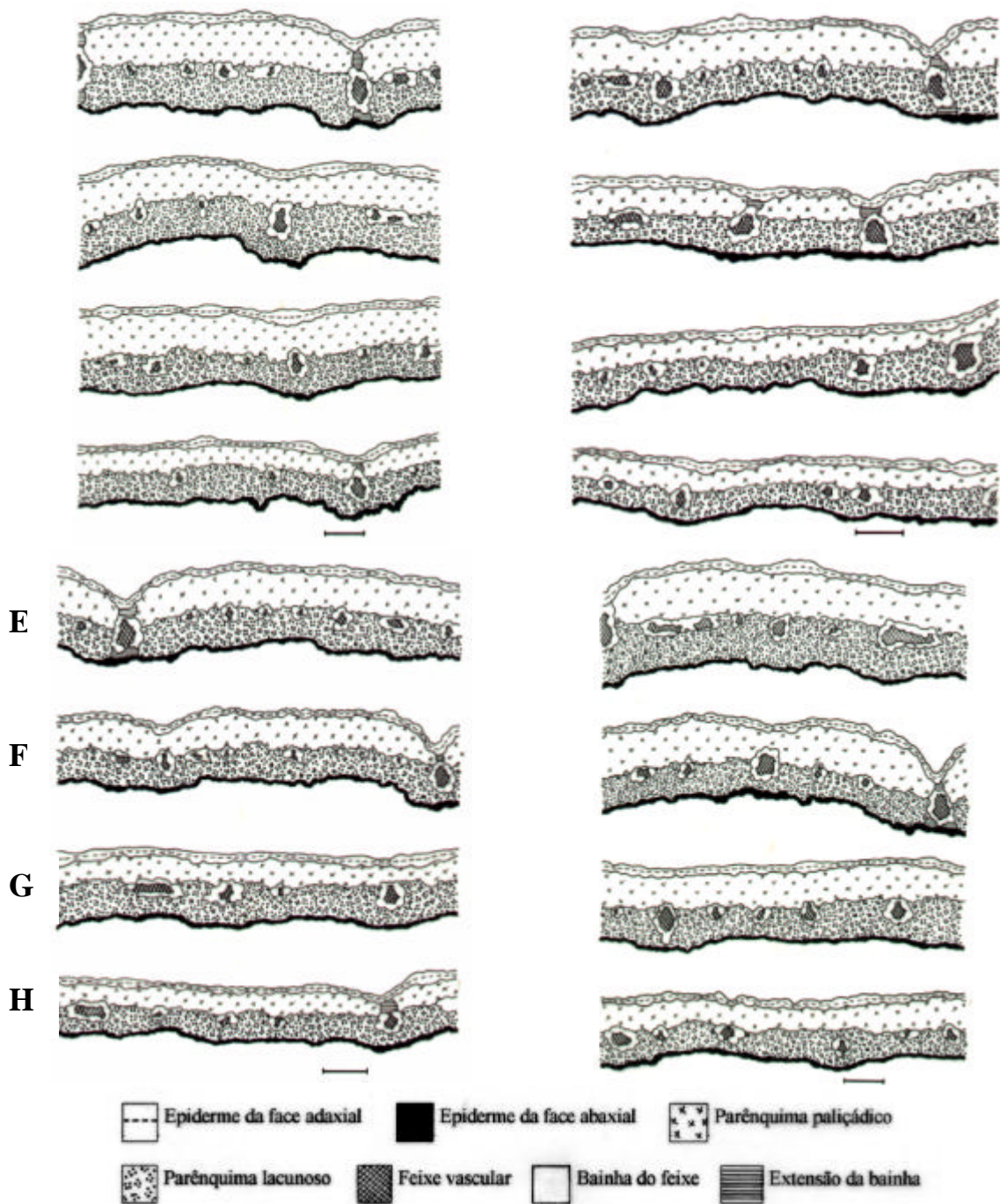


Figura 11 Diagramas representativos de seções transversais do limbo foliar de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=100 μ m. Botucatu-SP, 2000.

Quadro 7 Valores médios das características anatômicas da seção transversal do limbo foliar de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Botucatu-SP, 2000.

Tratamentos		Epiderme da face abaxial (%)	Epiderme da face adaxial (%)	Parênquima paliçádico (%)	Parênquima lacunoso (%)	Bainha do feixe vascular (%)	Feixe vascular (%)	Extensão da bainha (%)	Área total do limbo (mm ² .10 ⁻⁴)	Espessura epiderme da face abaxial (mm.10 ⁻⁴)	Espessura da epiderme da face adaxial (mm.10 ⁻⁴)	Largura das células do parênq. paliçádico (mm.10 ⁻⁴)	Comprimento das células do parênq. paliçádico (mm.10 ⁻⁴)
1.	0% - out/97	4,20	8,23	40,63	36,85	6,96	2,49	0,64	2171,64	93,11	207,40	97,70	440,82
2.	30% - out/97	4,40	10,06	41,73	35,89	6,22	1,65	0,06	1807,93	80,61	200,25	93,88	388,26
3.	50% - out/97	4,97	9,51	44,10	32,18	6,76	2,23	0,24	1724,21	86,22	178,06	88,01	419,39
4.	70% - out/97	6,87	12,44	35,67	37,13	5,76	1,82	0,30	1431,40	95,92	187,24	102,55	368,37
5.	0% - jan/98	5,90	9,54	40,46	34,51	6,16	2,22	1,21	1778,82	103,57	173,72	78,57	362,04
6.	30% - jan/98	5,37	9,14	40,30	36,09	6,39	1,86	0,86	1548,42	82,14	160,20	92,35	363,26
7.	50% - jan/98	5,39	10,64	36,07	38,81	6,70	2,19	0,20	1483,58	77,55	165,31	88,77	335,20
8.	70% - jan/98	6,70	11,95	35,14	37,50	6,50	1,87	0,32	1314,43	84,18	170,15	84,44	308,67
9.	0% - abr/98	5,34	10,29	38,49	36,61	6,03	2,04	1,20	1652,71	91,33	179,59	87,75	355,61
10.	30% - abr/98	6,00	12,23	36,83	36,75	5,76	1,99	0,44	1368,27	95,66	179,34	83,16	292,65
11.	50% - abr/98	6,29	11,57	37,00	33,55	8,07	2,76	0,76	1375,80	92,35	163,52	82,14	319,90
12.	70% - abr/98	7,36	11,87	34,21	37,95	6,20	2,04	0,37	1272,59	88,77	156,89	90,05	294,08
13.	0% - jul/98	4,33	8,79	41,89	36,09	6,32	2,28	0,30	2170,93	83,16	185,71	96,17	471,22
14.	30% - jul/98	5,24	10,06	41,51	34,11	5,89	2,51	0,68	1834,31	89,54	191,33	95,66	422,24
15.	50% - jul/98	5,40	10,36	42,39	32,80	6,12	2,71	0,22	1720,20	94,90	192,09	88,77	435,20
16.	70% - jul/98	6,00	11,63	39,36	35,75	4,78	2,24	0,23	1550,28	93,11	195,66	101,53	487,75

Quadro 8 Correlações entre as 12 variáveis originais referentes à anatomia da seção transversal do limbo foliar de *Lippia alba*, e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 , e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.

Variáveis	Y_1	Y_2	Ordem
% Epiderme da face abaxial	0,0218	0,9031	7
% Epiderme da face adaxial	-0,2801	0,8557	2
% Parênquima paliçádico	0,0138	-0,8661	8
% Parênquima lacunoso	-0,1335	0,4046	11
% Bainha do feixe vascular	0,2095	-0,0080	12
% Feixe vascular	0,1816	-0,3740	10
% Extensão da bainha do feixe vascular	0,9978	-0,0019	1
Área total da seção transversal do limbo	0,0857	-0,9589	5
Espessura da epiderme da face abaxial	0,4536	0,0717	9
Espessura da epiderme da face adaxial	-0,2706	-0,6834	4
Largura das células do parênq. paliçádico	-0,4444	-0,3764	6
Comprimento das células do parênq. paliçádico	-0,2236	-0,8538	3
% Informação Retida	48,28	30,12	
% Informação Acumulada	48,28	78,40	

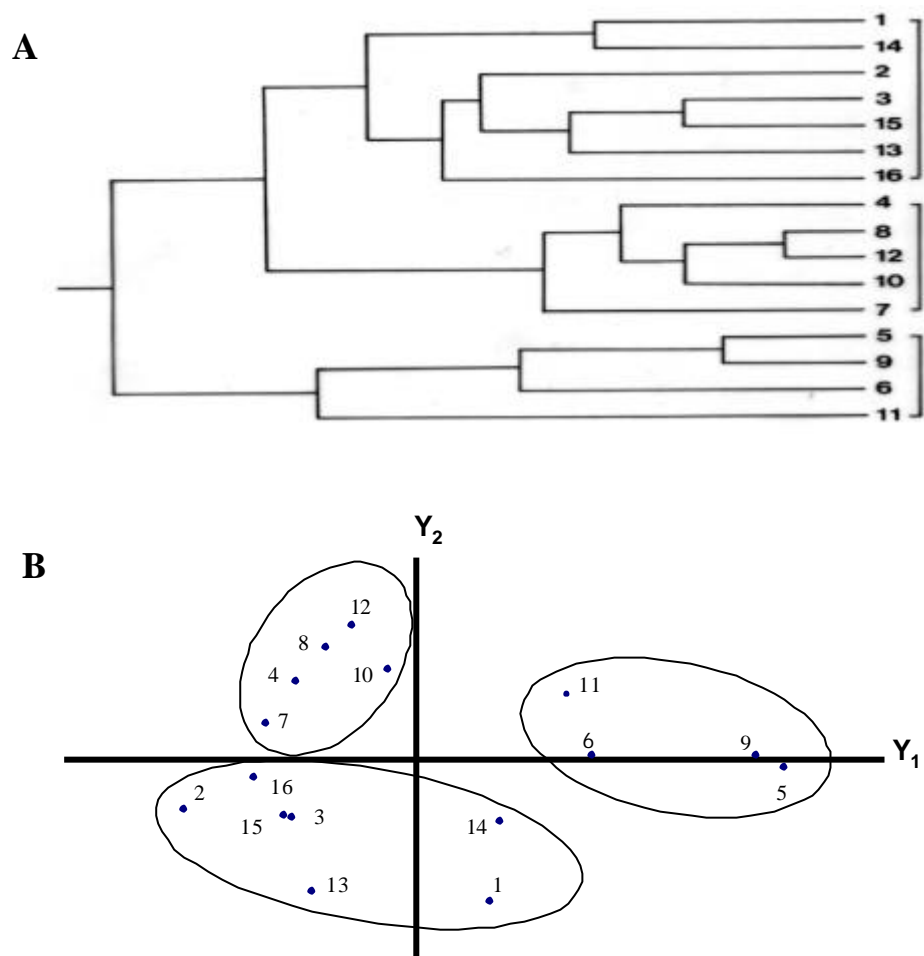


Figura 12 A: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de *Lippia alba*. B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de *L. alba*, utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 12 variáveis referentes à anatomia da seção transversal do limbo foliar. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000.

Quadro 9 Número de estômatos por $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$ da superfície do limbo foliar de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento. Botucatu-SP, 2000.

Fases do limbo foliar	Níveis de sombreamento			
	0%	30%	50%	70%
Adaxial	6611,11 Ab	2055,55 Bb	3833,33 ABb	2333,33 Bb
Abaxial	44777,78 Aa	44888,89 Aa	45333,33 Aa	28444,44 Ba

CV para nível de sombreamento: 12,98%

CV para face do limbo: 10,16%

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, em cada linha, e de mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 10 Número de tricomas tectores por $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$ da superfície do limbo foliar de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento. Botucatu-SP, 2000.

Fases do limbo foliar	Níveis de sombreamento				Média
	0%	30%	50%	70%	
Adaxial	5000,00	4333,33	4722,22	4361,11	4604,16 a
Abaxial	5333,33	4555,55	4666,66	4666,66	4805,55 a
Média	5166,66 A	4444,44 A	4694,44 A	4513,88 A	

CV para nível de sombreamento: 16,57%

CV para face do limbo: 17,31%

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, em cada linha, e de mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 11 Número de tricomas secretores por $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$ da superfície do limbo foliar de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento. Botucatu-SP, 2000.

Fases do limbo foliar	Níveis de sombreamento			
	0%	30%	50%	70%
Adaxial	1444,44 Ab	1083,33 Ab	666,66 Ab	1027,78 Ab
Abaxial	7111,11 Aa	6222,22 ABa	4222,22 BCa	3555,55 Ca

CV para nível de sombreamento: 17,28%

CV para face do limbo: 13,16%

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, em cada linha, e de mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.3.3 Anatomia quantitativa da região da nervura central

Através da Figura 13, pode-se ter uma visão geral da configuração anatômica da seção transversal da nervura principal da folha de *L. alba* nos diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Os diagramas representativos da seção transversal da nervura principal (Figura 14), indicando a delimitação dos tecidos mensurados na avaliação anatômica quantitativa também ilustram a plasticidade anatômica dessa região nos diferentes tratamentos.

O Quadro 12 apresenta os valores médios das características anatômicas da seção transversal da nervura principal da folha de *L. alba* nos diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. As correlações entre as 7 variáveis originais e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), resultantes da Análise de Componentes Principais, são apresentados no Quadro 13.

Para o primeiro componente principal Y_1 , as plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em outubro, janeiro, abril e julho, com dispersão gráfica representada pela Figura 15-B, apresentam maior porcentagem de parênquima clorofiliano e menor área total da seção transversal da nervura e menor porcentagem de parênquima fundamental.

A menor área da seção transversal da nervura, acompanhada da diminuição do parênquima fundamental nas plantas cultivadas a pleno sol é observada facilmente nas Figuras 13 e 14. Através da dispersão gráfica dos componentes principais (Figura 15-B), observa-se que, à medida que aumenta o sombreamento sobre as plantas, os respectivos tratamentos adquirem valores cada vez menores para Y_1 e, conseqüentemente, maiores valores para a área total de seção transversal da nervura e maior porcentagem de

parênquima fundamental. Considerando que as folhas de plantas cultivadas sob sombreamentos mais intensos apresentam maior área foliar unitária, o aumento da seção transversal da nervura pode ser interpretado como uma estratégia morfológica/ mecânica para equilibrar a arquitetura foliar. A diminuição do parênquima clorofiliano na nervura principal em condições de maior sombreamento é lógica, uma vez que esse tecido, formado pelos parênquimas paliádico e lacunoso, é uma extensão do limbo foliar, que também diminui em espessura nessa situação. Embora a porcentagem de parênquima clorofiliano (8,37 a 20,47%) seja pequena em relação à área total da seção transversal da nervura, pode-se atribuir uma maior produção de óleo essencial nessa região quando as plantas estão sob iluminação intensa.

Observa-se, para o segundo componente principal Y_2 , que as plantas cultivadas sob 0, 30, 50 e 70% de sombreamento e colhidas em julho, e plantas cultivadas sob 30% de sombreamento e colhidas em outubro, com dispersão gráfica representada pela Figura 15-B, apresentam menor porcentagem de colênquima (Quadro 13). Sendo o colênquima um tecido de sustentação, a menor porcentagem deste tecido nas plantas colhidas em julho (inverno), pode estar relacionada a uma taxa de expansão foliar mais lenta, ditada por menores temperaturas e menor precipitação no trimestre que antecedeu a colheita (Quadro 2).

Os dois componentes principais (Y_1 e Y_2) são responsáveis por 80,05% da informação contida no conjunto das 7 variáveis originais analisadas (Quadro 13). Para os dois primeiros componentes principais, as variáveis com maior poder discriminatório, em ordem decrescente de importância, são: porcentagem de parênquima clorofiliano, área total da seção transversal da nervura, porcentagem de parênquima fundamental e porcentagem de colênquima.

A interpretação conjunta do dendrograma (Figura 15-A) e da dispersão gráfica dos componentes principais (Figura 15-B), possibilita a formação de grupos entre os tratamentos que apresentam maior similaridade quanto às características anatômicas da seção transversal da nervura principal, como segue: Grupo I – constituído por plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em outubro e julho, plantas cultivadas sob 30 e 50% de sombreamento e colhidas em outubro; Grupo II – constituído por plantas cultivadas sob 30% de sombreamento e colhidas em abril e julho, plantas cultivadas sob 50% de sombreamento e colhidas em julho, e plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em outubro e julho; Grupo III – constituído por plantas cultivadas sob 50% de sombreamento e colhidas em janeiro e abril, plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em janeiro; Grupo IV – constituído por plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em abril e plantas cultivadas sob 30% de sombreamento e colhidas em janeiro; Grupo V – constituído por plantas cultivadas sob 70% de sombreamento e colhidas em abril; Grupo VI – constituído por plantas cultivadas a pleno sol e colhidas em janeiro.

Pelos agrupamentos formados pode-se verificar que a interação entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita formam as mais variadas combinações de características ambientais, refletindo na plasticidade da nervura principal da folha.

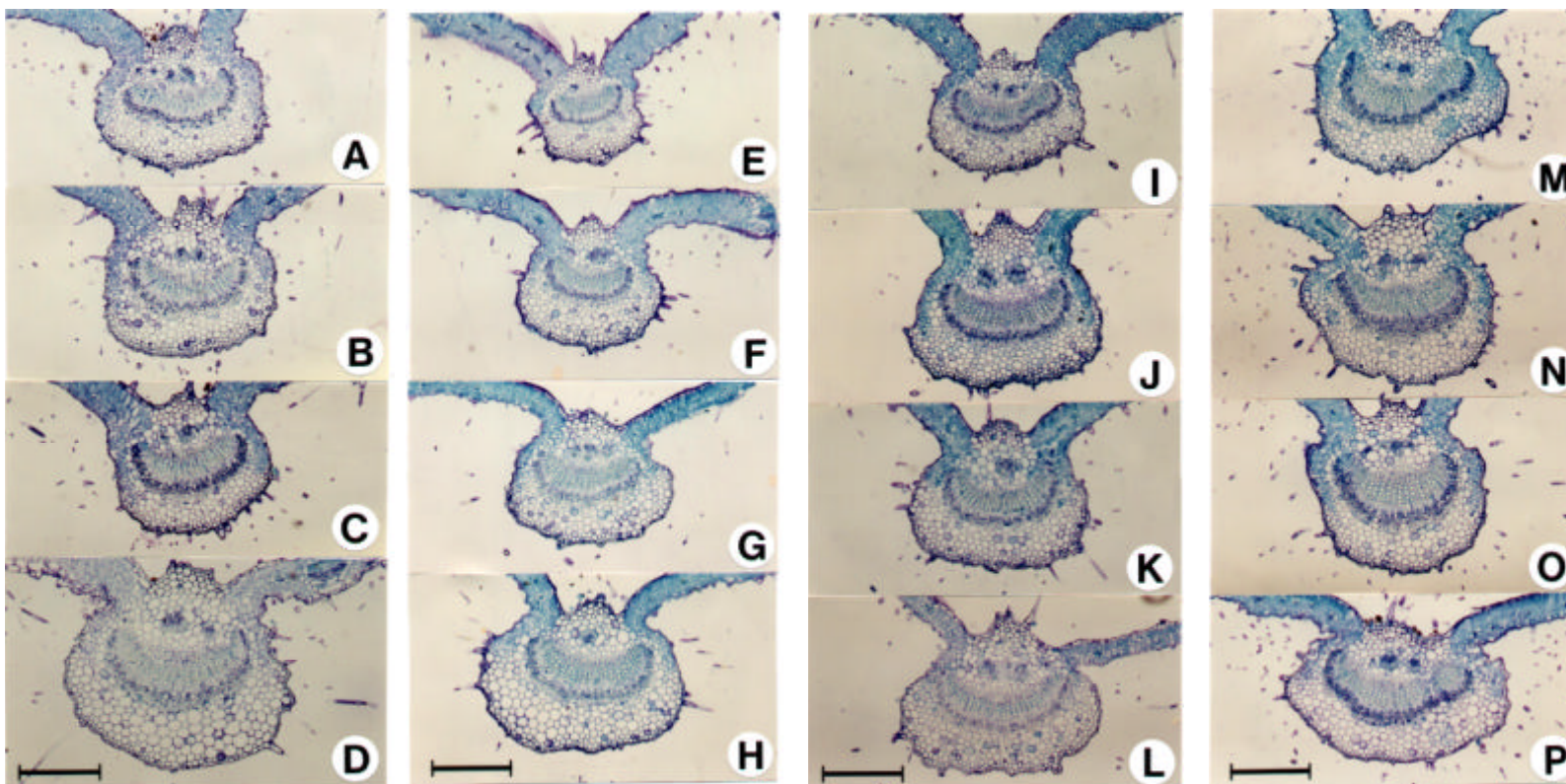


Figura 13 Seções transversais da nervura central da folha de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=500 μ m. Botucatu-SP, 2000.

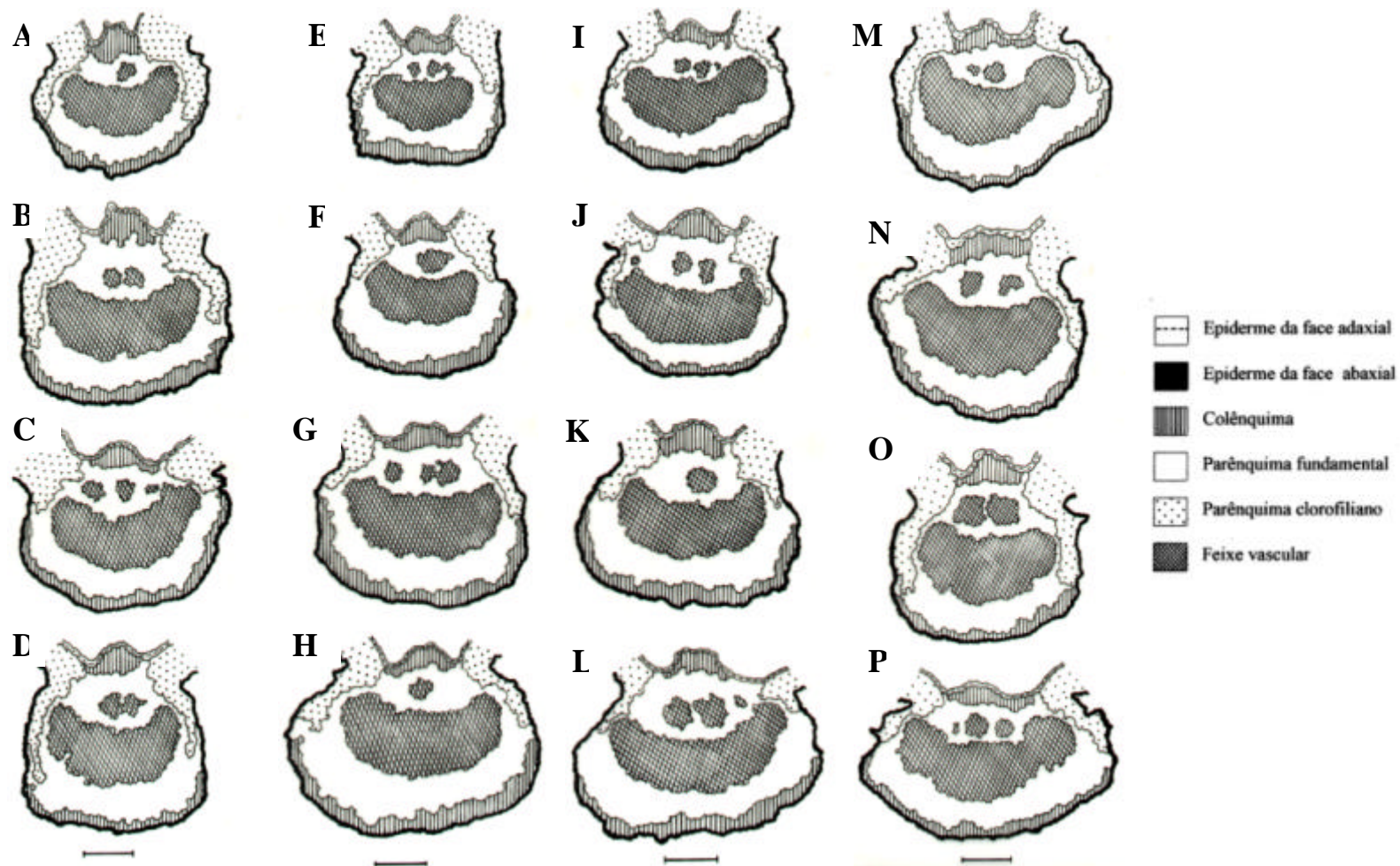


Figura 14 Diagramas representativos de seções transversais da nervura central da folha de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. A- 0% (outubro/97); B- 30% (outubro/97); C- 50% (outubro/97); D- 70% (outubro/97); E- 0% (janeiro/98); F- 30% (janeiro/98); G- 50% (janeiro/98); H- 70% (janeiro/98); I- 0% (abril/98); J- 30% (abril/98); K- 50% (abril/98); L- 70% (abril/98); M- 0% (julho/98); N- 30% (julho/98); O- 50% (julho/98); P- 70% (julho/98). Barra=200µm. Botucatu-SP, 2000.

Quadro 12 Valores médios das características anatômicas da seção transversal da nervura principal da folha de *Lippia alba* em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. Botucatu-SP, 2000.

Tratamentos		Epiderme da face abaxial (%)	Epiderme da face adaxial (%)	Parênquima fundamental (%)	Parênquima clorofiliano (%)	Colênquima (%)	Feixe vascular (%)	Área total da nervura (mm ² .10 ⁻⁴)
1.	0% - out/97	5,00	1,83	37,83	18,18	12,12	25,03	3222,19
2.	30% - out/97	4,66	1,69	37,54	16,06	11,98	28,06	4835,55
3.	50% - out/97	4,76	2,04	35,92	15,55	12,11	29,62	3870,19
4.	70% - out/97	4,97	2,10	44,57	11,26	10,17	26,93	5095,74
5.	0% - jan/98	6,45	2,11	33,98	17,02	16,12	24,32	2481,90
6.	30% - jan/98	4,80	2,13	45,08	8,64	13,85	25,50	3572,02
7.	50% - jan/98	4,42	1,70	38,18	11,46	15,18	29,07	4519,31
8.	70% - jan/98	4,52	1,70	42,01	10,98	12,40	28,39	4850,32
9.	0% - abr/98	5,15	2,42	39,09	10,81	16,02	26,50	3473,28
10.	30% - abr/98	5,31	2,01	40,26	10,98	11,64	29,79	4034,26
11.	50% - abr/98	4,68	1,57	44,43	9,14	13,40	26,78	5384,06
12.	70% - abr/98	4,55	1,61	47,69	8,37	10,60	27,19	6718,08
13.	0% - jul/98	4,88	2,06	33,42	20,47	12,02	27,15	4201,32
14.	30% - jul/98	4,97	2,27	38,40	13,56	10,79	31,25	5221,45
15.	50% - jul/98	4,62	2,07	35,82	15,46	9,63	32,39	4992,21
16.	70% - jul/98	5,15	1,86	39,79	12,84	9,50	30,85	5549,34

Quadro 13 Correlações entre as 7 variáveis originais referentes à anatomia da secção transversal da nervura da folha de *Lippia alba*, e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). Porcentagem de informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 , e ordenação das variáveis quanto ao seu poder discriminatório. Botucatu-SP, 2000.

Variáveis	Y_1	Y_2	Ordem
% Epiderme da face abaxial	0,6059	-0,2261	5
% Epiderme da face adaxial	0,4814	-0,1409	7
% Parênquima fundamental	-0,8317	-0,3969	3
% Parênquima clorofiliano	0,7756	0,6102	1
% Colênquima	0,4790	-0,7798	4
% Feixe vascular	-0,3335	0,5571	6
Área total da secção transversal da nervura	-0,8861	0,3916	2
% Informação Retida	51,48	28,57	
% Informação Acumulada	51,48	80,05	

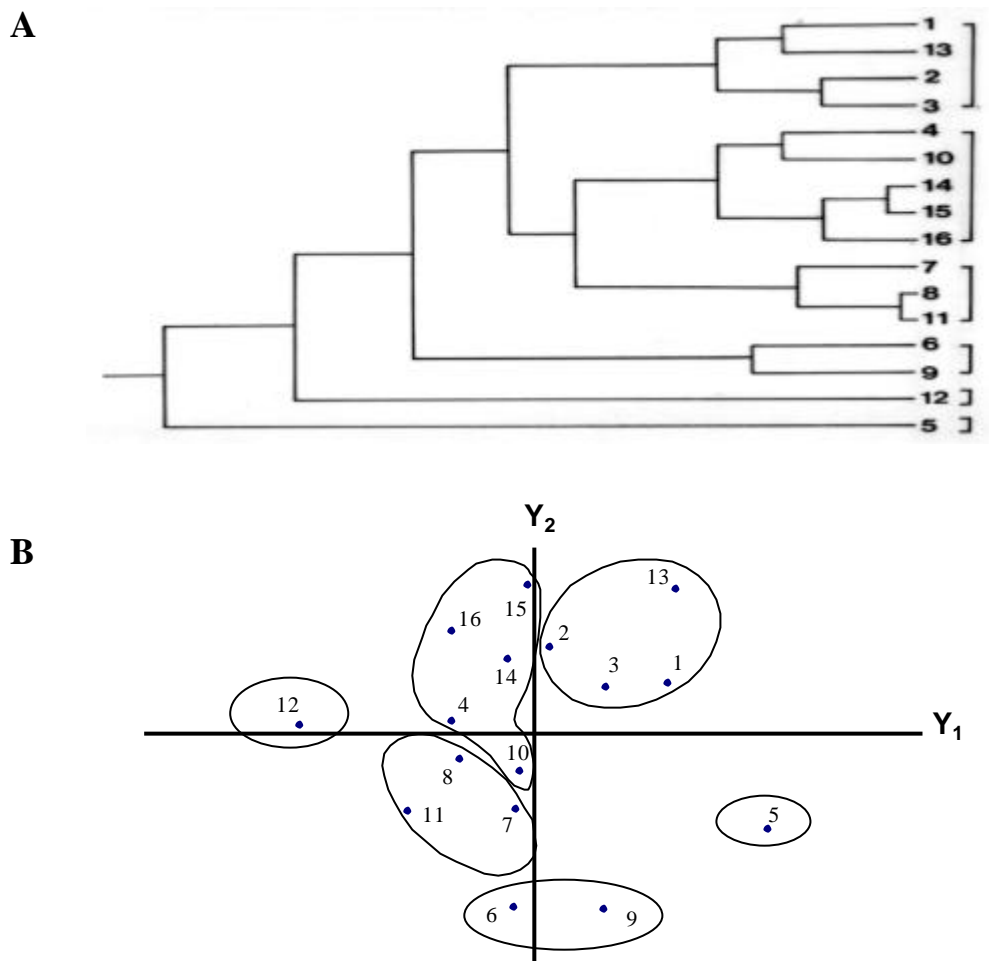


Figura 15 A: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os níveis de sombreamento e as épocas de colheita de *Lippia alba*. B: Dispersão gráfica dos níveis de sombreamento e das épocas de colheita de *L. alba*, utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das 7 variáveis referentes à anatomia da seção transversal da nervura da folha. Níveis de sombreamento e épocas de colheita: 1- 0% (outubro/97); 2- 30% (outubro/97); 3- 50% (outubro/97); 4- 70% (outubro/97); 5- 0% (janeiro/98); 6- 30% (janeiro/98); 7- 50% (janeiro/98); 8- 70% (janeiro/98); 9- 0% (abril/98); 10- 30% (abril/98); 11- 50% (abril/98); 12- 70% (abril/98); 13- 0% (julho/98); 14- 30% (julho/98); 15- 50% (julho/98); 16- 70% (julho/98). Botucatu-SP, 2000.

5 CONCLUSÕES

Para todos os conjuntos de variáveis analisadas neste experimento, houve interação dos níveis de sombreamento com as épocas de colheita, porém, algumas tendências foram observadas:

- A determinação das condições de cultivo mais adequadas para a extração de óleo essencial em *L. alba* depende do interesse no rendimento ou na qualidade do óleo essencial, pois alguns compostos, relativamente abundantes no óleo, apresentam alta correlação com os níveis de sombreamento e épocas de colheita;
- Em relação às características anatômicas, *L. alba* revelou grande plasticidade foliar entre as combinações de níveis de sombreamento e épocas de colheita;
- Sugere-se que a maior produção de folhas e de óleo essencial em plantas de *L. alba*, cultivadas a pleno sol, seja consequência do desenvolvimento do parênquima paliçádico, da densidade de tricomas secretores e da capacidade de aproveitamento da luz disponível.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOCK, M.C., LYDON, J., JOHNSON, E., COLLINS, R. Effects of temperature and light levels on leaf yield and cocaine content in two *Erythroxylum* species. *Annals of Botany*, v.78, n.1, p.49-53, 1996.

ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing. Co., Carol Stream, Illinois, U.S.A., 1995.

AHMED, Z.F., FAHMY, I.R. The effect of environment on the growth and alkaloidal content of *Hyoscyamus muticus* L. II. *Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, v.38, p.484-7, 1949.

ANGELUCCI, M.E.M., CORDAZZO, S.N., FORTES, V.A. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso da *Lippia alba* N.E.Br. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, 1990, João Pessoa. *Livro de Resumos...* João Pessoa: U.F.P.B., 1990. p.4-12.

- ASHTON, P.M.S., BERLYN, G.P. Leaf adaptations of some *Shorea* species to sun and shade. *New Phytol.*, v.121, p.587-96, 1992.
- ASHTON, P.M.S., BERLYN, G.P. A comparison of leaf physiology and anatomy of *Quercus* (Section *Erythrobalanus*-Fagaceae) species in different light environments. *American Journal of Botany*, v.81, n.5, p.589-97, 1994.
- BARROSO, G.M., MORIM, M.P., PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L.F. *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa: UFV, 1999. 443p.
- BENINCASA, M. M. P. *Análise de crescimento de plantas*. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.
- BUISSON, D., LEE, D.W. The developmental responses of papaya leaves to simulated canopy shade. *American Journal of Botany*, v.80, n.8, p.947-52, 1993.
- BUSTAMANTE, F. M. *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*. Madrid : Ediciones Mundí-Prensa, 1993. 365 p.
- CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Técnica de inclusão de material vegetal em historresina.
In: ENCONTRO REGIONAL DE ANATOMISTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1, 1995, Rio Claro. *Apostila*. Rio Claro: UNESP, 1995. 7p.

CHARLES-EDWARDS, D.A., CHARLES-EDWARDS, J., SANT, F.I. Leaf photosynthetic activity in six temperate grass varieties grown in contrasting light and temperature environments. *Journal of Experimental Botany*, v.25, n.87, p.715-24, 1974.

CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt. & Wilson - erva cidreira. *Rev. Bras. Farm.*, v.73, n.3, p.57-64, 1992.

CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. A importância do cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. *SOB Informa*, v.IX, n.2 e v.X, n.1, 1 sem. 1991, p.23-4.

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

CORREIA, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1969. v.4.

CRAVEIRO, A.A., ALENCAR, J.W., MATOS, F.J.A., ANDRADE, C.H.S., MACHADO, M.I.L. Essential oils from brazilian Verbenaceae - Genus *Lippia*. *J. Nat. Prod.*, v.44, n.5, p.598-601, 1981.

CRAWLEY, M.J. Life history and environment. In: CRAWLEY, M.J. (ed.) *Plant Ecology*. 2.ed. Malden: Blackwell Science, 1997. p.73-131.

- CURI, P. R., TERADA, L., BECKERS, P.J., ALVES, A. Análise multivariada da disponibilidade per capita de nutrientes em 44 países. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.27, n.8, p.1123-8, 1992.
- CUTTER, E. G. *Anatomia vegetal: órgãos-experimentos e interpretação*. São Paulo: Roca, 1987. v.2. 336p.
- DEINUM, B., SULASTRI, R.D., ZEINAB, M.H.J., MAASSEN, A. Effects of light intensity on growth, anatomy and forage quality of two tropical grasses (*Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum* var. *trichoglume*). *Netherlands Journal of Agricultural Science*, v.44, p.111-24, 1996.
- DELLACASSA, E., SOLER, E., MENENDEZ, P., MOYNA, P. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, v.5, p.107-8, 1990.
- DEMEYER, K., DEJAEGERE, R. The influence of the Ca²⁺/K⁺ balance and light energy on alkaloid content and partitioning in *Datura stramonium*. *Australian Journal of Botany*, v.45, n.1, p.81-101, 1997.
- DWIVEDI, S.K., DUBEY, N. K., KISHORE, N. Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. *Indian Perfumer*. v.34, n.1, p.20-1, 1990.

EDWARDS, P.J., WRATTEN, S.D. *Ecologia das interações entre insetos e plantas*. São Paulo: EPU, 1981. 71p.

ESAU, K. *Anatomia de las plantas com semilla*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1982. 512p.

ESPÍNDOLA, C.R., TOSIN, W.A.C., PACCOLA, A.A. Levantamento pedológico da Fazenda Experimental São Manuel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 14, 1973, Santa Maria. *Anais...*, Santa Maria: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1974, p.650-1.

FAHN, A. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press, 1979. 302p.

FAHN, A. *Plant anatomy*. 3.ed. New York: Pergamon Press, 1982. 544p.

FERREIRA, J.F.S., JANICK, J. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *Int. J. Plant Sci.* v.156, n.6, p.807-15, 1995.

FERRI, M.G. (Coord.). *Fisiologia Vegetal*. 2.ed. São Paulo: EPU, 1985. v.1. 362p.

FLUCK, H. The influence of the soil on the content of active principles in medicinal plants. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, p.153-63, 1954.

GOMES, E.C., MING, L.C., BONA, C., TAKEMURA, O.S. Contribuição ao estudo anatômico e fitoquímico de folha de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, 1990, Paraíba. *Resumos...* Paraíba, 1990.

GOMES, E.C., MING, L.C., MOREIRA, E.A., MIGUEL, O.G., MIGUEL, M.D., KERBER, V.A., CONTE, A., WEISS FILHO, A. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae). *Rev. Bras. Farm.*, v.74, n.2, p.29-32, 1993.

GOTTILIEB, O. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry*, v.29, n.6, p.1715-24, 1990.

HALVA, S., CRAKER, L.E., SIMON, J.E., CHARLES, D.J. Light levels, growth and essential oil in dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, v.1, p.47-57, 1992.

HANDRO, W. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos cerrados. *An. Acad. Bras. Ciên.*, v.36, n.4, p.479-99, 1964.

HOFT, M., VERPOORTE, R., BECK, E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia*, v.107, n.2, p.160-9, 1996.

- JEONG, C.S., YOO, K.C., NAGAOKA, M., IMADA, S. Effect of light intensities, night temperatures and CO₂ treatments on production of mature-green peppers. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, v.36, n.2, p.211-7, 1995.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, v.27, p.137-8, 1965.
- KISHORE, N., DUBEY, N.K. Fungitoxicity of essential oil of *Amomum subulatum* against *Aspergillus flavus*. *Economic Botany*. v.44, n.4, p.530-3, 1990.
- KISHORE, N., MISHRA, A.K. Effect of essential oils on sclerotial germination of *Rhizoctonia solani*. *National Academy Science Letters*. v.14, n.6, p.239-40, 1991.
- KISHORE, N., DUBEY, N.K., SRIVASTA, O. P., SINGH, S.K. Volatile fungitoxicity in some higher plants as evaluated against *Rhizoctonia solani* and some other fungi. *Indian Phytopathology*. v.36, n.4, p.724-726, 1986.
- LI, Y., CRAKER, L.E., POTTER, T. Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). In: PROCEEDINGS INT. SYMP. MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS, 1996, Amherst. *Acta Horticulturae*, n. 426, 1996, p.419-426.

- MAKOVETSKAYA, E.Y. Tannin content in the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. cultivated in the Ukraine in relation to growing conditions. *Rastitel'nye-Resursy*, v.28, n.3, p.67-71, 1992.
- MATOS, F.J.A., MACHADO, M.I.L., CRAVEIRO, A.A., ALENCAR, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J. Essent. Oil Res.*, v.8, p.695-8, 1996.
- MAUSETH, J. D. *Plant Anatomy*. Menlo Park/Califórnia: Benjamin Cummings Publishing Company, 1988. 560p.
- MING, L.C. *Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de Lippia alba (Mill.) N.E.Br. - Verbenaceae*. Curitiba, 1992, 206p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MING, L.C. Plantas medicinais: um recurso cultural. *Alternativas - Cadernos de Agroecologia*, Julho, p.40, 1994.
- MING, L.C. Adubação orgânica no cultivo de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. – Verbenaceae. In: MING, L.C. (Coord.), SCHEFFER, M.C., CORRÊA JÚNIOR, C., BARROS, I.B.I. de, MATTOS, J.K. de A. *Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica*. Botucatu: UNESP, 1998. p.165-91.

- MORALES, M.R.; DENIS, J.C., SIMON, J.E. Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Acta Horticulturae*, n. 344. p.416-20, 1993.
- NEMETH, E., BERNATH, J., HETHELYI, E., PALEVITCH, D., PUTIEVSKY, E. Diversity in chemotype reaction affected by ontogenetical and ecological factors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS, 1993, Tiberias on the Sea of Galilee-Israel. *Acta Horticulturae*, n.344, p.178-187, 1993.
- PALEVITCH, D. Recent advances in the cultivation of medicinal plants. *Acta Horticulturae*, v.208, p.29-34, 1987.
- PAUL, T.M., SIDDIQUE, M.A.A., JHON, A.Q. Effect of severity and time pruning on growth and flower production of *Rosa damascena* Mill. – an important aromatic plant. *Advances in Plant Sciences*, v.8, n.1, p.28-32, 1995.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 6.ed. Piracicaba: Gráfica Binetti, 1976. 430p.
- PINO, J. A., ORTEGA, A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown form Cuba. *J. Essent. Oil Res.*, v.8, p.445-6, 1996.
- PRAKASH, A., RAO, J. Wild sage, *Lippia geminata*: a paddy grain protectant in storage. *Oryza*. v.21, n.4, p.209-12, 1986.

RODELLA, R.A., AYOUB, J., MAIOMI-RODELLA, R.C.S. Estudo quantitativo de características anatômicas da folha de *Panicum maximum* Jacq. e *Panicum coloratum* L. *Rev. Agric. (Piracicaba)*, v.59, p.163-74, 1984.

RODELLA, R.A., ISHIY, C.M., MAIOMI-RODELLA, R.C.S., AMARAL JUNIOR, A. Estudo quantitativo de características anatômicas da folha de duas espécies de *Brachiaria*. *Rev. Agrociência*, v.2, p.21-30, 1982.

ROHLF, F.J. Adaptive hierarchical clustering schemes. *Syst. Zool.*, v.19, p.58-82, 1970.

SAGERS, C.L., COLEY, P.D. Benefits and costs of defense in a neotropical shrub. *Ecology*, v.76, n.6, p.1835-43, 1995.

SALAMON, I. Growing conditions and the essential oil of chamomile, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, v.2, p.31-7, 1994.

SALEH, M. Effects of light upon quantity and quality of *Matricaria chamomilla* oil. *Planta Medica*, v.24, n.4, p.337-40, 1973.

SILVA, E.M.J. *Estudo morfológico e anatômico dos órgãos vegetativos de Piper regnelli* (Miq.) C. DC. *Piperaceae, em diferentes fases de desenvolvimento*. Botucatu, 1992. 95p.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

SINGH, N.; LUTHRA, R., SANGWAN, S. Effect of leaf position and age on the essential oil quantity and quality in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *Planta Medica*, v.55, p.254-6, 1989.

SMITH, W.K., VOGELMANN, T.C., DELUCIA, E.H., BELL, D.T., SHEPHERD, K.A. Leaf form and photosynthesis. *BioScience*, v.47, n.11, 1997.

SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. *Numerical taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.

STRAUSS-DEBENEDETTI, S., BERLYN, G.P. Leaf anatomical responses to light in five tropical Moraceae of different successional status. *American Journal of Botany*, v.81, n.12, p.1582-91, 1994.

TERBLANCHÉ, F.C., KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)- A literature review. *J. Essent. Oil Res.*, v.8, p.471-85, 1996.

THOMPSON, W.A., KRIEDEMANN, P.E., CRAIG, I.E. Photosynthetic response to light and nutrients in sun-tolerant and shade tolerant rainforest trees. I. Growth, leaf anatomy and nutrient content. *Aust. J. Plant. Physiol.*, v.19, p.1-18, 1992.

VENTRELLA, M.C. Anatomia quantitativa e produção de óleo essencial de folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em diferentes níveis de inserção no caule. In: CONGRESSO DA

SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 12, 1998, Piracicaba. *Anais...*, Piracicaba: SBSP, 1998. p.57.

VOGEL, H., RAZMILIC, I., DOLL, U., RUIZ, R., PANK, F. Variability of some active compounds in boldo (*Peumus boldus* Mol.). In: PROCEEDINGS INTERNACIONAL SYMPOSIUM. BREEDING RESEARCH ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS, Quedlinburg-Germany. 30 Jun.-4 Jul., 1996. *Beitrage-zur-Zuchtungs-forschung-Bundesanstalt-fur-Zuchtungs-forschung-an-Kulturpflazen*. v.2, n.1, p.364-7, 1996.

VOLTAN, R.B.Q., FAHL, J.I., CARELLI, M.L.C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v.4, n.2, p.99-105, 1992.

WERKER, E., RAVID, U., PUTIEVSKY, E. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany*, v.34, p.31-45, 1985.

ZHANG, Z.A. Effect of light intensity on content of soluble sugar, starch and ginseng saponin in ginseng plant. *Journal of Jilin Agricultural University*, v.16, n.3, p.15-7, 1994.

ZIEGENHAGEN, B., KAUSCH, W. Productivity of young shaded oaks (*Quercus robur* L.) as corresponding to shoot morphology and leaf anatomy. *Forest Ecology and Management*, v. 72, p.97-108, 1995.

ZOBEL, A.M. Localization of phenolic compounds in tannin-secreting cells from *Sambucus racemosa* L. Shoots. *Annals of Botany*, v.57, p.801-10, 1986.

ZOGHBI, M. das G., ANDRADE, E.H.A., SANTOS, A.S., SILVA, M.H., MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, v.13, p.47-8, 1998.