

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
Programa Integrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais
Programa de pós-graduação em Botânica

**MORFOANATOMIA, PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ALELOPÁTICA
DE TRÊS ESPÉCIES DE *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE
CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA AMAZÔNIA**

ELY SIMONE CAJUEIRO GURGEL

Manaus, Amazonas

Maio, 2.009

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
Programa Integrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais
Programa de pós-graduação em Botânica

**MORFOANATOMIA, PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ALELOPÁTICA
DE TRÊS ESPÉCIES DE *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE
CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA AMAZÔNIA**

ELY SIMONE CAJUEIRO GURGEL
DRA. MARIA SILVIA DE MENDONÇA QUEIROZ
Dr. João Ubiratan Moreira dos Santos

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas, área de
concentração em Botânica.

Manaus, Amazonas
Maio, 2.009

Gurgel, Ely Simone Cajueiro

Morfoanatomia, perfil químico e atividade alelopática de três espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae Caesalpinioideae) nativas da Amazônia / Ely Simone Cajueiro Gurgel – Manaus: UFAM/INPA, 2009.

105 p. ilustr.

Tese de doutorado – área de concentração Botânica

1. *Copaifera duckei* Dwyer, 2. *C. martii* Hayne, 3. *C. reticulata* Ducke

CDD 19º ed. 584.5044

Sinopse

Estudaram-se os aspectos morfológicos de frutos, sementes, desenvolvimento pós seminal, plântulas e plantas jovens; morfoanatomia das sementes, dos limbos foliolares de eófilos e metafilos e, atividade alelopática dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne e *C. reticulata* Ducke (Leguminosae Caesalpinioideae).

DEDICO

*A Deus, meu SENHOR, libertador,
minha fortaleza, em quem confio a força da minha
salvação.*

A DEUS.

Aos meus pais, **José Maria e Maria Salete**,
fonte de vida, exemplo de perseverança e de fé.

À tia **Tereza** e tio **José Márcio** (*in memoriam*)
por me conduzirem até aqui.

Aos meus queridos sobrinhos **Leticia, José
Eduardo, João Pedro e Thiago**.

Aos meus irmãos **Iris, Patrícia e Salvador**.

A **Dra. Marlene Freitas da Silva** (*in
memoriam*) estimada amiga e responsável por muito do
que alcancei na pesquisa.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conduzir às pessoas que tornaram este trabalho uma realidade, que o Senhor continue abençoando-os e protegendo-os.

Ao **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)** e a **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)**, por proporcionarem meios para formação de Recursos Humanos na região Amazônica.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM)**, excelencia em fomento a pesquisa na região norte, pela bolsa concedida.

Ao programa de **Bolsas de Estudo para a Conservação da Amazônia do Instituto Internacional de Educação do Brasil (BECA-IEB)**, pelo incentivo financeiro indispensável para realizar a maior parte das coletas e adquirir equipamentos.

Todas as pessoas que ajudaram a concretizar este trabalho são dignas da minha eterna gratidão e reconhecimento, sem as quais esta tarefa seria impossível.

Aos Professores orientadores e estimados amigos **Dra. Maria Silvia de Mendonça (UFAM)** e **Dr. João Ubiratan Moreira dos Santos (Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA)**, pela orientação, amizade e acima de tudo compreensão nos momentos mais dúbios.

Ao professor **Dr. Jorge Porto** pelo profissionalismo e apoio aos alunos da pós-graduação do INPA.

A **Dra. Maria Lúcia Absy** Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Botânica do INPA, e as secretárias **Helcineide Ramos de Andrade** e **Gisele da Costa Marques** pelos préstimos.

Aos pioneiros **Dra. Marlene Freitas da Silva** e **Padre José Maria Albuquerque**, fonte de inspiração para desenvolver estudos nesta linha de pesquisa. Um especial agradecimento ao **Pe. Zé Maria** pela doação de diversos e importantes livros pertencentes ao seu acervo pessoal, incluindo preciosidades como as cópias da sua tese intitulada: Estudo morfológico da semente e sua germinação até a fase de plântula, principalmente de plantas invasoras de culturas e de essências florestais da Amazônia.

Aos Professores **Drs. Regina Célia Vianna Martins da Silva, Antônio Pedro Souza Santos, Fernanda Ilkiu Borges e Alessandra Keiko (Embrapa Amazônia Oriental), Maria das Graças Zogbhi** e a **M.Sc. Raimunda Alves Pereira (Museu Paraense Emilio Goeldi - MPEG)** pelo apoio, ensinamentos, concessão de espaço nos laboratórios pelos quais são responsáveis, e sobre tudo pelos ensinamentos sobre taxonomia de *Copaifera*, alelopatia, anatomia de frutos e sementes de Leguminosae, atividade microbiana e extração e análise dos óleos essenciais. O apoio destes profissionais competentes mostraram que a multidisciplinaridade encanta e nos realiza mais.

As **Professoras Dras Denise Maria Trombert de Oliveira** (Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG) durante os cursos de morfoanatomia de estruturas reprodutivas (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita – Botucatu – Campus Rubião) e o de anatomia de sementes (MPEG - CBO), **Sandra Maria Carmelo Guerreiro** (Universidade Federal de Campinas - UNICAMP) e **Renata M. Strozi A. Meira** (Universidade Federal de Viçosa - UFV) na disciplina morfologia de sementes (UFAM – INPA).

Aos **Professores Dra. Zenilda Laurita Bouzon** (Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC) e **M.Sc. Seidel Santos** (Universidade Estadual do Pará – UEPA), pela iniciação nas atividades de testes histoquímicos.

Ao **Dr. Hilton Túlio Costi** e ao **M.Sc. Rolf Pereira Júnior**, pela imensa colaboração quando da obtenção no Laboratório Institucional do MPEG das Micrografias Eletrônicas de Varredura e sobretudo ao grande incentivo, principalmente nas horas mais difíceis e de insatisfação com os resultados obtidos.

Aos Prof. Drs. **Milton Nascimento da Silva, Alberto e Mara Arruda** (Universidade Federal do Pará – UFPA) pela introdução ao mundo da Fitoquímica de produtos naturais.

Dr Joseph H. Kirkbride (U.S. Department of Agriculture) e **Dr. Campbell Plowden** (Penn State University) pelo envio de referências bibliográficas e esclarecimentos.

A **Tarcymara Garcya Barata** (PIBIC – UFPA – MPEG), **Júlio Souza** e **Maria Maricélia Félix da Silva** (CBO – PCI – MPEG), sem os quais não imagino como seria possível processar e analisar o material de todos os indivíduos amostrados. O esforço conjunto destas três pessoas maravilhosas tornou possível os inúmeros cortes a mão livre, preparo de lâminas, aquisição de fotografias, hidrodestilação, extração e concentração dos extratos etanólicos e hexânicos.

Ao **Jair Freitas da Costa, Miguel Pastana do Nascimento e João Carlos Lima de Oliveira**, coletores do Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental, pelas inúmeras excursões e paciência para conseguirmos coletar quantidade suficiente de sementes e folhas.

Ao Sr. **Mário L. Barreto Jesus** pelas coletas de sementes.

Ao Sr. **Dico**, por proteger incansavelmente as copaibeiras e nos guiar nas inúmeras coletas nas matas remanescentes da Fazenda Mari-Mari.

Aos técnicos **Paulo Sérgio Farias Gomes** e **Luis Carlos Batista Lobato** (CBO – MPEG) e **Manoel Roberto Pereira Vianna** do Laboratório de Botânica Agroflorestal (LABAF - UFAM) pela valiosa ajuda para a aquisição dos cortes anatômicos em micrótomo.

As **Dras. Nazir, Helen, Léa Carreira, Márlia Coelho, Raimunda Potiguara e Alba Lins**, amigas e colegas de trabalho da Coordenação de Botânica (CBO – MPEG), pelo precioso convívio, ensinamentos diários e energia positiva.

Aos funcionários do IEB, pela competência, transparência e cordialidade no repasse de informações, especialmente ao **Henyo Trindade Barretto Filho e Janilda Cavalcante**.

As amigas do curso de morfoanatomia de estruturas reprodutivas, **Maisa de Carvalho Iwazaki, Clívia Carolina Fiorilo Possobom, Inara Regiane Moreira-Coneglian, Natália Arias Galastri, Poliana Roversi Genovez** (Unesp – Botucatu – Campus Rubião).

A professora particular de anatomia e futura **Dra. Andréa Barroncas** (INPA – UFAM) pela amizade, companheirismo e fonte de inspiração.

A **Regina, Dagmar, Rosângela e Patrícia**, secretárias da Coordenação e do Curso de Mestrado da Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi, pelo profissionalismo e disposição para ajudar sempre.

Aos técnicos em informática, **Altenir Sarmiento e Paulo Melo** (Programa de Pesquisa em Biodiversidade – PPBio – MPEG).

A todos os que no mesmo período estavam no Curso de Botânica do INPA, em especial ao Dr. **Rogério Benedito da Silva Añez** e a Doutoranda **Ressiliane Ribeiro Prata**, principalmente pelos inúmeros préstimos.

A **Maura Andrade Kalume**, minha amiga e irmã do coração, e toda a sua família maravilhosa, pelos momentos de alegria, e pedindo desculpas pelas longas ausências.

A **Flávia, Beto e Joãozinho Lucas e Tia Lenita Araújo** pela força e amizade.

A **Nicole e Dora, Cléo e Rodrigo**, queridos amigos que residem em Manaus, pelas inúmeras e calorosas acolhidas.

Ao meu querido e carinhoso **Arthurzinho**, filho da minha prima **Ana Dolorès**, e ainda aos seus filhos **Tavinho e Betinho**, pelo apoio durante a minha estadia em Manaus.

As amigas **Maria Anália, Andréa Barroncas, Mariana Cassino, Poliana Roversi, Madalena Aguiar e Sissi Mikaella** (LABAF - UFAM).

Com muito amor agradeço a minha família, meus queridos pais **José Maria e Maria Salete**, tios **Tereza e Márcio**, luzes que sempre me conduziram e guiaram, mostrando a importância do conhecimento para a vida inteira. As minhas irmãs **Ana Patrícia e Maria Iris**, meu irmão **Salvador** pelo amor e compreensão nos meus momentos de maior ansiedade. Aos meus irmãos do coração e do convívio diário de muitos anos **Flávio e Felipe**, e mais recentemente as queridas primas **Estefani e Felícia**.

Ao meu querido **Dario Cesar** por todos os momentos de felicidade, pela sua lealde, paciência e carinho, presente de Deus para mim!!! Obrigada.

A todos aqueles que por amor e respeito ao próximo, de uma maneira ou de outra me ajudaram nesta caminhada tão importante.

Meus sinceros agradecimentos,

Muito obrigada!!!

“Uma coisa, porém, eu faço: esquecendo o que fica para trás, eu me lanço para o que está na frente. Corro direto para a meta, rumo ao prêmio, que, do alto, Deus me chama a receber em Cristo Jesus”.

Fl 3, 13-14

RESUMO – As espécies pertencentes ao gênero *Copaifera* L. (Leguminosae) são amplamente utilizadas na região amazônica, sendo o seu óleo um importante medicamento natural. Apesar da grande importância destas espécies, são escassos trabalhos morfoanatômicos no gênero, principalmente a respeito de suas estruturas reprodutivas. Em particular, a distinção entre as espécies de copaíba que ocorrem na região amazônica ainda carece de estudos mais detalhados. Desta forma, este estudo teve por objetivo caracterizar os aspectos morfológicos de frutos, plântulas e plantas jovens de *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke. Também visou o estudo da morfoanatomia de sementes, eofilos e metafilos, bem como a caracterização da ocorrência e distribuição espacial dos metabólitos nas sementes destas espécies. Visou, especialmente, melhor esclarecer a distinção taxonômica entre *C. duckei* e *C. reticulata*, as duas espécies mais semelhantes do gênero que ocorrem na Amazônia. Por fim, objetivou também avaliar os potenciais efeitos alelopáticos do óleo essencial das folhas e dos galhos das três espécies. Observou-se que os frutos são do tipo legume, não diferindo entre as espécies. A superfície do tegumento das sementes, observada em microscopia eletrônica de varredura, mostrou-se predominante punctada em *C. duckei* e *C. martii* e microrreticulada em *C. reticulata*. A linha lúcida ocorre no terço inferior da exotesta em *C. martii* enquanto que em *C. duckei* e em *C. reticulata* esta ocorre na região mediana da exotesta. Os cotilédones são recobertos por uma cutícula delgada e levemente estriada em *C. duckei*, e estriada em *C. reticulata* e em *C. martii*. A parede periclinal externa da epiderme é levemente convexa e apresenta depressões em *C. duckei*, sendo convexa em *C. martii* e em *C. reticulata*. O eixo embrionário de *C. duckei* apresenta pequeno diâmetro em relação ao seu comprimento, enquanto que os de *C. reticulata* e os de *C. martii* são proporcionais. *C. duckei* e *C. martii* apresentam plúmula rudimentar, havendo, nas respectivas espécies, um e dois relevos na região apical do eixo embrionário, já em *C. reticulata* a plúmula é um pouco diferenciada, pois além do relevo no ápice do eixo embrionário há reentrância apical diferenciada, com os folíolos em estágio inicial de desenvolvimento. Na semente madura das três espécies, compostos fenólicos e alcalóides provavelmente são as principais substâncias de defesa constantes no tegumento e na epiderme dos cotilédones, enquanto que lipídeos e proteínas constituem as principais reservas presentes na epiderme e no parênquima dos cotilédones. A principal diferença encontrada entre as plantas jovens destas espécies foi a presença de estípulas foliáceas bem desenvolvidas em *C. reticulata*, ausentes em *C. duckei* e semelhantes a da plântula em *C. martii* também foliáceas, porém bem menos conspicuas. Em *C. martii* a filotaxia é alterna enquanto nas duas outras espécies é alterna. Nos limbos foliolares foram observados diversos metabólitos, como amido, substâncias lipofílicas e pecticas, idioblastos mucilaginosos, fenólicos e cristalíferos. Eofilos e metafilos são anatomicamente semelhantes. Todas as espécies apresentaram cavidades secretoras e glândulas. Os resultados da atividade alelopática dos óleos essenciais procedentes de folhas e galhos das espécies de *Copaifera* testadas (doadoras) não revelaram diferença estatística significativa nas espécies receptoras (*Mimosa pudica* L. e *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin e Barneby). Porém os óleos essenciais das folhas apresentaram maior potencial médio para inibir o desenvolvimento da raiz (45%) e do hipocótilo (74%) destas espécies. Adicionalmente, os constituintes majoritários apresentaram concentrações mais elevadas nas folhas do que nos galhos, o que justifica as diferenças observadas com relação à intensidade dos efeitos alelopáticos. Dos constituintes identificados, apenas o δ -cadineno e o linalol já foram anteriormente relacionados à atividade alelopática, sendo, neste trabalho, proposta a atividade alelopática de outros compostos. Os resultados permitiram uma melhor caracterização dos aspectos morfo-anatômicos, histoquímicos das sementes e frutos destas três espécies de *Copaifera*, bem como de aspectos morfológicos de plântulas e plantas jovens, contribuindo para o esclarecimento da distinção entre os táxons, sobretudo entre *C. duckei* e *C. reticulata*.

Palavras chave: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. reticulata* Ducke, frutos, sementes, plântulas.

ABSTRACT - Species belonging to the *Copaifera* L. genus (Leguminosae) are widely utilized in the Amazonian popular medicine, and its oils are considered to be one of the more important natural medicines of the forest. Despite its great importance, there are few studies concerning the morphological and anatomical characteristics of the genus, especially those describing its reproductive structures. Particularly, the taxonomic characterization of the Amazonian species of *Copaifera* deserves more attention. This way, this study aimed to characterize the morphological aspects of fruits, seedlings and saplings of *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer and *C. reticulata* Ducke. The seeds, eophylls and metaphylls morpho-anatomy was also studied, as well as the occurrence and distribution of metabolites in the seeds of these species. Particularly, we aimed to better describe the taxonomic distinction between *C. duckei* and *C. reticulata*, the two closely related *Copaifera* Amazonian species. The possible allelopathic effects of the essential oil from leaves and stem of these species were also verified. The fruit of the three species are legumes. The exotesta surface, when observed in electronic microscopy, showed to be predominantly punctuated in *C. duckei* and *C. martii*, and microreticulate in *C. reticulata*. The cotyledons are recovered with a thin, slightly striated cuticle in *C. duckei*, while the cuticle of the other two species is clearly striated. The outer periclinal wall of the epidermis is slightly convex and presents depressions in *C. duckei*, being convex in the other two species. The embryonic axis of *C. duckei* presents small diameter in relation to its length, while in *C. martii* and in *C. reticulata* these measures are proportional. *C. duckei* and *C. martii* presents rudimentary plumule, displaying one and two protuberances in the apex, respectively, but in *C. reticulata*, the plumule is poorly differentiated, once it presents leaflets in the initial stages of development. The mature seeds of the three species present phenolic compounds and alkaloids, which are probably the main defense substances of the tegmen and the epidermis of the cotyledons. Lipids and proteins are the main reserve substances of the epidermis and the parenchyma of the cotyledons. The main difference observed among the saplings of the three species is the presence of well-developed, foliaceous stipules in *C. reticulata*, which are absent in *C. duckei* and are similar to those of the seedlings in *C. martii*, being also foliaceous but less conspicuous. *C. martii* presents alternate phyllotaxy, while the other species presents opposite phyllotaxy. We detected several metabolites in the foliar limb, such as starch, lipophilic and pectic substances, and mucilaginous, crystal and phenolic idioblasts. Eophylls and metaphylls are anatomically similar. The three species present secretory cavities and glands. The allelopathic activity of essential oil from stem and leaves of the studied species did not revealed significant differences in the two species tested (*Mimosa pudica* L. e *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin e Barneby). However, essential oil from leaves displayed higher potential to inhibit roots (45%) and hypocotyls (74%) development. Additionally, the major constituents detected showed to be more concentrated in the leaves than in the stem, which explains the differences observed on the effects' intensity of the oils obtained. Among the identified constituents, only the δ -cadinen and the linalol were previously reported to have allelopathic activity, being presented, in this work, the potential allelopathic activity of other compounds. Results obtained here contribute to the characterization of the morphological, anatomical and histochemical aspects of fruits and seeds of three *Copaifera* species. Also, we described the morphological traits of seedlings and saplings of these species, contributing to the taxonomic distinction between the *taxa*, especially between *C. duckei* and *C. reticulata*.

Key Words: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. reticulata* Ducke, fruits, seeds, seedlings, allelopathy.

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Artigo I		
1.	Dimensões (cm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) dos frutos de <i>Copaifera duckei</i>	39
2.	Dimensões (mm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) das sementes de <i>C. duckei</i>	39
3.	Dimensões (cm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) dos frutos de <i>C. martii</i>	39
4.	Dimensões (mm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) das sementes de <i>C. martii</i>	39
5.	Dimensões (cm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) dos frutos de <i>C. reticulata</i>	40
6.	Dimensões (mm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) das sementes de <i>C. reticulata</i>	40
Artigo II		
1.	Cronologia das principais transformações morfológicas, do desenvolvimento pós-seminal a formação da planta jovem das espécies de <i>Copaifera</i> L. estudadas (média dos dados em dias).	68
2.	Resultado histoquímico do limbo dos eofilos e metafílos de <i>Copaifera duckei</i> , <i>C. martii</i> e <i>C. reticulata</i>	68
Artigo III		
1.	Componentes químicos (%) dos óleos essenciais de três espécies de <i>Copaifera</i>	93

LISTA DE FIGURAS

Figura nº	Página
Artigo I	
1. <i>Copaifera duckei</i> , legumes maduros recém coletados	41
2. <i>C. martii</i> , legumes maduros recém coletados	41
3. <i>C. reticulata</i> , legumes maduros recém coletados	41
4. <i>C. duckei</i> , sementes expostas	41
5. <i>C. martii</i> , sementes expostas	41
6. <i>C. reticulata</i> , sementes expostas	41
7. <i>C. duckei</i> , sementes estenospérmicas	41
8. <i>C. martii</i> , sementes estenospérmicas	41
9. <i>C. reticulata</i> , sementes estenospérmicas	41
10. <i>Copaifera duckei</i> , região hilar da semente em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
11. <i>C. martii</i> , lente em MEV	42
12. <i>C. reticulata</i> , micrópila em MEV	42
13. <i>C. duckei</i> , tegumento, parede periclinal externa em MEV	42
14. <i>C. martii</i> , tegumento, parede periclinal externa em MEV	42
15. <i>C. reticulata</i> , tegumento, parede periclinal externa em MEV	42
16. <i>C. duckei</i> , tegumento, secção transversal em MEV	42
17. <i>C. martii</i> , tegumento, secção transversal em MEV	42
18. <i>C. reticulata</i> , tegumento, secção transversal em MEV	42
19. <i>Copaifera duckei</i> , cotilédones, região basal	43
20. <i>C. martii</i> , cotilédones, região basal	43
21. <i>C. reticulata</i> , cotilédones, região basal	43
22. <i>C. duckei</i> , eixo embrionário em secção transversal	43
23. <i>C. martii</i> , eixo embrionário em secção transversal	43
24. <i>C. reticulata</i> , eixo embrionário em secção transversal	43
25. <i>Copaifera duckei</i> , cotilédone, epiderme, parede periclinal externa em MEV	44
26. <i>C. martii</i> , cotilédone, epiderme, parede periclinal externa em MEV	44
27. <i>C. reticulata</i> , cotilédone, epiderme, parede periclinal externa em MEV	44
28. <i>C. duckei</i> , cotilédone, epiderme e mesofilo, secção transversal em MEV	44

Artigo I

29. <i>C. martii</i> , cotilédone, epiderme e mesofilo, secção transversal em MEV	44
30. <i>C. reticulata</i> , cotilédone, epiderme e mesofilo, secção transversal em MEV.	44
31. <i>C. duckei</i> , plúmula, protoderme, parede periclinal externa em MEV	44
32. <i>C. martii</i> , eixo embrionário, secção longitudinal em MEV	44
33. <i>C. reticulata</i> , eixo embrionário, secção transversal em MEV	44
34. <i>Copaifera duckei</i> , tegumento em seção transversal, compostos fenólicos	45
35. <i>C. martii</i> , tegumento em seção transversal, polissacarídeos ácidos	45
36. <i>C. reticulata</i> , tegumento em seção transversal, pectina	45
37. <i>C. duckei</i> , cotilédone em seção transversal, polissacarídeos ácidos	45
38. <i>C. martii</i> , cotilédone em seção transversal, proteínas totais	45
39. <i>C. reticulata</i> , cotilédone em seção transversal, alcalóides	45
40. <i>C. duckei</i> , cotilédone em seção transversal, lipídeos totais	45
41. <i>C. martii</i> , cotilédone em seção transversal, lipídeos totais	45
42. <i>C. reticulata</i> , cotilédone em seção transversal, pectina	45

Artigo II

1. <i>Copaifera duckei</i> , desenvolvimento pós-seminal	69
2. <i>C. martii</i> , desenvolvimento pós-seminal	69
3. <i>C. reticulata</i> , desenvolvimento pós-seminal	69
4. <i>Copaifera duckei</i> , plântula totalmente formada	70
5. <i>C. martii</i> , plântula totalmente formada	70
6. <i>C. reticulata</i> , plântula totalmente formada	70
7. <i>C. duckei</i> , plântula, eofilo, face adaxial	70
8. <i>C. martii</i> , plântula, eofilo, face adaxial	70
9. <i>C. reticulata</i> , plântula, eofilo, face adaxial	70
10. <i>C. duckei</i> , plântula, pulvinulo	70
11. <i>C. martii</i> , plântula, pulvinulo	70
12. <i>C. reticulata</i> , plântula, pulvinulo	70
13. <i>Copaifera duckei</i> , plântula, estípula	70
14. <i>C. martii</i> , plântula, estípula	70
15. <i>C. reticulata</i> , plântula, estípula	70

Figura nº	Página
Artigo II	
16. <i>Copaifera duckei</i> , planta jovem totalmente formada	71
17. <i>C. martii</i> , planta jovem totalmente formada	71
18. <i>C. reticulata</i> , planta jovem totalmente formada	71
19. <i>C. duckei</i> , planta jovem, metafile	71
20. <i>C. martii</i> , planta jovem, metafile	71
21. <i>C. reticulata</i> , planta jovem, metafile	71
22. <i>C. duckei</i> , planta jovem, pulvinulo	71
23. <i>C. martii</i> , planta jovem, pulvinulo	71
24. <i>C. reticulata</i> , planta jovem, pulvinulo	71
25. <i>C. duckei</i> , planta jovem, filotaxia de eofilos e metafiles	71
26. <i>C. martii</i> , planta jovem, estípulas	71
27. <i>C. reticulata</i> , planta jovem, estípulas	71
28. <i>Copaifera duckei</i> , eofilo, face abaxial, região mediana, nervura central, tricoma tector	72
29. <i>C. martii</i> , eofilo, face abaxial, região mediana, nervura secundária, cavidade secretora	72
30. <i>C. reticulata</i> , eofilo, face adaxial, região mediana, nervura central, tricomas tectores	72
31. <i>C. duckei</i> , metafile diafanizado	72
32. <i>C. martii</i> , metafile diafanizado	72
33. <i>C. reticulata</i> , metafile diafanizado	72
34. <i>C. duckei</i> , eofilo diafanizado, região basal, cavidade secretora	72
35. <i>C. martii</i> , eofilo diafanizado, região basal, cavidade secretora	72
36. <i>C. reticulata</i> , eofilo diafanizado, região apical	72
37. <i>Copaifera duckei</i> , eofilo, face abaxial, região mediana, semi-limbo em MEV	73
38. <i>C. martii</i> , eofilo, face abaxial, região mediana, semi-limbo em MEV	73
39. <i>C. reticulata</i> , metafile, face adaxial, região mediana, nervura central em MEV	73
40. <i>C. duckei</i> , eofilo, face abaxial, região apical em MEV	73
41. <i>C. martii</i> , metafile, face abaxial, região mediana, semi-limbo em MEV	73
42. <i>C. reticulata</i> , eofilo, face adaxial, região mediana, nervura central em MEV	73

43. <i>C. duckei</i> , eofilo, face abaxial, região mediana, nervura central em MEV	73
44. <i>C. martii</i> , eofilo, face adaxial, região basal, margem em MEV	73
45. <i>C. reticulata</i> , metafilo, face abaxial, pulvinulo em MEV	73
46. <i>Copaifera duckei</i> , metafilo, região mediana, semi-limbo em secção transversal, cloroplastos	74
47. <i>C. martii</i> , metafilo, região mediana, semi-limbo em secção transversal, amido . . .	74
48. <i>C. reticulata</i> , metafilo, região mediana, semi-limbo em secção transversal, lipídeos totais	74
49. <i>C. duckei</i> , eofilo, região mediana, nervura central em secção transversal, glicídios ácidos.	74
50. <i>C. martii</i> , eofilo, região mediana, nervura central em secção transversal, glicídios ácidos.	74
51. <i>C. reticulata</i> , metafilo, região mediana, nervura central em secção transversal, feixe vascular, glicídios ácidos	74
52. <i>C. duckei</i> , metafilo, região mediana, nervura central em secção transversal, feixe vascular, glicídios ácidos, colênquima	74
53. <i>C. martii</i> , metafilo, região mediana, nervura central em secção transversal, feixe vascular, anel fibroso	74
54. <i>C. reticulata</i> , eofilo, região mediana, nervura central em secção transversal, idioblastos fenólicos	74
55. <i>Copaifera duckei</i> , eofilo, região mediana, nervura marginal, secção transversal em MEV	75
56. <i>C. martii</i> , eofilo, região mediana, semi-limbo, secção transversal em MEV	75
57. <i>C. reticulata</i> , eofilo, região mediana, semi-limbo, secção transversal em MEV . . .	75
58. <i>C. duckei</i> , eofilo, região mediana, semi-limbo, secção transversal em MEV	75
59. <i>C. martii</i> , eofilo, região mediana, nervura central, secção transversal em MEV . . .	75
60. <i>C. reticulata</i> , metafilo, região apical, raque, secção transversal em MEV	75
61. <i>C. duckei</i> , metafilo, região basal, raque, secção transversal em MEV	75
62. <i>C. martii</i> , metafilo, pulvinulo, em secção longitudinal em MEV	75
63. <i>C. reticulata</i> , metafilo, pulvinulo, secção transversal em MEV.	75

Artigo III

1. Efeitos dos óleos essenciais de duas frações de plantas, sobre a germinação de sementes de plantas daninhas. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada 96
2. Efeitos dos óleos essenciais de duas frações de plantas, sobre o desenvolvimento da raiz da planta daninha malícia. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada. 96
3. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos de diferentes óleos essenciais de três espécies de *Copaifera*, sobre o desenvolvimento da raiz da planta daninha mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha 96
4. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos de duas frações de três espécies de *Copaifera*, sobre o desenvolvimento da raiz da planta daninha mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha 97
5. Efeitos alelopáticos dos óleos essenciais de diferentes plantas doadoras, sobre o desenvolvimento do hipocótilo de plantas daninhas. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada. 97
6. Efeitos alelopáticos dos óleos essenciais de duas frações de plantas doadoras, sobre o desenvolvimento do hipocótilo de plantas daninhas. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada 97

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	ii
SINOPSE	ii
DEDICATÓRIA	iii
OFERECIMENTO	iv
AGRADECIMENTOS	v
EPÍGRAFE	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1 INTRODUÇÃO	01
2 MATERIAL E MÉTODOS	04
2.1 Seleção das espécies	04
2.2 Área de coleta de material botânico	04
2.3 Coleta de material botânico e descrição das matrizes	04
2.4 Coleta de diásporos	06
2.5 Beneficiamento dos frutos e obtenção dos propágulos	06
2.6 Biometria dos frutos e das sementes	07
2.7 Morfologia dos frutos	07
2.8 Morfologia das sementes	08
2.9 Métodos pré-germinativos	09
2.10 Morfologia do desenvolvimento pós-seminal	09
2.11 Morfologia da plântula e da planta jovem	10
2.12 Ilustrações morfológicas	11
2.13 Anatomia	11
2.13.1 Material botânico	11
2.13.2 Fixação	11
2.13.3 Laminário permanente	12
2.13.4 Laminário semi-permanente	12
2.13.5 Testes histoquímicos	12
2.13.6 Diafanização	12

2.13.7 Dissociação de epiderme	13
2.13.8 Microscopia Eletrônica de Varredura	13
2.13.9 Descrições	14
2.13.10 Ilustrações anatômicas	14
2.14 Atividade alelopática	14
2.14.1 Coleta de material botânico	14
2.14.2 Secagem e trituração do material botânico coletado	14
2.14.3 Extração dos óleos essenciais	14
2.14.4 Cálculo do rendimento dos óleos essenciais	14
2.14.5 Determinação da porcentagem de água	14
2.14.6 Análise da composição química dos óleos essenciais	17
2.14.7 Análise da atividade alelopática dos óleos essenciais	17
2.14.8 Outros procedimentos experimentais	19
2.14.9 Delineamento experimental e análise estatística dos dados	19
Artigo I MORFOLOGIA DE FRUTOS E SEMENTES DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Copaifera</i> L. (LEGUMINOSAE CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA AMAZÔNIA	20
Artigo II: MORFOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL, DE PLÂNTULAS E DAS PLANTAS JOVENS DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Copaifera</i> L. (LEGUMINOSAE CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA AMAZÔNIA	46
Artigo III: ATIVIDADE POTENCIALMENTE ALELOPÁTICA DE ÓLEOS ESSENCIAS DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Copaifera</i> L. (LEGUMINOSAE CAESALPINIOIDEAE)	76
3 CONCLUSÃO	98
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
5 APÊNDICE	
APENIDICE A – Número de registro do material botânico das matrizes	107
6 ANEXOS	
ANEXO A – Normas para formato de dissertações e teses	108
ANEXO B – Normas da Revista Brasileira de Sementes para submissão do Artigo I	134
ANEXO C – Normas da Acta Botânica Brasilica para submissão do Artigo II	140
ANEXO D – Normas do Allelopathy Journal para submissão do Artigo III	145

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, a morfologia oferece a base para a identificação e para a classificação dos vegetais, por abranger caracteres de pronta e fácil interpretação. A caracterização morfológica continua sendo utilizada, ainda que interpretada com o auxílio de métodos mais modernos. Poucas espécies reconhecidas e descritas com a utilização exclusiva da morfologia ficaram posteriormente invalidadas mediante aplicação de outros métodos (Fernandes, 1996).

Há uma necessidade crescente de conhecimentos morfológicos a respeito das espécies nos primeiros estágios de desenvolvimento. A falta de identificação científica correta de plântulas e plantas jovens impede a execução de muitas pesquisas, como estudos sobre auto-ecologia, banco de sementes e de plântulas, conservação da fauna autóctone, seleção de espécies para o enriquecimento da regeneração natural, recuperação de áreas degradadas, complementação das descrições taxonômicas, subsídios para a criação de chaves taxonômicas múltiplas e outros.

Está aumentando a demanda por manuais de identificação, principalmente para fins de manejo e conservação, pois a morfologia das plântulas também exerce importante papel durante o estabelecimento das espécies, e auxilia a caracterizar e relacionar diversos grupos taxonômicos. As características da germinação de espécies florestais representam a base para o manejo de florestas (Garwood, 1996; Moreira e Moreira, 1996).

Além da necessidade do conhecimento morfológico dos caracteres para a taxonomia, são indispensáveis conhecimentos mínimos sobre a morfologia dos frutos, das sementes, da fase que precede a germinação, até a fase em que a parte aérea está desenvolvida, para a compreensão dos mecanismos naturais e do comportamento das espécies. Tais conhecimentos constituem a base para estudos ecológicos, manejo silvicultural e especialmente para a recuperação de áreas degradadas com vegetação nativa (Kuniyoshi, 1983; Roderjan, 1983; Silva *et al.*, 1988; Moreira-Coneglian e Oliveira, 2006).

Adicionalmente aos aspectos morfológicos, os produtos do metabolismo secundário das plantas podem ser utilizados em investigações sistemáticas.

Embora os terpenóides tenham recebido menos atenção nos estudos sistemáticos de plantas em geral e de leguminosas quando comparados a outros compostos, deve-se ressaltar que a ocorrência, abundância e diversidade dos mesmos podem fornecer caracteres muito úteis para investigações sistemáticas. Na maioria dos casos onde um

estudo sobre terpenóides mais detalhado foi realizado, os resultados foram relevantes para a sistemática, remetendo à questões evolutivas intrigantes (Langenheim, 1981).

A atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa investigação científica. As plantas superiores e aromáticas, amplamente utilizadas na medicina popular, apresentam amplo espectro de atividade, e, muitas vezes, inibição comprovada contra bactérias e fungos, nas quais terpenóides e compostos fenólicos, em geral, são os principais responsáveis por estas atividades biológicas (Hulin *et al.*, 1998).

Extratos e óleos de várias espécies são eficientes no controle de fungos relacionados à diversas doenças humanas (Adam *et al.*, 1998).

Duarte *et al.* (2004) ressaltam que trabalhos sobre a atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais mostram o grande potencial de aplicação de plantas nativas, sendo que no Brasil, que apresenta uma mega-biodiversidade, estudos para prospecção de compostos com atividades de interesse medicinal ou agrônomo são prementes.

Dentre os inúmeros compostos produzidos pelas plantas, muitos possuem a função de defesa ou de fitotoxinas, inibindo ou promovendo alguns processos bioquímicos ou fisiológicos em outras espécies, e conseqüentemente, favorecendo ou inibindo a germinação e/ou o crescimento de espécies de ervas daninhas (Reigosa *et al.*, 1999; Rizvi *et al.*, 1999). Desta forma, estes compostos podem apresentar utilidade no controle de plantas invasoras, as quais são responsáveis por grandes gastos na produção agrícola.

Atualmente, o método mais utilizado para controlar as invasoras é o químico (Embrapa, 2008). Consiste na utilização de herbicidas, que aplicados sobre as plantas, interferem em seus processos bioquímicos e fisiológicos, podendo matar ou retardar significativamente o crescimento destas (Constantin, 2001). Embora prático, possui limitações, principalmente pelo uso de herbicidas sintéticos, que poluem o ambiente, além de causar resistência. Para manejar plantas daninhas tornou-se necessária a busca por novas técnicas, menos onerosas, de fácil manuseio e que auxiliem a conservação do ecossistema (Cheema e Khaliq, 2000). A utilização de compostos alelopáticos produzidos por plantas nativas representa uma alternativa promissora neste sentido.

As espécies pertencentes ao gênero *Copaifera* L. aqui estudadas são representantes da família Leguminosae, a qual conta com aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies (Lewis *et al.*, 2005; Lewis e Schrire, 2003).

Trata-se de um dos principais e mais importantes grupos de plantas superiores, sendo a terceira maior família de angiospermas, depois de Asteraceae (Compositae) e Orchidaceae. Destaca-se ainda na composição das florestas nativas brasileiras (Marchiori, 1997).

O gênero *Copaifera* L. compreende cerca de 28 espécies, das quais 16 são encontradas no Brasil e nove na Amazônia brasileira. As três espécies aqui estudadas são

encontradas no estado do Pará, sendo que *C. duckei* ocorre também no Maranhão, *C. martii* no Maranhão e em Tocantins e *C. reticulata* no Amapá e no Mato Grosso (Martins-da-Silva *et al.*, 2008).

Os indígenas denominaram o “produto milagroso”, extraído do caule da árvore, como “copahu” ou “copaiva”, proveniente de “kupa’ iwa” da língua tupi, que quer dizer “planta da qual se extrai um óleo com propriedades medicinais” (Ferreira, 1988; Cunha, 1999; Martins-da-Silva, 2006). A região Amazônica, provavelmente, é a principal fornecedora deste óleo-resina utilizado no mercado brasileiro e no mundo (Cascon e Gilbert, 2000).

Diversas espécies de copaiba são de grande importância para economia regional, em função do óleo resina extraído do tronco das árvores por meio de incisões. Tal óleo tem propriedades cicatrizantes e antiinflamatórias, sendo muito utilizado na medicina popular e, na exploração madeireira (Shanley *et al.*, 2005; Martins-da-Silva, 2006), que vem sendo feita de forma indiscriminada e predatória em várias regiões do Pará, cujas florestas têm sofrido grande pressão de corte seletivo e desmatamento.

Apesar disto, estas espécies não constam da Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção do Estado do Pará, elaborada pelo projeto biota Pará.

Para *Copaifera* L. da Amazônia brasileira, os caracteres diagnósticos de maior relevância para a distinção das espécies são: filotaxia, número e simetria dos folíolos, tipo de venação, presença de indumento nas sépalas, ovário e nervura central na face abaxial e coloração do arilo, (Martins-da-Silva *et al.*, 2008), no entanto a distinção entre táxons por vezes é dificultada, evidenciando a carência de estudos que descrevam uma maior quantidade de características morfo-anatômicas, sobretudo de *C. duckei* e *C. reticulata*, que são muito semelhantes.

Martins-da-Silva (2006) constatou um elevado número de características potencialmente diagnósticas que a morfoanatomia de plântulas e plantas jovens pode fornecer para o aprofundamento das descrições taxonômicas do grupo. Ressaltou a importância de se dar continuidade aos estudos das espécies nestas primeiras fases de desenvolvimento.

Diante desta indicação, este estudo teve por objetivo caracterizar os aspectos morfológicos de frutos, plântulas e plantas jovens de *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke. Assim como a morfoanatomia e ocorrência e distribuição espacial dos metabólitos nas sementes e nos limbos foliolares de eófilos e metafilos, para corroborar com a distinção taxonômica entre *C. duckei* e *C. reticulata*, as duas espécies mais semelhantes do gênero que ocorrem na Amazônia.

Por fim, objetivou também avaliar os potenciais efeitos alelopáticos do óleo essencial das folhas e dos galhos de *Copaifera duckei*, *C. martii* e *C. reticulata*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção das espécies

As espécies foram selecionadas considerando-se os caracteres diagnósticos de maior relevância para a distinção das *Copaifera* L., atualmente descritas para Amazônia brasileira (Martins-da-Silva *et al.*, 2008).

Foram então selecionadas *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke, visando principalmente, fornecer subsídios para a distinção destas duas últimas espécies, as mais semelhantes da Amazônia brasileira.

2.2 Área de coleta de material botânico

As matrizes selecionadas para este estudo estão, em várias áreas, no Estado do Pará.

No Mapa 1 pode-se observar a distribuição dos espécimes que forneceram folhas, galhos, frutos e sementes para os estudos aqui desenvolvidos.

2.3 Coleta de material botânico e descrição das matrizes

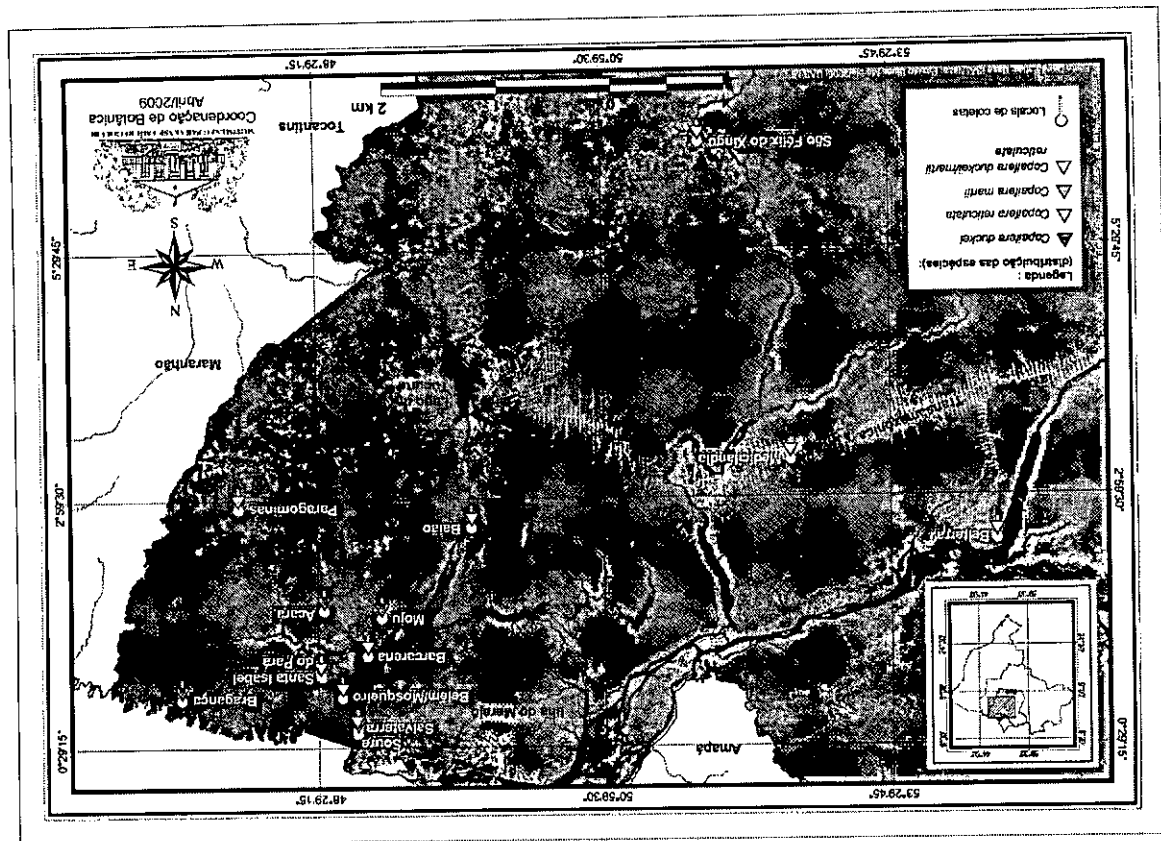
Foram realizadas visitas regulares aos locais, a fim de marcar as matrizes e coletar material botânico fértil das matrizes, para confecção de exsicatas, identificação e obtenção de frutos, sementes, folhas e galhos.

Durante a coleta de material fértil com frutos e sementes, além das informações usuais, registraram-se as características dos frutos (odor, coloração, textura, tamanho e formato) e das sementes a coloração do tegumento, textura, coloração e textura do arilo.

Para determinadas matrizes, visando obter um número suficiente de propágulos, foram feitas várias coletas de frutos e sementes. As referências de coletor e número de tombamento de herbário constam no Quadro 1. Cumpre esclarecer que foram mantidos os nomes e números dos coletores que realizaram a primeira coleta botânica de cada matriz.

As exsicatas das plantas matrizes foram incorporadas aos acervos do Herbário da Embrapa Amazônia Oriental, Belém – Pará (IAN) e do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará (MG).

Mapa 1. Distribuição dos espécimes dos quais foram coletados folhas, galhos, frutos e semente.



Quadro 1. Número de registro do material botânico de algumas matrizes das espécies estudadas.

Espécies	Nomes vernaculares	Nº Herbário	Coletor e Nº
<i>Copaifera duckei</i>	"copaíba", "podói"	IAN 175602	Martins-da-Silva, R. C. V., 76
		IAN 175.605	Martins-da-Silva, R. C. V., 79
		IAN 180659	Nascimento, M. P. do, 402
<i>Copaifera martii</i>	"copaibarana", "copaíba de restinga", "copaíba de canga"	IAN 176.276	Gurgel, E. S. C., 137
		IAN 176.278	Gurgel, E. S. C., 138
		IAN 179.134	Martins-da-Silva, R. C. V., 115
		IAN 179.135	Martins-da-Silva, R. C. V. 116
<i>Copaifera reticulata</i>	"copaíba", "copaíba branca", "copalba da folha pequena"	MG 186.090	Gurgel, E. S. C. 592
		IAN 176.207	Jesus, M. L. B. 51
		IAN 178.950	Nascimento, M. P. do, 258
		IAN 180.400	Oliveira, J. C. L 321

Frutos e sementes provenientes de determinados indivíduos, dos quais não foram obtidos propágulos em quantidade suficiente para realizar todos os estudos, mas que serviram para teste, descrição exploratória ou aquisição de imagens, cujos resultados não fazem parte diretamente da tese, encontram-se relacionados no Apêndice 1.

2.4 Coleta de diásporos

Os frutos foram coletados diretamente das copas ou no chão, na área de projeção das copas sob as matrizes, de 3 a 5 indivíduos de cada espécie, em seguida transportados para o laboratório de Morfologia de frutos, sementes e plântulas do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará.

Durante a coleta utilizou-se podão, tesoura de poda, sacos plásticos e etiquetas.

No laboratório, as amostras colhidas de cada indivíduo, de cada espécie, foram cuidadosamente identificadas para, a realização das etapas subseqüentes.

2.5 Beneficiamento dos frutos e obtenção dos propágulos

Após a coleta, os frutos foram mantidos em temperatura ambiente por 24 horas e, posteriormente, beneficiados até a completa limpeza das unidades de dispersão, com a retirada dos arilos manualmente.

Foram eliminados frutos e sementes mal formados, com injúrias mecânicas e/ou predados.

A maioria das sementes, após beneficiadas, foram acondicionadas em sacos de papel etiquetados e armazenados em câmara fria, do Laboratório de sementes da Embrapa Amazônia Oriental, com temperatura e umidade relativa adequadas e recomendadas para as espécies tropicais, até a instalação dos testes subseqüentes de germinação.

Parte das sementes foi embebida por 24 horas, seccionada longitudinalmente e transversalmente, fixada em FAA 50% (Johansen, 1940) e armazenada em álcool 50% para a confecção das lâminas.

Após a embebição, também foram também fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965) para a realização imediata dos testes histoquímicos, e futura aquisição de micrografias de varredura.

2.6 Biometria dos frutos e das sementes

As características biométricas dos frutos e das sementes foram obtidas, medindo-se o comprimento, largura e espessura de frutos e sementes, com auxílio de paquímetro digital (precisão de 0,1mm).

As medidas de tamanho foram registradas em centímetros para frutos e em milímetros para sementes.

Para os frutos considerou-se comprimento à medida que vai do ápice do fruto até a base do estípite, largura e espessura a parte mais larga e espessa do fruto, medidos antes da deiscência.

Nas sementes foi considerado comprimento a medida que vai do ápice até a base, isto é a região de protrusão da raiz, largura e espessura, a parte mais larga e espessa da semente, respectivamente.

2.7 Morfologia dos frutos

Foram utilizados frutos maduros, sadios, inteiros, sem deformações, para registrar a morfologia geral, a classificação, coloração na maturação, textura, consistência do pericarpo, deiscência e indumento, a síndrome de dispersão, número e posição das sementes no fruto.

As inferências sobre dispersão foram obtidas comparando-se as características morfológicas de frutos e das sementes com trabalhos já publicados.

A terminologia e a metodologia empregadas foram de acordo com os trabalhos de Systematics Association Committee for Descriptive Terminology (1962), Font-Quer (1963), Lawrence (1970), Roth (1977), Dudik (1981), Gunn (1981a, 1981b, 1991), Pijl (1982),

Crestana e Beltrati (1988), Van Roosmalen (1985), Stern (1992), Spujt (1994), Barroso *et al.* (1999) e Gurgel *et al.* (2002).

As observações sobre a morfologia foram efetuadas visualmente quando possível e complementadas com o auxílio de estereomicroscópio Zeiss, com câmara clara acoplada, para melhor identificação das estruturas e do indumento.

2.8 Morfologia das sementes

Para descrição da morfologia externa e interna das sementes foram utilizados, em média, 30 unidades de cada espécime, retiradas aleatoriamente.

Foram feitos cortes transversais e longitudinais com lâmina de aço, para observação da consistência e do tamanho do endosperma em relação ao embrião, bem como a sua posição no interior da semente. Considerou-se base da semente a extremidade próxima ao ápice da radícula.

Com o auxílio de estereomicroscópio Zeiss Zeiss Stemi SV6 foram observadas as características internas e externas em detalhe.

Para o estudo da morfologia interna, as sementes foram despontadas, tomando-se cuidado para não danificar, principalmente, o eixo embrionário e deixadas por 24 horas em água para a reidratação.

Foram analisadas as características morfológicas externas usuais em estudos que subsidiam a identificação morfológica.

Apenas sementes isentas de atrofias, injúrias, ataque de insetos e livres de impurezas foram utilizadas.

Os seguintes parâmetros morfológicos foram analisados:

a) externos: consistência, coloração e superfície da testa e do arilo; forma, posição do hilo, lente, micrópila e rafe.

b) internos: embrião, isto é, cotilédones, eixo embrionário e plúmula quanto ao desenvolvimento, forma e coloração.

A metodologia e a terminologia empregadas, e os parâmetros observados para as descrições, estão de acordo com os trabalhos de Boelcke (1946), Martin (1946), Corner (1951), Systematics Association Committee for Descriptive Terminology (1962), Font-Quer (1963), Pijl (1982), Van Roosmalen (1985), Gunn (1981a, 1981b, 1991), Stern (1992), Werker (1997), Barroso *et al.* (1999) e Gurgel *et al.* (2002).

2.9 Métodos pré-germinativos

O único tratamento pré-germinativo aplicado foi a imersão, de 100 sementes de cada espécie, em água corrente por 72 horas (Melo, 2001) promovendo assim a embebição.

2.10 Morfologia do desenvolvimento pós-seminal

O substrato e o recipiente utilizados para o acompanhamento do desenvolvimento pós-seminal foi definido de acordo com a variação bio-morfológica das sementes.

Para a germinação de todos os espécimes, foram embebidas em água por 24 horas 100 sementes de cada espécie, em média 30 de cada espécime, utilizando-se como substrato, areia mais serragem (1:1) ambas esterilizadas, colocado em bandejas plásticas de 80 x 40 x 20 cm, dispostas sobre bancada de madeira de 1 x 1 x 5 m, localizadas em áreas cobertas com sombrite a 50%, no horto botânico Jacques Huber, da Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém – Pará). A sementeira foi feita a 0,5 cm de profundidade.

A irrigação foi feita com auxílio de um regador, adicionando-se água em quantidade suficiente para manter apenas a umidade do substrato sem encharcá-lo.

Foi considerado desenvolvimento pós-seminal o período compreendido desde o entumescimento da semente até a liberação dos cotilédones, antes da total expansão do eofilo.

Para a descrição morfológica do processo germinativo foram consideradas apenas as unidades que apresentaram raiz primária, hipocótilo e cotilédones normais.

As avaliações, tomadas de medidas e aquisição de fotografias foram feitas diariamente, durante todo o período do desenvolvimento seminal até a formação das plantas jovens.

Esta fase foi acompanhada detalhadamente, foram verificados todos os caracteres morfológicos, sob estereomicroscópio binocular, potencialmente diferenciativos e úteis na identificação das espécies.

Os elementos vegetativos descritos e ilustrados foram os mesmos utilizados por Gurgel *et al.* (2002) e a terminologia de acordo com Systematics Association Committee for Descriptive Terminology (1962), Font-Quer (1963), Duke (1965, 1969), Duke e Polhill (1981), Roderjan (1983), Stern (1992), Oliveira (1993), Oliveira (1997, 2001).

2.11 Morfologia da plântula e da planta jovem

Para obtenção de plântulas, foram utilizados os mesmos recipientes, substratos e condições citadas para o acompanhamento do desenvolvimento pós-seminal.

Considerou-se plântula quando os eófilos estavam totalmente formados (Duke e Polhill, 1981), e planta jovem quando do aparecimento dos demais eófilos, os quais foram denominados metafilos, principalmente por já apresentarem filotaxia alterna, igual a da planta adulta.

Visando a descrição morfológica, foram selecionadas as dez plântulas mais vigorosas, obtidas por semeadura direta e provenientes de cada um dos espécimes estudados.

Foram selecionadas e utilizadas apenas as imagens adquiridas dos indivíduos que apresentaram as características mais constantes para cada espécie.

Os elementos vegetativos descritos e ilustrados foram os mesmos sugeridos por Roderjan (1983), com modificações segundo Gurgel *et al.* (2002):

- Raiz (principal e laterais): forma, coloração, superfície e pilosidade;
- Coleto: forma, coloração, superfície e indumento;
- Hipocótilo: forma, coloração, superfície, indumento, presença de catáfilos, lenticelas, estrias e descamações;
- Cotilédones: posição, inserção, forma, coloração, nervação, pecíolo e indumento;
- Epicótilo: forma, coloração, superfície, indumento, presença de lenticelas e estipulas;
- Eófilos e metafilos: prefolheação, filotaxia, forma, indumento, coloração, nervação, ráque, pecíolo, pulvino, pulvinulo.

A terminologia empregada para esta fase está de acordo com Systematics Association Committee for Descriptive Terminology (1962), Font-Quer (1963), Duke (1965, 1969), Hickey (1979), Duke e Polhill (1981), Roderjan (1983), Stern (1992), Oliveira (1993), Oliveira (1997, 2001).

Para cada espécie, parte do material obtido, à partir do processo germinativo até a completa diferenciação em plântulas foi armazenado em álcool, água destilada e glicerina (2:2:1).

Depositou-se a coleção testemunha, em meio líquido no IAN e as exsiccatas das plântulas de cada espécie no MG e IAN.

2.12 Ilustrações morfológicas

Foram ilustrados, com fotografias, os principais caracteres morfológicos de frutos e sementes, das fases do desenvolvimento

As fotografias foram feitas em lupa Zeiss Stemi SV6 com máquina digital Canon Power Shot A6 40 acoplada e máquina fotográfica digital Nikon DIX, com lentes para aumentar as estruturas.

2.13 Anatomia

2.13.1 Material botânico

Para os estudos anatômicos, de cada indivíduo, dos que foram coletadas sementes e que germinaram e se desenvolveram, foram fixadas pelo menos seis plântulas e seis plantas jovens, e dez sementes.

Os folíolos tanto dos eofilos quanto dos metafilos foram individualizados e devidamente identificados quanto a sua posição na raque, como folíolo basal (1) apical (2) e mediano (3), este último somente para aqueles que apresentaram três pares de jugas.

Posteriormente, com auxílio de lâmina de barbear, foram obtidas secções de cerca de 1 cm², obtendo-se a região basal (a), mediana (b) e apical, todas contendo nervura central, semi-limbo e margem.

As sementes, depois de embebidas por 24 horas em água destilada, tiveram os tegumentos e os embriões também seccionados com auxílio de lâmina de barbear.

2.13.2 Fixação

A maior parte do material, previamente seccionado, foi fixada em FAA 50% (formaldeído, ácido acético, etanol 50%, 5:5:90, v/v) (Johansen 1940) por 24 horas e armazenada em álcool etílico a 50% (Kraus e Arduim, 1997), para os procedimentos anatômicos subsequentes.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), algumas secções foram fixadas na solução de paraformaldeído (4%), glutaraldeído (2,5%) com cacodilato de sódio tri-hidratado (0,1 ml) e sacarose (1%) (Ruzin, 1999 modificado Karnovsky, 1965), por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, lavadas três vezes no mesmo tampão e armazenadas em álcool etílico a 70% (Kraus e Arduim, 1997).

2.13.3 Laminário permanente

Após desidratação em série etílica, parte do material foi incluído em hidróxi-etil-metacrilato (Leica) (Ruzin, 1999 modificado Gerlach 1969).

Outras secções passaram por bateria de acetato de butílica para inclusão em parafina histológica (Johansen, 1940).

Após a inclusão os blocos foram seccionados em micrótomo com 8 μ m de espessura, em seguida coradas com azul de toluidina 0,5%, pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964) e montados em Bálsamo do Canadá e resina sintética.

2.13.4 Laminário semi-permanente

O laminário semi-permanente foi obtido a partir de cortes obtidos a mão livre com lâminas de barbear, posteriormente clarificados, corados com safranina e azul de astra em solução aquosa (Krauss e Arduin, 1997 modificado Bukatsch, 1972) e montados em gelatina glicerinada (Dop e Gautié, 1928).

2.13.5 Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos foram utilizadas secções transversais de amostras frescas, alguns dos cortes histológicos foram montados e fotografados simultaneamente sem submetê-los aos reagentes, visando constatar o aspecto natural das substâncias secretadas.

Algumas secções foram submetidas aos procedimentos controle, conforme as recomendações dos respectivos autores dos testes histoquímicos realizados. Utilizaram-se os procedimentos indicados na literatura especializada (Quadro 2).

2.13.6 Diafanização

Para analisar o padrão de venação dos eófilos e metafílos, de cada espécime estudado, amostras do ápice, meio, base e a lâmina foliolar inteira foram diafanizadas.

Foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio aquoso a 10% (Krauss e Arduin, 1997) por cinco dias, trocadas a cada 24 horas, sendo que para os folíolos de *C. duckei*, os mais frágeis, foi acrescentado álcool 70% na proporção 2:1 (v/v). Depois lavados em água destilada, sendo a mesma trocada a cada hora até a retirada completa do hidróxido de sódio.

Ainda no álcool 70% foram coradas em safranina hidro-alcoolica a 3% na proporção 1:1 (Johansen, 1940), desidratada em série etanólica (Johansen, 1940) e série aceto-butílica (Krauss e Arduin, 1997) crescentes e, em seguida montadas entre lâmina e lamínula em bálsamo-do-canadá.

Quadro 2 – Testes histoquímicos aplicados para detecção das principais classes de metabólitos

Grupos metabólicos		Reagente	Tempo	Reação	Referência Bibliográfica
Lipídios	Totais	Sudam roxo escarlate	30 min	Alaranjado	Brundett <i>et al.</i> , 1991
		Sudan III		Vermelho	
Compostos fenólicos	Gerais	Cloreto férrico à 10%		5 min	Negro azuldo
	Lignina	Floroglucinol	Vermelha		
Glicídios	Ácido (pectinas)	Vermelho de Rutênio	30 min	Rósa	McCully, 1970
	Ácido (pectinas, muscilagens)	Azul de toluidina 0,5%	5 min	Reação de metacromasia ¹	
	Neutro (Amido)	Lugol	10 min	Enegrecido	
Proteínas	Totais	CBB 0,02% ²	24 horas	Azul	Gahan, 1984
Alcalóides		Reagente de Dragendorff	5 min	Castanho- amarelado	Svendsen e Verpoorte, 1983
Cristais de oxalato de cálcio		Ácido Clorídrico	Até a dissolução dos critais		Chamberlain, 1932

¹ Paredes primárias (celulose) coram de azul e roxo e as secundárias (lignina) de azul esverdeado.

² Diluído em solução etanólica acidificada de Clarke.

2.13.7 Dissociação de epiderme

Para dissociação das epidermes, limbos foliulares de eofilos e metafílos foram submetidos à solução de Jeffrey a 10% por 24 horas (Johansen, 1940).

Após a separação das epidermes adaxial e abaxial, as mesmas foram lavadas em água destilada, retirando o excesso de mesófilo com auxílio de pincéis, posteriormente coradas com azul de astra e fucsina básica (Krauss e Arduin, 1997), desidratada em série etanólica (Johansen, 1940) e série aceto-butílica (Krauss e Arduin, 1997) crescentes e, em seguida montadas entre lâmina e lamínula em bálsamo-do-canadá.

2.13.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a obtenção das micrografias de varredura, foi utilizado o material fixado em Karnovsky (1965), desidratado em série alcoólica (Gahan, 1984), processado em secador de ponto crítico usando o CO₂ como líquido de transição (Bozzola e Russel, 1991), fixado com grafite sobre suporte de alumínio e recobertos com carbono e ouro.

Foi utilizado o microscópio eletrônico LEO modelo 1450 VP do Laboratório Institucional de Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi.

2.13.9 Descrições

Para a descrição das sementes foi seguida a terminologia adotada por Metcalfe (1979), Fahn (1990), Oliveira (1999) e Moreira-Coneglian e Oliveira (2006) e para a dos limbos a terminologia foi a adotada por Theobald *et al.* (1979) e Wilkinson (1979). Ambas utilizando microscópio de luz Zeiss Axiolab.

2.13.10 Ilustrações anatômicas

Para aquisição de fotografias, uma máquina digital Canon Power Shot A6 40 foi acoplada ao microscópio, acima especificado, do laboratório de Microscopia da Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi.

2.14 Atividade alelopática

2.14.1 Coleta de material botânico

Para a obtenção do óleo essencial, foram coletadas amostras de folhas e galhos de matrizes localizadas Nordeste do Estado do Pará, no Distrito de Mosqueiro, pertencente à cidade de Belém, na fazenda Mari-Mari, às margens da PA 391, no km 28, e na Vila dos Cabanos, na Praia do Caripi, em Barcarena.

Para cada matriz, foi coletado material botânico fértil, contendo frutos, os quais foram herborizados, identificados e incorporados aos acervos dos Herbários do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará (MG) e da Embrapa Amazônia Oriental, Belém – Pará (IAN), como segue: *Copaifera duckei* Dwyer (IAN 175.605) *Copaifera martii* Hayne (IAN 176.276) e *Copaifera reticulata* Ducke (MG 186.090).

2.14.2 Secagem e trituração do material botânico coletado

Para a obtenção do óleo essencial, as amostras, já separadas em folhas e galhos, passaram por processo de secagem, em sala apropriada, com ar condicionado e desumidificador ligados 24 horas, durante sete dias e, posteriormente, trituradas com auxílio de moinho tipo Willey.

Foi utilizada a sala de secagem do Laboratório de Óleos Essenciais Adolpho Ducke da Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi.

2.14.3 Extração dos óleos essenciais

As amostras trituradas foram submetidas à hidrodestilação, em sistemas de vidro do tipo Clevenger, durante 3 h, em balões com capacidade para um litro cada, utilizando baterias de extração contendo seis mantas de aquecimento, acopladas ao sistema de refrigeração para manutenção da água de condensação entre 12-15°C. Após extração, os óleos foram centrifugados durante 5 min, a 3000 rpm, posteriormente desidratados com sulfato de sódio anidro e novamente centrifugados. Foi feito o cálculo do rendimento dos óleos em ml/100g, os quais foram armazenados em ampolas de vidro âmbar, vedadas, acondicionadas em geladeira a 5°C e, incorporadas à coleção de óleos essenciais do MPEG.

2.14.4 Cálculo do rendimento dos óleos essenciais

O rendimento dos óleos foi calculado em ml / 100g.

$$\text{rendimento} = \frac{V_{\text{óleo}} \times 100}{P}$$

$V_{\text{óleo}}$ = Volume do óleo; P = Peso do material botânico

2.14.5 Determinação da porcentagem de água

A porcentagem de água foi determinada utilizando um determinador de umidade ID50, por infravermelho, na faixa de temperatura de 60 a 180°C com incremento de 1°C e saída RS232C bidirecional.

O rendimento de óleo essencial com base na Amostra Livre de Umidade (ALU) foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{ALU} = \frac{\text{rendimento} \times 100}{(100 - \% \text{ umidade})}$$

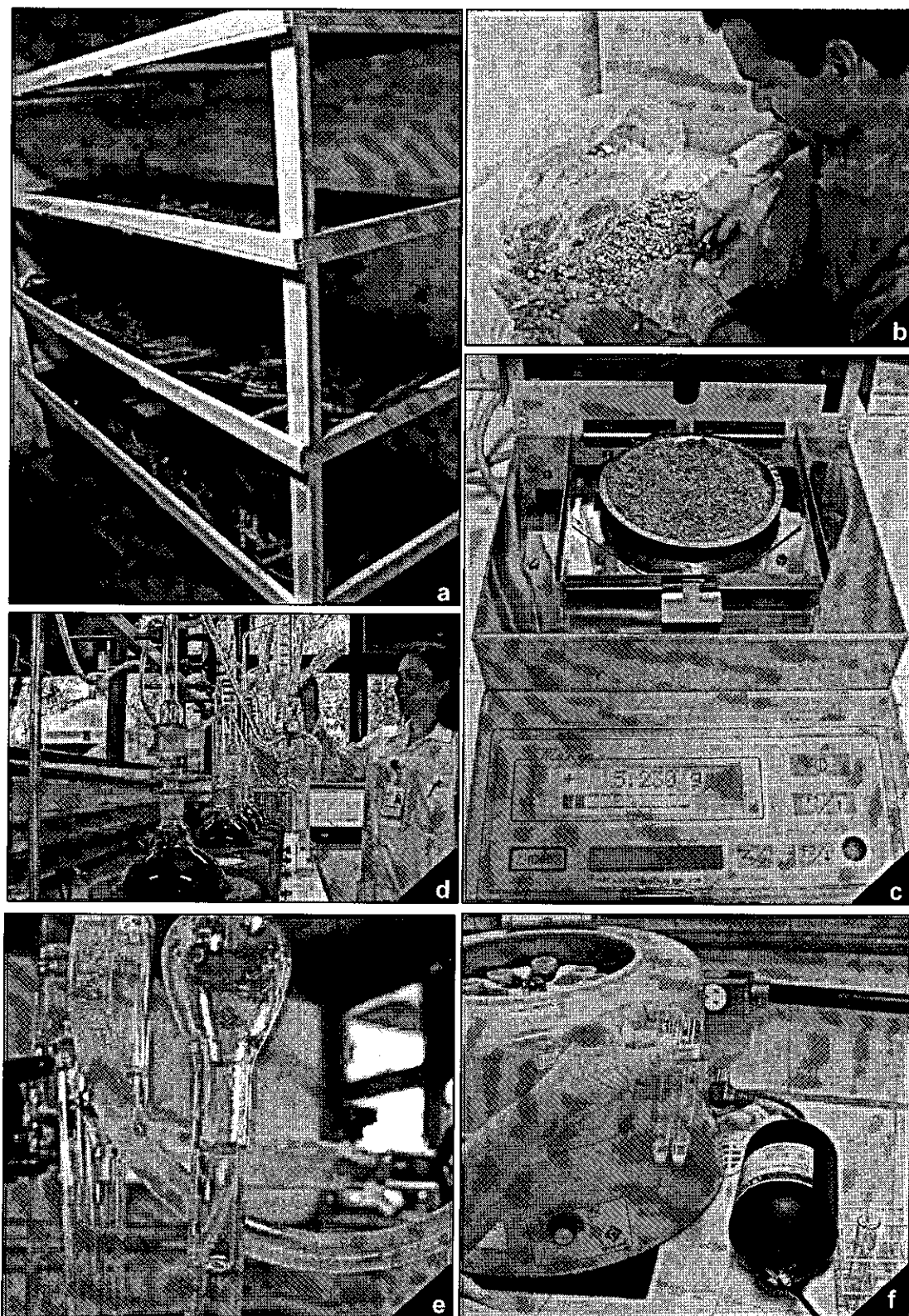


Ilustração 1. Principais etapas desenvolvidas para a extração do óleo essencial por Hidrodestilação. a) secagem do material botânico; b) preparo do material para trituração; c) equipamento utilizado para verificação do teor de água do material botânico; d) Hidrodestilação; e) detalhe do óleo essencial extraído; f) separação do óleo essencial da água.

2.14.6 Análise da composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados com auxílio de cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), em sistema Shimadzu QP-2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 mm de espessura de filme) nas seguintes condições operacionais: gás de arraste: hélio, em velocidade linear de 32 cm/s (medida a 100 °C); injeção: "splitless", (2 ml de óleo em 1 ml de hexano); temperatura do injetor e do detector: 250°C; programa de temperatura: 60 - 240°C (3°C/min); EM: impacto eletrônico, 70 eV; temperatura da fonte de íons e partes de conexão: 180°C.

A identificação foi feita por comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas do sistema e com os dados da literatura (Adams, 2007). Os IR foram obtidos utilizando a série homóloga dos n-alcenos e a quantificação dos componentes por cromatografia de gás (CG) em equipamento Shimadzu QP-2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC), nas mesmas condições operacionais acima, exceto pelo uso do hidrogênio como gás de arraste.

2.14.7 Análise da atividade alelopática dos óleos essenciais

A germinação foi monitorada em períodos de 10 dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Os bioensaios foram desenvolvidos em câmaras tipo BOD, com temperatura controlada para 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro recebeu 20 sementes de cada espécie receptora. Consideraram-se sementes germinadas aquelas que apresentavam raiz com extensão igual ou superior a 2,0 mm (Juntilla, 1976; Duram e Tortosa, 1985).

Foram selecionadas as sementes das espécies receptoras *Mimosa pudica* L. – Leguminosae Mimosoideae (malícia) e *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin e Barneby – Leguminosae Caesalpinioideae (mata-pasto) uniformemente quanto ao tamanho, formato e coloração (Labouriau, 1983), coletadas no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém, Estado do Pará, as quais passaram por processo de limpeza e tratadas com isto à quebra da dormência, via imersão em ácido sulfúrico Souza Filho *et al.* (1998).

Os bioensaios de desenvolvimento da raiz e do hipocótilo foram desenvolvidos nas mesmas condições do da germinação, tendo por diferença o fotoperíodo de 24 horas.

Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forrada com uma folha de papel filtro qualitativo, recebeu duas sementes pré-germinadas, com aproximadamente três dias de germinadas.

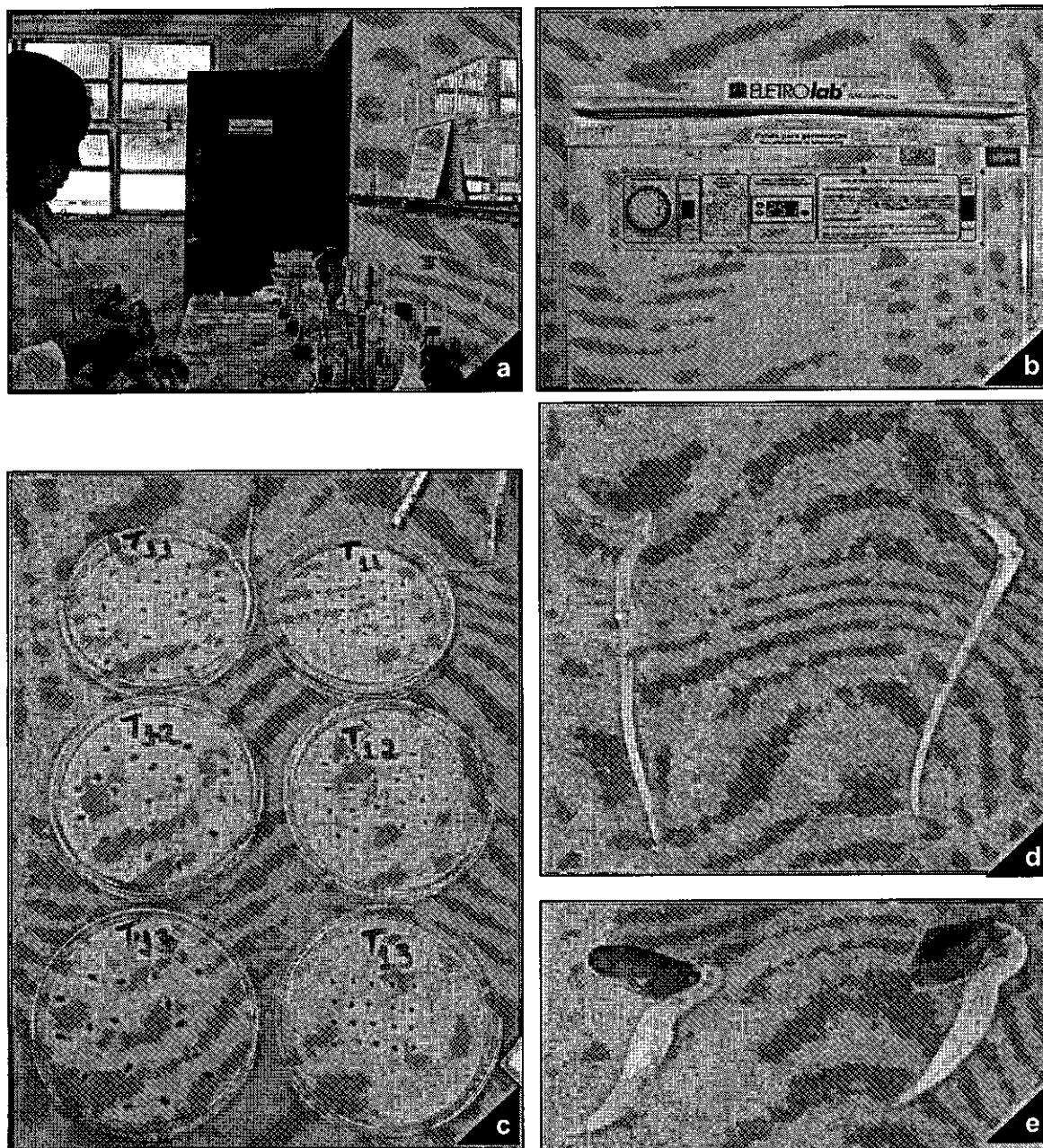


Ilustração 2. Principais etapas desenvolvidas para a análise da atividade alelopática. a) aplicação da solução teste nas placas de Petri; b) câmaras tipo BOD, com temperatura e fotoperíodo controlados; c) Placas de Petri contendo sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin e Barneby (mata-pasto) e *Mimosa pudica* L. (malícia); d) sementes pré-germinadas de *S. obtusifolia*; e) idem, *M. pudica*.

2.14.8 Outros procedimentos experimentais

Em todos os bioensaios, a concentração de teste foi de 1,0%. Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro recebeu 3,0 ml da solução teste, sendo que adicionou-se a solução teste apenas uma vez quando do início de cada bioensaio, sendo, a partir de então, acrescentado apenas água destilada sempre que necessário. Após a adição das soluções, deixava-se evaporar o solvente e adicionava-se água destilada, em volume correspondente, mantendo-se, dessa forma, a concentração original.

2.14.9 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para todos os bioensaios, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, em modelo hierárquico com dois fatores, utilizando-se, como tratamento testemunha água destilada. Analisaram-se os dados pelo teste de F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Sas, 1989). Os dados foram transformados para $\text{arc. sen. } \sqrt{x}$.

ARTIGO I

**MORFOLOGIA DE FRUTOS E SEMENTES DE TRÊS
ESPÉCIES DE *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE
CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA AMAZÔNIA**

Elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Sementes – Anexo B

Morfologia de frutos e sementes de três espécies de *Copaifera* L.

MORFOLOGIA DE FRUTOS E SEMENTES DE TRÊS ESPÉCIES DE *Copaifera* L.
(LEGUMINOSAE CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA AMAZÔNIA¹

ELY SIMONE CAJUEIRO GURGEL², MARIA SILVIA DE MENDONÇA QUEIROZ³, JOÃO
UBIRATAN MOREIRA DOS SANTOS³

RESUMO – As espécies pertencentes ao gênero *Copaifera* L. (Leguminosae) apresentam ampla utilização na região Amazônica, sendo seu óleo um dos mais importantes medicamentos naturais da floresta. Apesar da grande importância destas espécies, poucos estudos morfoanatomicos, principalmente a respeito de suas estruturas reprodutivas, foram realizados. Este estudo visou caracterizar os aspectos morfológicos de frutos, a morfoanatomia de sementes e ocorrência e distribuição espacial de metabólitos nas sementes de *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke, particularmente para dar suporte à distinção entre estas duas últimas espécies, as mais semelhantes da Amazônia. Observou-se que os frutos das três espécies são do tipo legume e não diferem entre si. A superfície do tegumento das sementes, mostrou-se predominante punctada em *C. duckei* e *C. martii* e microrreticulada em *C. reticulata*. Os cotilédones são recobertos por uma cutícula delgada e levemente estriada em *C. duckei* e estriada em *C. reticulata* e em *C. martii*. A parede periclinal externa da epiderme é levemente convexa e apresenta depressões em *C. duckei*, sendo convexa em *C. martii* e *C. reticulata*. O eixo embrionário de *C. duckei* apresenta pequeno diâmetro em relação ao seu comprimento, enquanto que os de *C. reticulata* e os de *C. martii* são proporcionais. *C. duckei* e *C. martii* apresentam plúmula rudimentar, havendo, nas respectivas espécies, um e dois relevos na região apical do eixo, já em *C. reticulata* a plúmula é um pouco diferenciada, pois além do relevo no ápice do eixo embrionário há reentrância apical diferenciada, com os folíolos em estagio inicial de desenvolvimento. Na semente madura das três espécies, compostos fenólicos e alcalóides provavelmente são as principais substâncias de defesa, enquanto lipídeos e proteínas constituem as principais reservas. Os resultados permitiram uma melhor caracterização dos aspectos morfoanatômicos e histoquímicos das sementes e frutos das três espécies, contribuindo para o esclarecimento da distinção entre os táxons, sobretudo entre *C. duckei* e *C. reticulata*.

Termos para indexação: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne e *C. reticulata* Ducke, anatomia, histoquímica.

¹Aceito para publicação em:

; parte da Tese de Doutorado

²Eng. Agrônoma, Doutoranda, Pesquisadora do Museu Paraense Emílio Goeldi, Cx. Postal 399. Av. Magalhães Barata, 376 - São Braz CEP: 66040-170 - Belém - PA - Brasil. Email: esgurgel@museu-goeldi.br

³Bióloga, Dra., Professora Titular da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM) - Manaus - AM

⁴Biólogo, Dr., Professor Adjunto da Universidade Federal Rural da Amazônia - Belém - PA

Fruit and seed morphology of three *Copaifera* L. speciesFruit and seed morphology of three Amazonian *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE
CAESALPINIOIDEAE) species

ABSTRACT – Species belonging to the *Copaifera* L. genus (Leguminosae) are widely utilized in the Amazonian popular medicine, and its oils are considered to be one of the more important natural medicines of the forest. Despite its great importance, there are few studies concerning the morphological and anatomical characteristics of the genus, especially those describing its reproductive structures. This study aimed to characterize the morphological aspects of fruits, the morpho-anatomy of the seeds and the occurrence and distribution of metabolites in the seeds of *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer and *C. reticulata* Ducke. Particularly, we aimed to better describe the taxonomic distinction between *C. duckei* and *C. reticulata*, the two closely related *Copaifera* Amazonian species. We observed that the fruit of the three species are legumes. The tegmen surface, when observed in electronic microscopy, showed to be predominantly punctuated in *C. duckei* and *C. martii*, and microreticulate in *C. reticulata*. The light line is located in the inferior third part of the exotesta in *C. martii*, while in *C. duckei* and in *C. reticulata* it occurs in the middle of the exotesta. The cotyledons are recovered with a thin, slightly striated cuticle in *C. duckei*, while the cuticle of the other two species is clearly striated. The outer periclinal wall of the epidermis is slightly convex and presents depressions in *C. duckei*, being convex in the other two species. The embryonic axis of *C. duckei* presents small diameter in relation to its length, while in *C. martii* and in *C. reticulata* these measures are proportional. *C. duckei* and *C. martii* presents rudimentary plumule, displaying one and two protuberances in the apex, respectively, but in *C. reticulata*, the plumule is poorly differentiated, once it presents leaflets in the initial stages of development. The mature seeds of the three species present phenolic compounds and alkaloids, which are probably the main defense substances of the tegmen and the epidermis of the cotyledons. Lipids and proteins are the main reserve substances of the epidermis and the parenchyma of the cotyledons. Results obtained here allowed a better characterization of the morphological, anatomical and histochemical aspects of seeds and fruits of these three species of *Copaifera*, contributing to the taxonomic distinction of the taxa, especially between *C. duckei* and *C. reticulata*, which are morphologically very similar.

Index terms: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. reticulata* Ducke, anatomy, histochemistry.

INTRODUÇÃO

Considerando a crescente demanda por produtos florestais, inclusive não madeireiros, estudos a respeito de espécies arbóreas da floresta amazônica são de fundamental importância. São necessárias pesquisas morfológicas e anatômicas para embasar aspectos auto-ecológicos das espécies, tais como dispersão, regeneração natural e dormência das sementes, uma vez que os dados biológicos aplicados às florestas temperadas não se aplicam às regiões tropicais (Crestana & Beltrati, 1988).

A família Leguminosae conta com aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies, e representa um dos principais e mais importantes grupos de plantas superiores, sendo a terceira maior família de angiospermas (Cowan & Polhill, 1981; Lewis *et al.* 2005).

O gênero *Copaifera* L. pertence à subfamília Caesalpinioideae. Após estudos realizados por vários autores, dos cerca de 100 nomes publicados, alguns foram considerados sinônimos ou transferidos para outros gêneros, sendo que apenas cerca de 43 nomes são aceitos atualmente, e alguns ainda são possíveis sinônimos. No Brasil, ocorrem cerca de 28 espécies, das quais nove encontram-se na Amazônia brasileira (Martins-da-Silva, 2006). São conhecidas popularmente por "copaíba", "copaibeira", "árvore milagrosa" e "pau d'óleo", entre outros nomes (Martins-da-Silva *et al.*, 2008). Para os indígenas, o "produto milagroso" era denominado "copahu" ou "copaiva", oriundo de "kupa' iwa" da língua tupi (Ferreira, 1988), que quer dizer "planta da qual se extrai um óleo com propriedades medicinais" (Cunha, 1999).

Copaifera L. apresenta ampla utilização na região Amazônica. O óleo de copaíba constitui um dos mais importantes medicamentos naturais da floresta e, mesmo diante da grande importância das espécies que o fornecem, são escassos os trabalhos morfoanatômicos, principalmente a respeito de suas estruturas reprodutivas.

C. duckei Dwyer, assim como *C. reticulata* Ducke, faz parte do grupo das espécies de grande porte, atingindo até 60 m de altura e habitando matas de terra firme. *C. martii* Hayne é abundante na região oriental da Amazônia, no Pará e Maranhão, e, além de ocorrer em matas de terra firme e várzea, está presente em matas de transição, capoeira, campo, campinaranas, restingas e praias de água doce, desenvolvendo-se em solos argilosos e arenosos (Martins-da-Silva, 2006).

O legume é o fruto característico de Leguminosae (Roth, 1977), o mesmo encontrado em *Copaifera* (Martins-da-Silva, 2008) sendo o mais comum na subfamília Caesalpinioideae (Burkart, 1952; Dudik, 1981; Barroso *et al.* 1999; Souza 2006).

Dentre as espécies de *Copaifera* L., que ocorrem no Brasil, uma das mais estudadas, do ponto de vista morfoanatômico é *C. langsdorffii* Desf. (Crestana & Beltrati, 1998; Oliveira, 1997). Em relação às espécies amazônicas destacam-se os estudos morfológicos de frutos, sementes e dos estádios de desenvolvimento pós-seminal de *Copaifera multijuga* Hayne. Em Alencar (1981, 1982) encontram-se dados sobre a tecnologia das sementes, além de ilustrações de frutos, sementes e plântulas. Melo (2001) acrescentou o estudo anatômico das sementes.

As estruturas reprodutivas de *Copaifera* L foram estudadas Parisca et al. (1983) Crestana e Beltrati (1988) e Melo (2001). Apesar destes trabalhos, e apesar do fato de que os caracteres anatômicos de Caesalpinioideae tenham sido estudados por diversos autores (Boelcke, 1946; Corner, 1951; Morretes, 1966; Smith, 1981; Carvalho, 1983 - 1985; Smith e Scott, 1985; Valdés e Matos, 1992; Lersten e Curtis, 1993; Melo-Pinna et al. 1999; Pascal et al, 2000; Francino et al. 2006; Oliveira, 1999; De-Paula e Oliveira, 2007a,b), diante da relevância taxonômica das características anatômicas descritas para Leguminosae (Solereder, 1908; Metcalfe 1979; Reddy e Shah 1979; Leelavathi et al, 1980; Lersten e Curtis, 1994, 1996), pode-se considerar que estudos sobre as estruturas reprodutivas de *Copaifera* L., principalmente em espécies amazônicas, são raros, justificando estudos mais aprofundados.

O presente estudo visou caracterizar os aspectos morfológicos de frutos, a morfoanatomia e a ocorrência e distribuição espacial de metabólitos secundários nas sementes de *Copaifera martii* Hayne, *Copaifera duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke. Particularmente, procurou-se contribuir com o estabelecimento da distinção entre estas duas últimas espécies, as mais semelhantes da Amazônia.

MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos foram coletados diretamente das copas ou no chão, na área de projeção das copas sob as matrizes. Foram coletados frutos provenientes de 3 a 5 indivíduos de cada espécie. No laboratório de Morfologia de frutos, sementes e plântulas do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará, foram eliminados os frutos mal formados, com injúrias mecânicas e/ou predados, assim como suas sementes.

As exsicatas das plantas matrizes foram incorporadas aos acervos do Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará (MG) e da Embrapa Amazônia Oriental, Belém – Pará (IAN), como segue: *Copaifera duckei* Dwyer: IAN 175.602, IAN 175.605 e IAN 180.659; *Copaifera martii* Hayne: IAN 176.276, IAN 176.278, IAN 179.134, IAN 179.135 e IAN 179.136; *Copaifera reticulata* Ducke: MG 186.090, IAN 176.207, IAN 178.950 e IAN 180.400.

Para registrar a morfologia geral, a classificação, a coloração na maturação, a textura, a consistência do pericarpo, a deiscência e indumento, e o número e posição das sementes no fruto, foram examinados 30 frutos e sementes maduros, retirados aleatoriamente de cada indivíduo estudado.

Foram descritas as características usuais que permitem a identificação das sementes, tais como consistência, coloração, superfície da testa e do arilo, forma, posição do hilo, lente, micrópila e rafe. Após a escarificação e embebição das sementes em água por 24 horas foram feitos cortes transversais e longitudinais com lâmina de aço para o estudo das características morfológicas internas dos cotilédones, eixo embrionário e plúmula.

A terminologia e a metodologia empregadas estão de acordo com os trabalhos de Martin (1946), Corner (1951), Systematics Association Committee for Descriptive Terminology (1962), Font-Quer (1963), Roth (1977), Dudik (1981), Gunn (1981a, 1981b, 1991), Pilj (1982), Van Roosmalen (1985), Stern (1992), Gurgel et al. (2002), Spujt (1994), Werker (1997) e Barroso et al. (1999).

As observações sobre a morfologia foram feitas visualmente, quando possível, e complementadas com o auxílio de estereomicroscópio Zeiss Stemi SV6, para melhor identificação das estruturas e do indumento.

Para os estudos anatômicos, as sementes foram previamente embebidas por 24 horas em água destilada, o tegumento foi removido, e os embriões foram cortados com auxílio de lâmina de barbear. Posteriormente foram fixados em FAA 50% (Johansen 1940) ou na mistura de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e então conservados em álcool etílico a 70%. Após desidratação em série etílica, o material foi incluído em hidróxi-etil-metacrilato (Leica) (Ruzin, 1999 modificado por Gerlach 1969) e outras secções passaram por bateria de acetato de butíla para inclusão em parafina histológica (Johansen, 1940), e seccionadas em micrótomo com 8 μ m de espessura, em seguida coradas com azul de toluidina 0,5%, pH 4,7 (O'Brien et al. 1964) e montadas em Bálsamo do Canadá. Os cortes frescos foram corados com azul de Astra e safranina (Krauss & Arduin, 1997 modificado Bukatsch 1972).

Foi utilizado o azul de toluidina 0,5% acidificado com HCl 1N para pH 3,0 (por 5 minutos) para observação de polissacarídeos ácidos (McCully, 1970); vermelho de rutênio (por 30 minutos) que indica pectina; lugol (por 10 minutos) para amido, floroglucinol em meio ácido para lignina (por 5 minutos); cloreto férrico para verificar a presença de compostos fenólicos (por 30 minutos) (Johansen 1940); sudan roxo escarlate (por 30 minutos) para detectar lipídios totais (Brundett et al., 1991), CBB 0,02% (Azul brilhante de Comassie 250 R) diluído em solução etanólica acidificada de Clarke (por 24 horas) para identificação de proteínas totais (Gahan,

1984), reagente de Dragendorff (por 5 minutos) para alcalóides (Svendsen & Verpoorte, 1983), Ácido Clorídrico, até dissolver os cristais de oxalato de cálcio (Chamberlain, 1932).

Algumas secções foram submetidas aos procedimentos controle, simultaneamente, conforme as recomendações dos respectivos autores dos testes histoquímicos realizados.

Para a microscopia eletrônica de varredura, secções das sementes foram previamente fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, na mistura de Karnovsky (1965) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, lavadas três vezes no mesmo tampão e desidratadas em série alcoólica (Gahan, 1984), processadas em secador de ponto crítico usando o CO₂ como líquido de transição (Bozzola & Russel, 1991). Foram fixadas com grafite sobre suporte de alumínio e recobertas com carbono e ouro. As imagens foram obtidas no Laboratório Institucional de Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi, utilizando o microscópio eletrônico LEO modelo 1450 VP.

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz Zeiss Axiolab seguindo a terminologia adotada por Metcalfe (1979), Fahn (1990), Oliveira (1999) e Moreira-Coneglian & Oliveira (2006). Para aquisição de fotografias, uma máquina digital Canon Power Shot A6 40 foi acoplada ao microscópio do laboratório de Microscopia da Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica dos frutos

Copaifera duckei Dwyer, *C. martii* Hayne e *C. reticulata* Ducke apresentam fruto do tipo legume, característico de Leguminosae e o mais comum na subfamília Caesalpinioideae (Roth, 1977), o mesmo encontrado em *Copaifera* L. (Martins-da-Silva, 2008).

Em média, o pedicelo das espécies aqui estudadas é curto (1,1–3,0 x 2,0–3,0 mm), sendo o de *C. reticulata* um pouco maior (2,8–5,3 x 1,3–1,9 mm). Apresentam estrias longitudinais, cálices não persistentes, glabrescentes, rugosos, castanhos, opacos, lígneos, com lenticelas estouradas e intactas, castanho-avermelhadas.

Na maioria das Leguminosae Caesalpinioide os frutos apresentam várias sementes (Dudik, 1981). Em *C. langsdorfii* amadurecem como unispermos, apesar de inicialmente apresentarem dois óvulos no ovário (Beltrati & Crestana, 1982). Martins-da-Silva (2006) cita que os frutos das espécies de *Copaifera* que ocorrem na Amazônia são monospérmicos e raramente desenvolvem as duas sementes. Neste trabalho observou-se que cerca de 10% dos frutos de *C. martii*, 5% dos de *C. duckei* e menos de 2% de *C. reticulata* contêm duas sementes.

Para Dwyer (1951), a ocorrência de frutos maiores em *C. duckei* poderia ajudar a distingui-lo de *C. reticulata*. Entretanto Martins-da-Silva (2006) cita que na FLONA do Tapajós foram encontrados frutos de *C. reticulata* maiores do que os de *C. duckei*. Os dados morfométricos dos frutos das espécies aqui estudadas encontram-se nas Tabelas 1, 3 e 5.

Os frutos são monocarpelares, secos, estenocárpicos, com estípite levemente comprimido em *C. duckei*, espessado em *C. martii*, e obliterado no fruto maduro de *C. reticulata*.

Em todas as espécies são sub-apiculados, deiscentes ao longo da sutura. A abertura de todas as camadas do fruto inicia-se pelo ápice das valvas lígneas e lisas internamente, que não se tornam enroladas ou espiraladas, como ocorre em algumas espécies desta subfamília, e permanecem aderidas ao pedicelo quando atingem a maturação. Inicialmente apresentam-se esverdeados, mas à medida que amadurecem, tornam-se avermelhados até adquirirem a cor castanha.

Os frutos de *C. duckei* são orbiculares a obovados, às vezes oblíquos, com base truncada e ápice arredondado (Figura 1). Os frutos de *C. martii* vão de sub-orbiculares a oblíquos, comprimidos na região marginal (Figura 2) e os de *C. reticulata* são oblongo-oblíquos (Figura 3) ambos com ápice e base arredondados.

Em corte transversal, os frutos de todas as espécies, são elípticos. As margens são inteiras e não constrictas, pericarpo maduro seco cartáceo, glabro, com raríssimos tricomas na base, externamente opaco. Na região mediana observa-se a exsudação, em abundância, de óleo resina, internamente castanho claro, lígneo, glabro e não septado. As descrições das espécies aqui verificadas enquadram-se nas descrições genéricas feitas por diversos autores (Burkart, 1952; Dudik, 1981; Barroso et al. 1999; Souza 2006).

Beltrati & Crestana (1982) ressaltaram o fato de que *C. langsdorffii* Desf. é valorizada pelo óleo que exuda do tronco, mas que este também ocorre em volume considerável nos frutos.

O funículo é irregular, carnoso e após a deiscência continua ligado ao fruto. Crestana & Beltrati (1988), ao descreverem a anatomia do desenvolvimento da semente de *Copaifera langsdorffii* Desf., constataram que o arilo origina-se da proliferação das células do funículo, que recobre a micrópila e cresce em diferentes direções até quase atingir a calaza. Portanto em *Copaifera* L. há um arilo verdadeiro (Pijl, 1982).

Os arilos de *C. duckei* e *C. reticulata* são amarelo-alaranjados (Figuras 4 e 6) e os de *C. martii* são brancos (Figura 5), carnosos, lisos, com bordadura conspícua e irregular; basal-medianos, pois recobrem metade da semente e apresentam-se como uma continuação do funículo. Mesmo ao se desprenderem do pericarpo permanecem ligados à semente.

Foi observado em *C. langsdorfii* (Beltrati & Crestana, 1982; Piña-Rodrigues & Aguiar, 1993) que o contraste de coloração negra e brilhante da testa e o sabor adstringente e adocicado favorecem a dispersão zoocórica (Van Roosmalen, 1985).

Caracterização morfoanatômica das sementes

Observou-se que a semente das espécies estudadas, quando madura, é apical, parietal, pêndula, estenospérmica (Figuras 7, 8 e 9), oblongo-globosa e exalbuminosa. O envoltório apresenta-se nigrescente, glabro, cartáceo quando seco e membranoso quando embebido, brilhoso, homócromo, com linhas de fratura. Em microscopia eletrônica de varredura a superfície de *C. duckei* é predominante punctada, embora apresente áreas reticuladas (Figura 13); em *C. martii* esta é punctada com campos irregulares, fechados, paredes simples, espessas, fortemente onduladas e sem ornamentação (Figura 14) e em *C. reticulata* é microrreticulada com retículos primários irregulares, sendo os campos abertos, as paredes simples, espessas, onduladas e sem ornamentação (Figura 15). Pleurograma ausente em todas as espécies.

Os dados morfométricos das sementes encontram-se listados nas Tabelas 2, 4 e 6.

Ao estudar a estrutura dos tegumentos das sementes, Corner (1976) observou que o caráter distintivo do envoltório da semente está na posição e na estrutura da principal camada mecânica, composta de células de paredes grossas, mas não necessariamente lignificadas, podendo ter um ou mais estratos de espessura. As sementes das espécies objeto deste estudo são exotestais, característica que, segundo Crestana e Beltrati (1988) é típica das Leguminosae Caesalpinioideae.

Em secção transversal a exotesta (epiderme) é recoberta por uma fina camada de cutícula composta por macroesclereídes, também denominados de células de Malpighi, os quais formam uma camada paliádica de células alongadas e irregulares, com paredes espessadas, enegrecidas devido à presença de compostos fenólicos (Figura 34). Observa-se ainda a linha lúcida ou linha clara bem visível, constituindo uma região reforçada nas paredes anticlinais das células e na mesma posição, originando uma linha contínua que acompanha toda a extensão da testa da semente (Corner, 1951, 1976). Ocorre na região mediana da exotesta tanto em *C. duckei* (Figuras 16 e 34), quanto em *C. martii* (Figuras 17 e 35), e em *C. reticulata* (Figuras 18 e 36).

Barthlott (1981) ressalta que a diversidade estrutural da superfície da epiderme, fornece dados com significativo valor taxonômico para a identificação de famílias e mesmo de espécies.

A presença da camada de células paliçádicas com paredes espessas e recobertas por substâncias hidrófobas pode impedir a embebição e as trocas gasosas das sementes (Popinigis, 1985).

Abaixo da exotesta observa-se a camada fenólica (Figura 34). A mesotesta (mesofilo) é formada por hipoderme de osteosclereídeos, ou células em ampulheta, heterodimensionais, irregulares, paredes pouco espessadas, também com compostos fenólicos (Figura 34) e polissacarídeos ácidos nas paredes (Figuras 35, 36), e grandes espaços intercelulares; o segundo estrato forma o parênquima fundamental pouco diferenciado, com células heterodimensionais, irregulares, colapsadas, paredes espessadas, com muitos espaços intercelulares em *C. duckei*, e poucos em *C. reticulata*, também com compostos fenólicos, onde se encontra a rafe linear, em leve depressão, quase da mesma cor da testa, percorrida por um feixe colateral e sem bainha de fibras diferenciadas, a qual, após atingir a calaza, que é bem distinta, prossegue como anti-rafe até a região da micrópila. A endotesta (epiderme interna) é pouco diferenciada, com uma camada de células residuais e com células comprimidas e impregnadas de lignina. Tégmen e endosperma ausentes em todas as espécies.

Os compostos fenólicos provavelmente estão presentes nas sementes de espécies florestais com a função de proteção do embrião, como antimicrobianas e antivirais, além de conferir uma vantagem para a plântula, que terá suas energias voltadas para o seu desenvolvimento (Ceballos et al., 1998; Von Teichman & Van Wyk, 1994).

A Região hilar é basal lateral, o hilo é oblongo-linear com restos funiculares fortemente aderidos (Figura 10); a micrópila globosa é perceptível apenas em microscopia eletrônica de varredura (Figura 12); lente oblonga (Figura 11) é brilhante, glabra, cartácea e um pouco proeminente em relação à testa. Trata-se de uma estrutura comum em 34% dos gêneros de Caesalpinioideae (Gunn, 1991). Deve-se ressaltar que foi reportado o formato triangular para *C. multijuga* Hayne (Melo, 2001).

O embrião é cotiledonar total, preenche todo o volume da semente. É castanho claro a amarelado, pleurorrrizo com cotilédones justapostos, crassos, oblongos, rígidos, auriculados com a radícula escondida em *C. duckei* (Figura 19) e em *C. martii* (Figura 20) e fendidos com a radícula escondida em *C. reticulata* (Figura 21).

Os cotilédones são recobertos por uma cutícula delgada e levemente estriada em *C. duckei* e estriada em *C. reticulata* e em *C. martii*. Alquini et al. (2003) ressaltam que as ornamentações presentes na cutina geralmente tem grande valor taxonômico, além de serem responsáveis por algumas das funções das células epidérmicas, entre elas a proteção contra a perda d'água. A epiderme é unisseriada, com células irregulares (Figura 28), cuja parede

periclinal externa é levemente convexa e com depressões em *C. duckei* (Figura 25) e convexa em *C. martii* (Figura 26) e em *C. reticulata* (Figura 27), sendo as anticlinais retas a levemente sinuosas, (Figuras 28, 29 e 30) com alcalóides no citoplasma (Figura 39). O mesofilo é homogêneo, sem fibras diferenciadas, preenchido por parênquima fundamental, com várias camadas de células, sendo que as células próximas a epiderme do eixo embrionário, além de apresentarem cristais de oxalato de cálcio, possuem proteínas dispersas no citoplasma na forma de corpos protéicos (Figuras 37 e 38). Há também uma reação castanho-alaranjada indicando alcalóides (Figura 39) e o teste com Sudam escarlate detectou corpos lipídicos (Figuras 40 e 41). Suas paredes são lisas e delgadas e, especificamente nos plasmodesmas, observou-se reação positiva do azul de toluidina (Figura 37), indicando a ocorrência de componentes ácidos, sendo que o vermelho de rutênio confirmou a presença de pectina (Figura 42). As células do mesofilo, que estão mais distantes da epiderme, apresentam paredes desigualmente espessadas, lembrando um colênquima angular (Moreira-Coneglian & Oliveira, 2006). Nestas células com função de reserva, a hemicelulose (manose) foi constatada pela expulsão do corante azul de toluidina da parede.

Foram visualizados feixes vasculares colaterais percorrendo a região periférica do mesofilo dos cotilédones. Não se observaram fibras diferenciadas junto aos mesmos e não se observam nervuras diferenciadas.

Espécies arbóreas da floresta tropical que apresentam sementes sem endosperma, com embriões grandes, protegidos contra a dessecação pelo envoltório da semente e às vezes com o arilo, freqüentemente apresentam sementes recalcitrantes (Von Teichman & Van Wyk, 1994).

Durante a germinação, carboidratos, proteínas e lipídeos representam as três principais classes de metabólitos de reserva retirados dos cotilédones (Carmelo-Guerreiro & Paoli, 1999). Para as espécies aqui estudadas, a presença de polissacarídeos ácidos na parede celular, e de corpos protéicos e lipídicos no citoplasma das células presentes próximas ao eixo embrionário, possivelmente compõem as reservas disponíveis para o crescimento rápido da radícula e plúmula (Farrant et al., 1993; Von Teichman & Van Wyk, 1994).

Nas espécies objeto deste estudo não foram observados amilóides. Porém estes são reportados nos cotilédones de *C. langsdorfii* (Crestana e Beltrati, 1988; Stupp et al. 2008), bem como nas espécies de *Copaifera* L. estudadas por Kooiman (1960), que ressaltou a presença em tribos taxonomicamente relacionadas.

O eixo embrionário é basal lateral e reto, o que é reportado por Oliveira (1999) como comum em Caesalpinioideae e Mimosoideae. *C. duckei* o apresenta com pequeno diâmetro em relação ao seu comprimento (Figura 22), já os de *C. reticulata* e *C. martii* (Figuras 23 e 24) são

proporcionais ao seu comprimento. Os eixos de *C. duckei* e *C. martii* têm base angulosa, ápice truncado e plúmula rudimentar, já em *C. reticulata* a base é angulosa e o ápice irregular, e a plúmula é pouco diferenciada, pois além do relevo no ápice do eixo embrionário há reentrância apical diferenciada (Figura 24).

A extremidade radicular mostra a coifa bem diferenciada, uma protoderme unisseriada e recoberta por uma fina camada de cutícula, com células cujas paredes periclinais formam retículos (Figura 31). O meristema fundamental preenche as regiões cortical e medular, com células alongadas de formato retangular e pouco vacuolizadas principalmente na região radicular. O procâmbio não apresenta grande diferenciação. As células também são alongadas, com citoplasma denso e sem reservas (Figuras 32 e 33). Descrições semelhantes foram feitas por Oliveira (1999) para espécies de leguminosas.

CONCLUSÕES

As características morfoanatômicas inerentes às sementes são efetivamente úteis para separar as espécies estudadas, podendo-se enfatizar o padrão da superfície do tegumento, a superfície da parede periclinal externa dos cotilédones e o estágio de desenvolvimento da plúmula.

Em microscopia eletrônica de varredura a superfície do tegumento de *C. duckei* e *C. martii* é predominante punctada e em *C. reticulata* é microrreticulada.

Os cotilédones são recobertos por uma cutícula delgada e levemente estriada em *C. duckei* e estriada em *C. reticulata* e em *C. martii*. A parede periclinal externa da epiderme é levemente convexa e com depressões em *C. duckei* e convexa em *C. martii* e em *C. reticulata*.

O eixo embrionário em *C. duckei* apresenta pequeno diâmetro em relação ao seu comprimento, já os de *C. reticulata* e *C. martii* são proporcionais. Os eixos de *C. duckei* e *C. martii* têm base angulosa, ápice truncado e plúmula rudimentar, em *C. reticulata* a base é angulosa e o ápice irregular, e a plúmula é pouco diferenciada, pois além do relevo no ápice do eixo embrionário há reentrância apical diferenciada.

Para as espécies aqui investigadas, compostos fenólicos e alcalóides que estão presentes no tegumento e na epiderme dos cotilédones, respectivamente, são provavelmente as principais substâncias relacionadas à defesa do embrião e que favorecem o desenvolvimento da plântula.

Polissacarídeos ácidos da parede celular, corpos protéicos e lipídicos no citoplasma das células cotiledonares próximas ao eixo embrionário, possivelmente constituem as principais reservas das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J. da C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne – leguminosa, na Amazônia Central. 1 – Germinação. **Acta Amazônica**, v.11, n.1, p.3-11, 1981.
- ALENCAR, J. da C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne – leguminosa, na Amazônia Central. 2 – Produção de óleo-resina. **Acta Amazônica**, v.12, n.1, p.75-89, 1982.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M.R.T; COSTA, C.G.; BARROS, C.F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (eds.). **Anatomia vegetal**, 2ª ed. 2006. p.87-107.
- BARROSO, G.M.; AMORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 1999. 443p.
- BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany**., v.1, n.3, p.345-355, 1981.
- BOELCKE, O. Estudio morfológico de las semillas de Leguminosae Mimosoideae y Caesalpinioideae de interés agronómico em la Argentina. **Darwiniana**, v.7, n.2, p.240-321, 1946.
- BOZZOLA, J.J; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. New York: Jones and Bartlett Publishers, 1991. 452 p.
- BRUNDETT, M. C.; KENDRICK, B.; PETERSON, C. A. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. **Biotechnic e Histochemistry**, v.66, p.111-116, 1991.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v.61, p.255, 1972.
- BURKART, A. **Las Leguminosas Argentinas sylvestres y cultivadas**. Buenos Aires: Acne Agenc., 1952. 590p.

CARMELO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A.A.S. Aspectos morfológicos e anatômicos da semente de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem. – Anacardiaceae), com notas sobre paquicalaza. **Revista Brasileira de Sementes**, v.2, n.1, p.222-228, 1999.

CARVALHO, D.M.G. 1983-1985. Anatomia foliar de *Cassia ensiformis* Vell. (Leguminosae - Caesalpinioideae). **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v.27, p.157-169.

CEBALLOS, L; HOSSAERT-MCKEY, M.; MCKEY, D.; ANDARY, C. Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of *Sesbania* (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of polyphenolic compounds in anti-pathogen defense of seedlings. **Chemoecology**, v.8, p.141–151, 1998.

CHAMBERLAIN, C. J. **Methods in plant histology**. 5 ed. Illinois: University of Chicago, p. 86. 1932.

CORNER, E.J.H. The leguminous seed. **Phytomorphology**, v. 1, p.117-150, 1951.

CORNER, E.J.H. **The seeds of Dicotyledons**. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1976. v.1, p.161-172.

CORNER, E.J.H. **The seeds of Dicotyledons**. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1976. v.2, p.262-289.

COWAN, R.S.; POLHILL, R.M. Detarieae DC. In: POLHILL, R.M; RAVEN, P.H. (eds.). **Advances in Legumes Systematics** part 2. England: Royal Bot. Garden, Kew, Richmond, Surrey, 1981. p.897-901.

CRESTANA, C.M; BELTRATI, C.M. Morfologia e anatomia das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae). **Naturalia**, v.13, p.45-54, 1988.

CUNHA, A.G. da. **Dicionário histórico das palavras portuguesas de origem tupi**. Brasília: Melhoramentos, 1999.120p.

DE-PAULA, O.C.; OLIVEIRA, D.M.T. Variação da estrutura carpelar em seis espécies de Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasílica**, v.21, n.4, p.915-925, 2007a.

DE-PAULA, O.C.; OLIVEIRA, D.M.T. Anatomia da região sub-hilar de sementes de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.1 (supl), p.345-347, 2007b.

DUDIK, N.M. Morphology of the pods of Leguminales (Fabales). In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (eds.). **Advances in Legumes Systematics**, part. 2. England: Kew, Richmond, Surrey, Royal Bot. Garden, 1981. p.897-901.

DWYER, J.D. The Central American, West Indian and South American Species of *Copaifera* (Caesalpinioideae). **Brittonia**, v.7, n.3, p.143-172, 1951.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. Oxford: Pergamon Press, 4th ed., 1990. 588p.

FARRANT, J.M.; BERJAK, P.; CUTTING, J.G.M.; PAMMENTER, N.W.; The role of plant growth regulators in the development and germination of the desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina*. **Seed Science Research**, v.3, p.55-63, 1993.

FERREIRA, A.B. de H. **Novo dicionário da língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Nova fronteira, 1988. 1498p.

FONT-QUER, P. *Dicionário de botânica*. Barcelona: Labor. 1963. 1244p.

FRANCINO, D.M.T., SANT'ANNA-SANTOS, B.F., SILVA, K.L.F.; THADEO, M.; MEIRA, R.M.S.A.; AZEVEDO, A.A. Anatomia foliar e caulinar de *Chamaecrista trichopoda* (Caesalpinioideae) e histoquímica do nectário extrafloral. **Planta daninha**, v.24, n.4, p.695-705, 2006.

GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and citochemistry**. London: Academic Press, 1984. 301p.

GERLACH, D. **Botanische mikrotechnik**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1969.311 p.

GUNN, C.R.. Seeds of Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (eds.), **Advances in Legumes Systematics** part. 2. England: Royal Bot. Garden, Kew, Richmond, Surrey, 1981a. p.913-925.

GUNN, C.R. Seed topography in the Fabaceae. **Seed Science & Technology**, v.9, n.3, p.737-757, 1981b.

GUNN, C.R. Fruits and seeds of genera in the sub-family Caesalpinioideae (Fabaceae). U.S.

Departament of Agriculture, **Technical Bulletin**, n.1755, 408 p., 1991.

GURGEL, E. S. C; SILVA, M. F. DA; CARREIRA, L. M. M. Morfologia do fruto, da semente e da plântula de *Calopogonium mucunoides* Desv. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Leguminosae, Papilionoideae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Série Botânica, v.18, n.1, p.37-60, 2002.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, p.137-138, 1965.

KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 9, p.208-219, 1960.

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

LEELAVATHI, P., RAMAYYA, N.; PRABHAKAR, M. Foliar stomatal distribution patterns in Leguminosae and their taxonomic significance. **Phytomorphology**, v.30, p.195-204, 1980.

LERSTEN, N.R; CURTIS, J.D. Subepidermal idioblasts in leaflets of *Caesalpinia pulcherrima* and *Parkinsonia aculeata* (Leguminosae; Caesalpinioideae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.120, p.319-326, 1993.

LERSTEN, N.R; CURTIS, J.D. Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. **Plant Systematics and Evolution**, v.192, p.231-255, 1994.

LERSTEN, N.R; CURTIS, J.D. Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of Tribe Caesalpinieae (Leguminosae; Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, v.200, n.1-2, p.21-39, 1996.

LEWIS G.P.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legume of the world**. England: Royal Bot. Garden, Kew, Richmond, Surrey, 2005. 577p.

MARTIN, A.C. The comparative internal morphology of seeds. **The American Midland Naturalist**, v.36, n.3, p.513-660, 1946.

- MARTINS-DA-SILVA, R.C.V. **Taxonomia das espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae Caesalpinoideae) ocorrentes na Amazônia brasileira.** Rio de Janeiro: Museu Nacional / Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006. 258p. (Tese de Doutorado).
- MARTINS-DA-SILVA, R.C.V. PEREIRA, J.F.; LIMA, H.C. de. O gênero *Copaifera* L. (Leguminosae – Caesalpinoideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, v.59, n.3, p.455-476, 2008.
- McCULLY, M.E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.175, p.702-711, 1970.
- MELO, M. da G.G. **Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de cinco espécies arbóreas utilizadas em Sistemas Agroflorestais na Amazônia.** Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2001. 111p. (Dissertação de Mestrado).
- MELO-PINA, G.F.A.; NEIVA, M.S.M.; BARBOSA, D.C.A. Estruturas do tegumento seminal de quatro espécies de Leguminosae (Caesalpinoideae), ocorrentes em uma área de caatinga (PE, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, p.375-379. 1999.
- METCALFE, C.R. The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. (eds.). **Anatomy of dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem.** 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1979. p. 63-75.
- MOREIRA-CONEGLIAN, I.R.; OLIVEIRA, D.M.T. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinoideae (Fabaceae). **Revista Brasileira Botânica**, v. 29, n. 2, p.193-207, 2006.
- MORRETES, B.L. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado II. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, v. 305, p.209-244, 1966.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v.59, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, D.M.T. **Análise morfológica comparativa de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Fabaceae ocorrentes no Estado de São Paulo.** Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 1997. 212p. (Tese de Doutorado).

- OLIVEIRA, D.M.T. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Revista brasileira de Botânica**, v.22, n.3, p. 413-427, 1999.
- PARISCA, L. DE; ENRECH, N.X. DE; ARROYO, M.T.K. 1983. Analisis comparativo de semillas en las especies del genero *Copaifera*. L. (Leguminosae: Caesalpinioideae, Detarieae) en Venezuela. **Acta Botanica Venezuelica**, v.14, n.1, p.215-236.
- PASCAL L. M MOTTE-FLORAC E. F MCKEY D. B. Secretory structures on leaf rachis of Caesalpinieae and Mimosoideae (Leguminosae): implications for the evolution of nectary glands. **American Journal of Botany**, v.87, n.3, p.327-338, 2000.
- PIJL, L. VAN DER. **Principles of dispersal in higher plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 162p.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M., AGUIAR, I.B de. Maturação e dispersão de sementes. In: AGUIAR, I.B. de; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais**. Brasília: ABRATES. 1993. p.350.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.
- REDDY, P.K.R. ;SHAH, G.L. Observations on the cotyledonary and hipocotyledonary stomata and trichomes in some Caesalpinieae with a note on their taxonomic significance. **Feddes Repertorium**, v.90, p.239-250, 1979.
- ROTH, I. **Fruits of Angiosperms**. Berlin: Gebrüder Born-traeger, 1977. 675p.
- RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press, 1999. 322 p.
- SMITH, D.L. Cotyledons of the Leguminosae. *In*: Polhill, R.M; Raven, P.H.(eds). **Advances in Legumes Systematics**, part. 2. England: Kew, Richmond, Surrey, Royal Bot. Garden, 1981. p.927-940.
- SMITH, D.L.; SCOTT, R.C. Cotyledon venation patterns in the Leguminosae: Caesalpinioideae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.90, p.73-103, 1985.
- SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1908. 1183p.

- SOUZA, L.A. DE; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.; PAOLI, A.A.S. Fruto. In: SOUZA, L.A. de (org.). **Anatomia do fruto e da semente**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2006. p. 11-124.
- SPJUT, R.W. A systematic treatment of fruit types. **Mem. New York Bot. Garden**, v. 70, 180 p., 1994.
- STERN, W.T. **Botanical latin. History, grammar, syntax, terminology and vocabulary**. New York: Hafner Publishing Company, 1992. 566p.
- STUPP, T; FREITAS, R.A. DE, SIERAKOWSKI, M.R.; DESCHAMPS, F. C.; WISNIEWSKI JR, A., BIAVATTI, M.W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorfii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**, v. 99, p.2659–2663, 2008.
- SVENDSEN, A.B.; VERPOORTE, R. **Cromatography of Alkaloids**. New York: Elsevier Scientific Publishing Company. 1983. 517 p.
- SYSTEMATICS ASSOCIATION COMMITTEE FOR DESCRIPTIVE TERMINOLOGY. Terminology of simple symmetrical plane shapes (chart 1). **Taxon**, v.9, p.104-109, 1962.
- VALDÉS, A.B.; MATOS, Á.B. Características epidérmico-foliares en táxones cubanos de la tribu Detarieae (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta Botanica Cubana**, v.93, p.1-6. 1992.
- VAN ROOSMALEN, M.G.M. VAN **Fruits of the Guianan Flora**. Neetherlands: Institute of Systematic Botany, Utrecht University, 1985. 483p.
- VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A. E. Structural aspects and trends in the evolution of recalcitrant seeds in dicotyledons. **Seed Science Research**, v.4, p.225-239, 1994.
- WERKER, E. **Seed Anatomy**. Stuttgart: Borntraeger, 1997. 424p.

TABELA 1. Dimensões (cm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) dos frutos de *Copaifera duckei*.

Variáveis	Máxima	Média	Mínima	Desvio Padrão	C.V. (%)
Comprimento	3,6	3,1	2,6	0,2	6,9
Largura	2,9	2,6	2,2	0,2	7,9
Espessura	2,0	1,7	1,6	0,1	6,0

TABELA 2. Dimensões (mm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) das sementes de *Copaifera duckei*.

Variáveis	Máxima	Média	Mínima	Desvio Padrão	C.V. (%)
Comprimento	20,0	16,0	13,4	1,4	8,7
Largura	18,7	12,8	10,0	1,2	9,6
Espessura	13,0	10,6	8,27	0,9	8,1

TABELA 3. Dimensões (cm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) dos frutos de *Copaifera martii*.

Variáveis	Máxima	Média	Mínima	Desvio Padrão	C.V. (%)
Comprimento	2,5	2,3	2,0	0,1	4,6
Largura	2,1	2,0	1,7	0,1	5,0
Espessura	1,4	1,2	0,7	0,1	11,5

TABELA 4. Dimensões (mm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) das sementes de *Copaifera martii*.

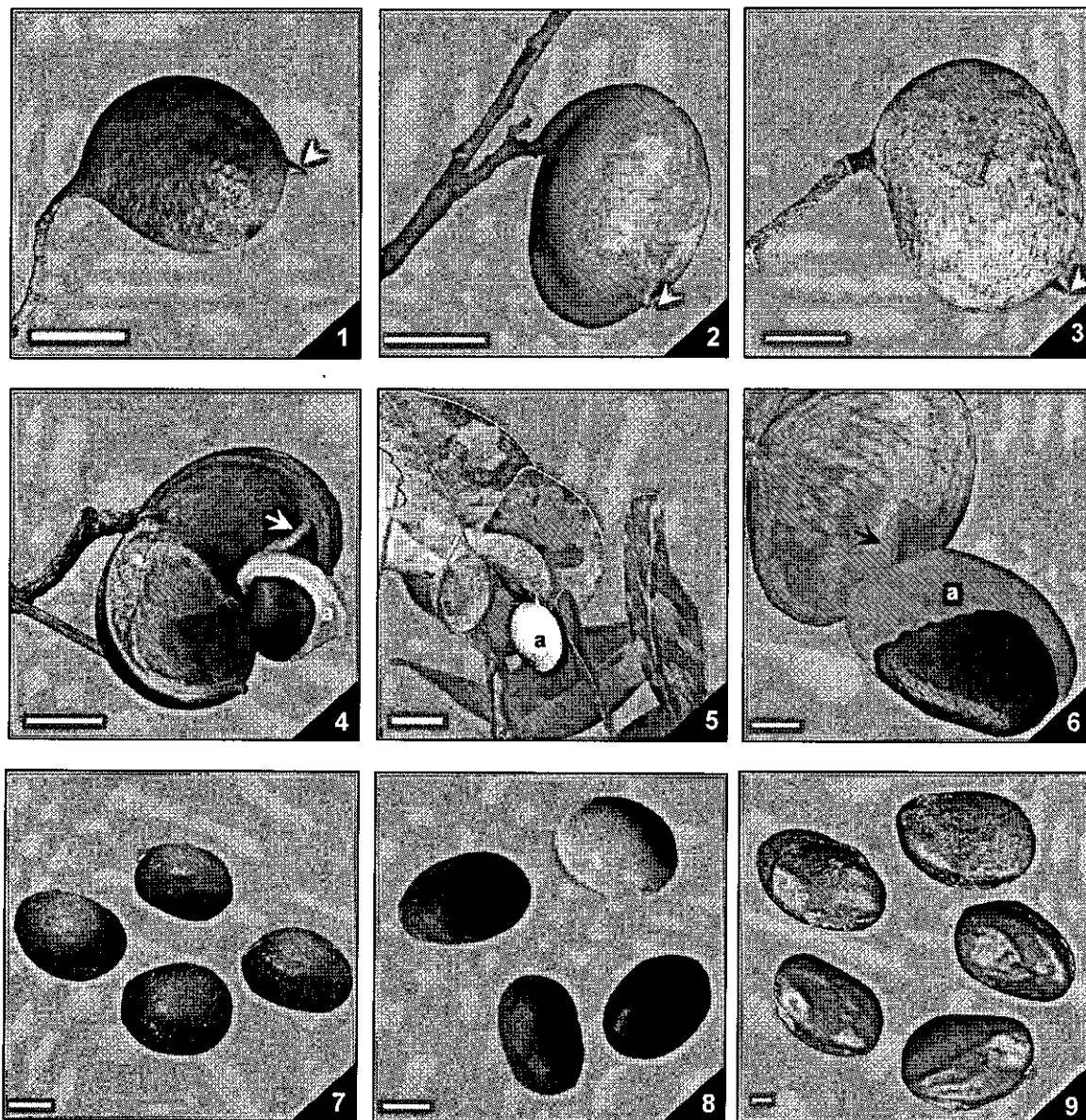
Variáveis	Máxima	Média	Mínima	Desvio Padrão	C.V. (%)
Comprimento	13,5	11,9	10,0	0,8	6,6
Largura	10,8	9,6	7,6	0,7	7,0
Espessura	8,3	7,4	6,4	0,5	6,5

TABELA 5. Dimensões (cm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) dos frutos de *Copaifera reticulata*.

Variáveis	Máxima	Média	Mínima	Desvio Padrão	C.V. (%)
Comprimento	3,3	23,0	2,5	0,2	6,6
Largura	2,8	2,3	2,0	0,2	7,6
Espessura	1,7	1,5	1,2	0,1	9,1

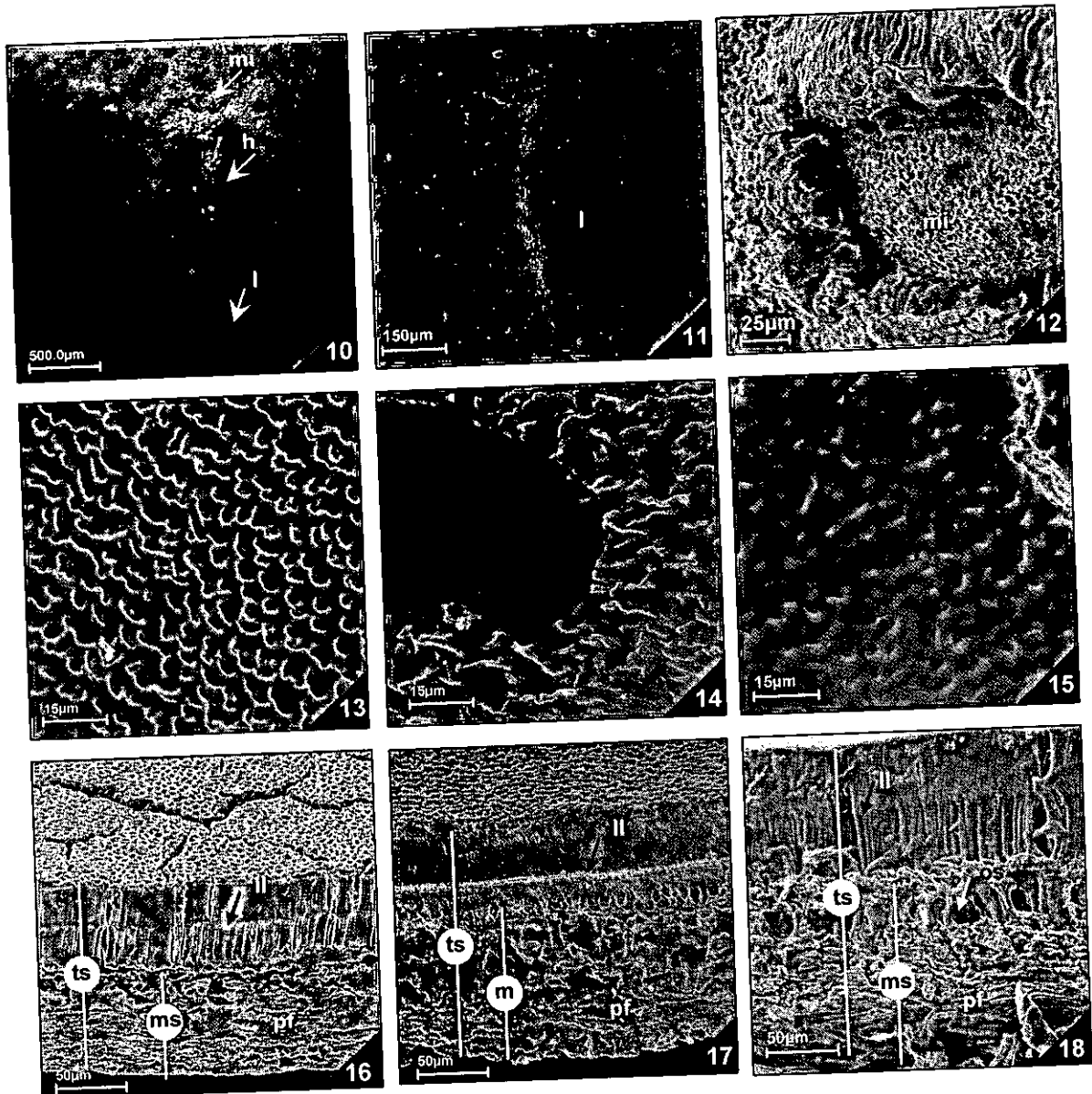
TABELA 6. Dimensões (mm), desvio padrão e coeficiente de variação (C.V.) das sementes de *Copaifera reticulata*.

Variáveis	Máxima	Média	Mínima	Desvio Padrão	C.V. (%)
Comprimento	23,1	17,1	14,4	1,7	10,1
Largura	15,5	11,6	10,2	1,4	9,8
Espessura	13,4	12,0	10,7	0,6	4,8



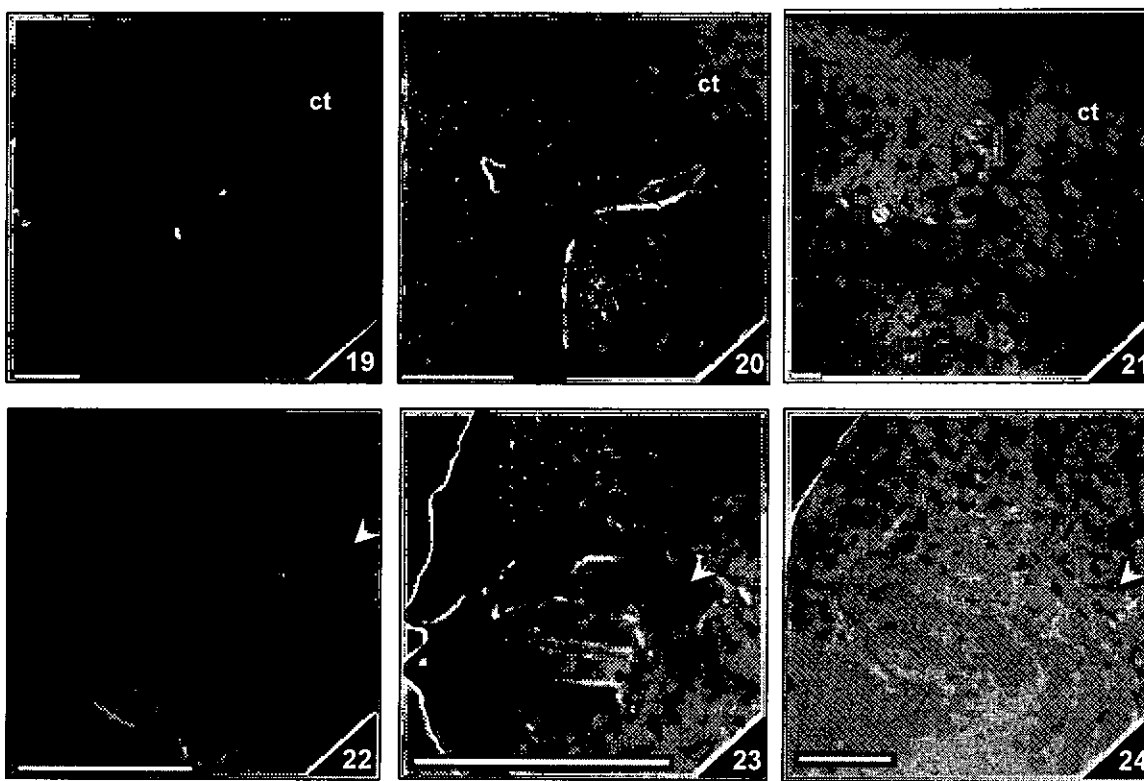
FIGURAS 1-9. Frutos e sementes de *Copaifera* L.. 1,4,7- *C. duckei*; 2,5,8- *C. martii*; 3,6,9- *C. reticulata*. 1-3- legumes maduros recém coletados; 4-6- sementes expostas; 7-9- sementes estenospérmicas.

Legenda: ar - arilo; ponta da seta - apículo; seta - funículo. Barras = 1 cm (1-6) , 5 mm (7-9).



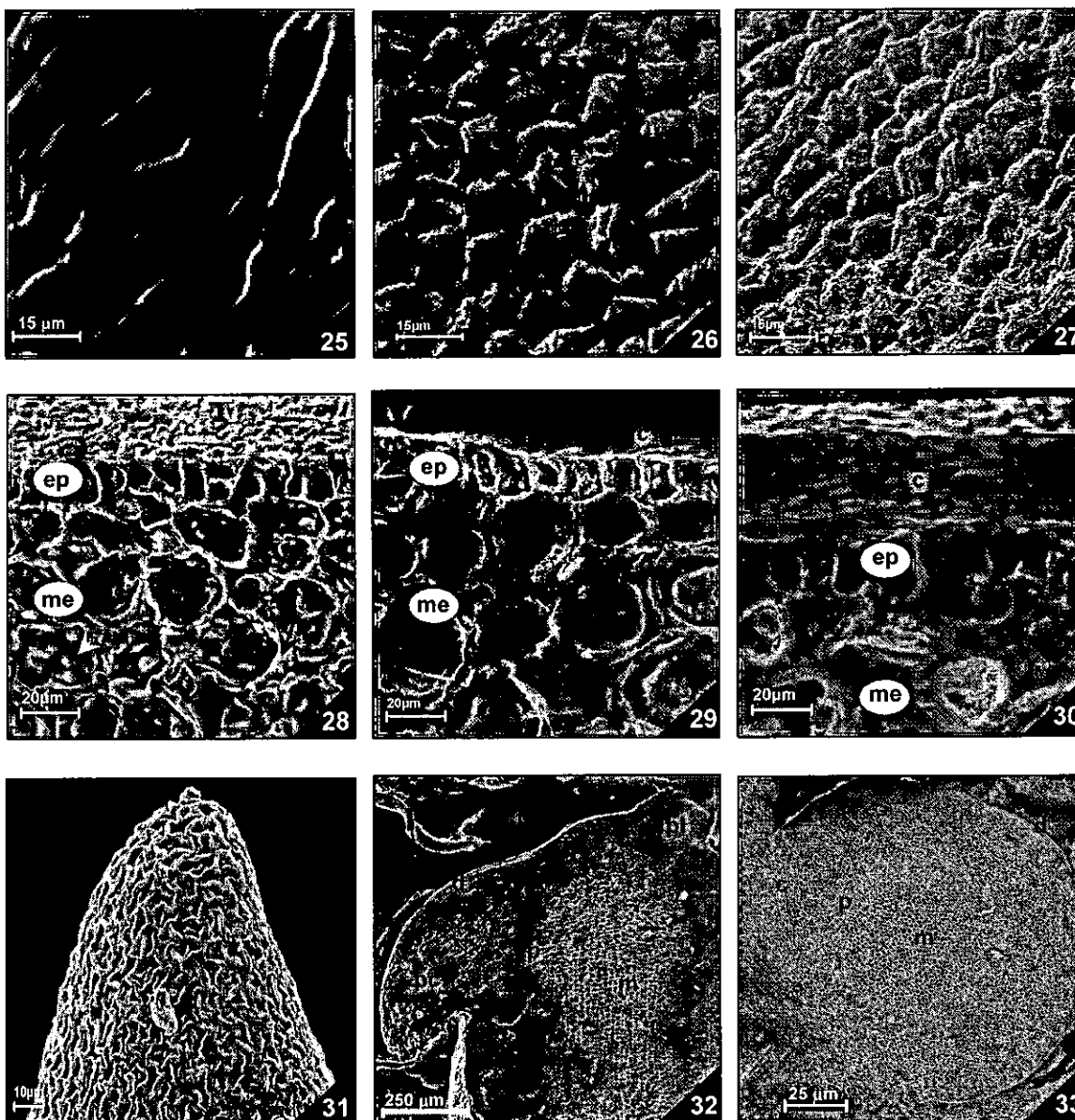
FIGURAS 10-18. Sementes de *Copaifera* L. em Microscopia Eletrônica de Varredura. (MEV). 10,13,16- *C. duckei*. 11,14,17- *C. martii*; 12, 15, 18- *C. reticulata*. 10- região hilar da semente; 11- lente; 12- micrópila; 13-15- tegumento, parede periclinal externa. 16-18- tegumento em secção transversal.

Legenda: h - hilo; l - lente; II - linha lúcida; mi - micrópila; ms - mesotesta; os - osteosclereideos; pf - parênquima fundamental; ts - testa.



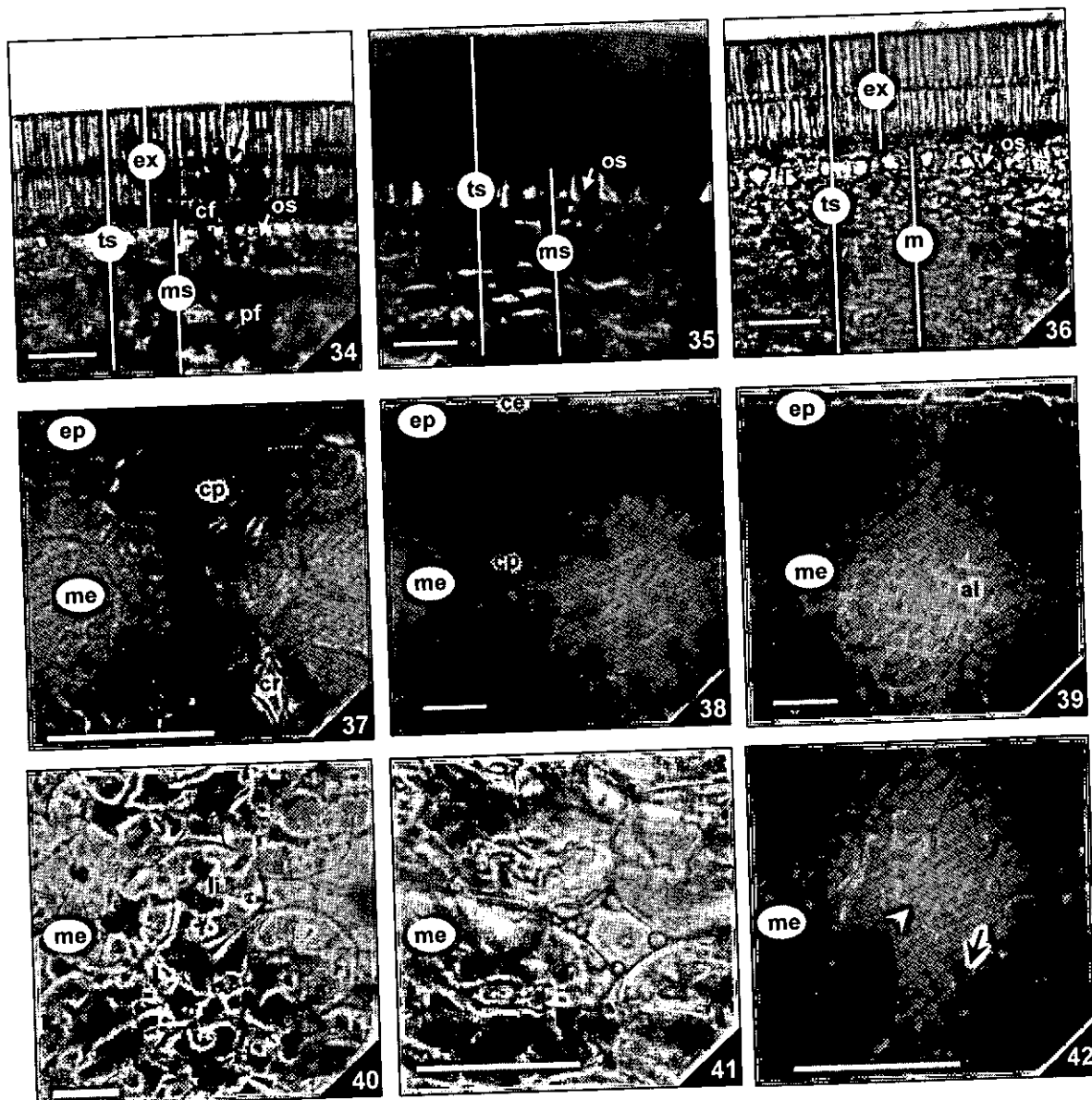
FIGURAS 19-24. Sementes de *Copaifera* L. 19,22- *C. duckei*; 20-23- *C. martii*; 21-24- *C. reticulata*. 19-21- cotilédones, região basal; 22-24- eixo embrionário em secção transversal.

Legenda: ct - cotilédone; ponta da seta - plúmula; seta - radícula. Barras = 1 mm



FIGURAS 25-33. Embrião das sementes de *Copaifera* L. em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). 25,28,32- *C. duckei*; 26,29,32- *C. martii*; 27,30,33- *C. reticulata*; 25-27- cotilédone, epiderme, parede periclinal externa; 28-30- cotilédone, epiderme e mesofilo em secção transversal; 31- plúmula, protoderme, parede periclinal externa; 32- eixo embrionário em secção longitudinal; 33- Idem, em secção transversal.

Legenda: c- meristema fundamental cortical; ce- cera; ct- cotilédone; d- protoderme; ep- epiderme; m- meristema fundamental medular; me- mesofilo; p- procâmbio; pc- pecíolo do cotilédone; pf- parênquima fundamental; pl- plúmula; seta- parede celular; ponta da seta- corpos protéicos.



FIGURAS 34-42. Ocorrência e distribuição de metabólitos nas sementes de *Copaifera* L. em seção transversal. 34,37,40- *C. duckei*; 35,38,42- *C. martii*; 36,39,41- *C. reticulata*; 35-36- tegumento; 37-42- cotilédones. 34- compostos fenólicos; 35, 37- polissacarídeos ácidos; 36, 42- pectina; 38- proteínas totais; 39- alcalóides; 40,41- lipídeos totais.

Legenda: al- alcalóides; ce- cera; cf- camada fenólica; cp- corpos protéicos; cr- cristais de oxalato de cálcio; ep- epiderme; ex- exotesta; li- lipídeos; ll- linha lúcida; me- mesofilo; ms- mesotesta; os- ostesclereídeos; pf- parênquima fundamental; ts- testa; ponta da seta- espessamento da parede celular; seta- pontuações. Barras = 50 µm.

ARTIGO II

**MORFOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL, DE
PLÂNTULAS E DAS PLANTAS JOVENS DE TRÊS ESPÉCIES DE
Copaifera L. (LEGUMINOSAE CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA
AMAZÔNIA**

Elaborado de acordo com as normas da Acta Botânica Brasílica – Anexo C

Morfologia de plântulas e plantas jovens de três espécies de *Copaifera* L.

MORFOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL, DE PLÂNTULAS E DAS PLANTAS JOVENS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE CAESALPINIOIDEAE) NATIVAS DA AMAZÔNIA¹

ELY SIMONE CAJUEIRO GURGEL^{1,4}, JOÃO UBIRATAN MOREIRA DOS SANTOS², MARIA SILVIA DE MENDONÇA³

Resumo – Caracteres morfológicos apresentados no desenvolvimento pós-seminal e em plântulas podem auxiliar no reconhecimento de espécies. Para o gênero *Copaifera* L., estes caracteres são potencialmente úteis na circunscrição dos táxons. Este estudo visou caracterizar os aspectos morfológicos de plântulas e plantas jovens, a morfoanatomia e a ocorrência e distribuição espacial de metabólitos nos limbos foliolares de *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke. Particularmente, objetivando contribuir com a distinção destas duas últimas, as mais semelhantes da Amazônia brasileira. Além das descrições morfológicas, foram fixadas secções dos limbos foliolares de eofilos e metafilos para a confecção de lâminas permanentes, semi-permanentes e cortes a mão livre, para a realização de testes histoquímicos. Os caracteres morfológicos descritos para as espécies estudadas constituem dados seguramente válidos para separar, principalmente, *C. martii* de *C. duckei* e de *C. reticulata*. A principal diferença encontrada entre as plantas jovens destas espécies foi a presença de estípulas foliáceas bem desenvolvidas em *C. reticulata*, ausentes em *C. duckei* e semelhantes a da plântula em *C. martii*, sendo também foliáceas, porém menos conspícuas. As plântulas de *C. martii* apresentam filotaxia alterna, enquanto que nas duas outras espécies é oposta. Nos limbos foliolares foram observados diversos metabólitos, como amido, substâncias lipofílicas e pecticas, idioblastos mucilaginosos, fenólicos e cristalíferos. Eofilos e metafilos são anatomicamente semelhantes nas três espécies. Todas as espécies apresentaram cavidades secretoras e glândulas.

Palavras-chave: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. reticulata* Ducke, eofilo, metafilo.

¹ Museu Paraense Emílio Goeldi, Cx. Postal 399. Av. Magalhães Barata, 376 - São Braz CEP: 66040-170 - Belém - PA - Brasil. Email: esgurgel@museu-goeldi.br

² Universidade Federal Rural da Amazônia - Belém - PA

³ Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM) - Manaus - AM

⁴ Autor para correspondência: esgurgel@museu-goeldi.br

Seedling and sapling morphology of three *Copaifera* L. species

Morphology of germination, seedlings and saplings of three Amazonian *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE CAESALPINIOIDEAE) species

Abstract – Morphological aspects of the development of seedlings and saplings can be useful to the identification of species. In *Copaifera* L., these traits can be valuable for the circumscription of taxa. This work aimed to characterize the morphological aspects of seedlings and saplings, as well as the leaf morphology and anatomy of *Copaifera martii* Hayne, *C. duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke. Also, we verified the occurrence and distribution of metabolites in the foliar limb of these species. One of the goals of this study was to contribute to the taxonomic distinction between *C. duckei* and *C. reticulata*, which are morphologically very similar. In addition to the morphological descriptions, we performed histochemical tests on permanent and semi-permanent slides, as well as on free-hand cuts, of foliar limbs, eophylls and metaphylls. The morphological traits described here represent valuable data to distinguish the taxa, especially to differentiate *C. martii* from *C. duckei* and from *C. reticulata*. The main difference observed among the saplings of the three species is the presence of well-developed, foliaceous stipules in *C. reticulata*, which are absent in *C. duckei* and are similar to those of the seedlings in *C. martii*, being also foliaceous but less conspicuous. *C. martii* presents alternate phyllotaxy, while the other species presents opposite phyllotaxy. We detected several metabolites in the foliar limb, such as starch, lipophilic and pectic substances, and mucilaginous, crystal and phenolic idioblasts. Eophylls and metaphylls are anatomically similar. The three species present secretory cavities and glands.

Keywords: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. reticulata* Ducke, eophyll, metaphyll.

Introdução

As investigações sobre a morfologia de plântulas, antes do surgimento dos metafílos, têm demonstrado um rico potencial para estudos da sistemática, inclusive testando a monofilia de gêneros de Leguminosae (Rodrigues, 2005). É uma tarefa acumulativa, e para se obter informações que permitam adicionar características típicas para as famílias e gêneros com valor diagnóstico, é necessário estudar previamente todo o processo de germinação de um grande número de espécies, para que os resultados sejam significativos. Levam a descoberta de estruturas transitórias, basais ou derivadas, que podem não ocorrer no indivíduo adulto, mas que podem estabelecer conexões filogenéticas (Gifford & Foster 1989; Ricardi, 1996).

Duke & Polhill (1981) realizaram uma ampla revisão sobre pântula, no que concerne a terminologia, ecologia e aplicação taxonômica. Ressaltaram que a morfologia de plântulas tem contribuído para identificação das plantas no campo e ainda para delimitações genéricas e infragenéricas na família, o que também foi verificado por diversos autores, dentre os quais pode-se citar Léonard (1957), Nozzolillo (1985), Vogel (1980), Lima (1990), Oliveira & Beltratti (1992); Nemoto & Ohashi (1993), Ricardi (1996), Lopez et al. (1998), Silva & Matos (1998), Oliveira (1999, 2001), Mendonça Filho (2002), Rodrigues (2005) e Rodrigues & Tozzi (2007).

O enfoque taxonômico para a morfologia de plântulas de espécies amazônicas começou com descrições feitas por Lee & Langenheim (1975) na revisão do gênero *Hymenaea* L., separaram os táxons em dois grupos, em função da morfologia das plântulas e ocupação de um determinado ambiente, concluíram que os grupos ecológicos quando correlacionados com outros caracteres são úteis para um melhor entendimento da história evolutiva do grupo.

Posteriormente, outras revisões para táxons amazônicos foram realizadas nas quais a morfologia de plântulas foi citada, como as de *Virola* Aubl. (Rodrigues, 1980), *Dimorphandra* Schott. (Silva, 1986) e da família Lecythidaceae, onde Mori & Prance (1990) descreveram e ilustraram plântulas de *Gustavia augusta* L., *Couratari stellata* A.C. Sm., *Bertholletia excelsa* Bonpl. e *Lecythis minor* Jacq..

Mais recentemente, Martins-da-Silva (2006), revisando os representantes do gênero *Copaifera* L da Amazônia brasileira, observou que, de acordo com a classificação de Miquel (1987), *Copaifera glycyarpa* Ducke, *C. duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. multijuga* Hayne, *C. pubiflora* Benth. e *C. reticulata* Ducke apresentam germinação fanerocotiledonar epígea, com cotilédones carnosos, registrou ainda que Léonard (1957), baseado apenas em *C. officinalis* L., informou que as *Copaifera* americanas apresentam apenas eófilos alternos.

O trabalho de Silva et al. (1988) assim como os de Albuquerque (1987, 1993) são referências para os estudos morfológicos de sementes e plântulas da Amazônia, o último autor citado descreveu e ilustrou detalhadamente 20 espécies florestais e 30 invasoras de culturas.

Encontram-se ainda diversos estudos que ampliam o conhecimento sobre a morfologia de plântulas de Leguminosae que ocorrem na Amazônia (Gurgel 2000; Ferreira et al., 2001; Melo, 2001, Gurgel et al, 2002; Melo et al., 2004; Melo & Varela, 2006; Camargo et al., 2008; Ramos & Ferraz, 2008) inclusive da espécie amazônica *Copaifera multijuga* Hayne (Alencar, 1981; Moreira & Moreira, 1996; Brum et al., 2007).

Rodrigues & Tozzi (2007), com o intuito de constatar a relevância e ampliar o conhecimento sobre a morfologia de plântulas de representantes arbóreos brasileiros do clado genistóide, descrevem, ilustram e comparam as estruturas presentes nas plântulas, verificaram que a filotaxia oposta dos eofilos de *Diploptropis martiusii* Benth. a distingue da espécie amazônica *Diploptropis purpurea* (Rich.) Amshoff.

A família Leguminosae conta com aproximadamente 19.325 espécies, distribuídas em 727 gêneros (Lewis et al. 2005); representa um dos principais e mais importante grupo de plantas superiores; trata-se da terceira maior família de angiospermas, destaca-se, ainda, na composição das florestas nativas brasileiras (Marchiori, 1997). Na região, a família conta com aproximadamente 3.100 taxa específicos e infra-específicos, distribuídos em 198 gêneros (Silva et al., 1989).

O gênero *Copaifera* L., pertencente à Caesalpinioideae (Dwyer, 1951) é representado na Amazônia brasileira por nove espécies (Martins-da-Silva, 2006).

Martins-da-Silva (2006) constatou que os caracteres apresentados no desenvolvimento pós-seminal e nas plântulas, podem auxiliar no reconhecimento das espécies nestas fases. Ressaltou a utilidade dos mesmos na circunscrição dos táxons infragenéricos e para esclarecer a filogenia do grupo, enfatizou ainda à importância de se dar continuidade aos estudos.

As espécies objeto deste estudo são *Copaifera duckei*, *C. martii* e *C. reticulata* encontradas no estado do Pará. *C. duckei* ocorre ainda no Maranhão; *C. martii* no Maranhão e Tocantins e *C. reticulata* no Amapá e Mato Grosso. São conhecidas popularmente por "copaíba", "copaibeira", "árvore milagrosa", "pau d'óleo" e outros (Ferreira, 1988; Cunha, 1999; Martins-da-Silva, et al., 2008).

Este estudo foi desenvolvido objetivando caracterizar os aspectos morfológicos do desenvolvimento pós-seminal, de plântulas e plantas jovens; ocorrência e distribuição espacial de metabólitos e a morfoanatomia dos limbos foliolares de eofilos e metafílos de *Copaifera*

martii Hayne, *C. duckei* Dwyer e *C. reticulata* Ducke, principalmente, visando corroborar com a distinção destas espécies.

Material e Métodos

Os frutos foram coletados diretamente das copas ou no chão, na área de projeção das copas sob as matrizes, de 3 a 5 indivíduos de cada espécie, em seguida transportados para o laboratório. Foram eliminados os frutos e sementes mal formados, com injúrias mecânicas e/ou predados.

As exsiccatas das plantas matrizes foram incorporadas aos acervos do Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará (MG) e da Embrapa Amazônia Oriental, Belém – Pará (IAN), sendo *Copaifera duckei* Dwyer: IAN 175.602, IAN 175.605 e IAN 180.659; *Copaifera martii* Hayne: IAN 176.276, IAN 176.278, IAN 179.134, IAN 179.135 e IAN 179.136; *Copaifera reticulata* Ducke: MG 186.090, IAN 176.207, IAN 178.950 e IAN 180.400.

Para a germinação de todos os espécimes, foram embebidas em água corrente por 72 horas (Melo, 2001), 100 sementes de cada espécie, em média 30 de cada espécime, utilizando-se como substrato, areia mais serragem (1:1) ambas esterilizadas, colocado em bandejas plásticas de 80 x 40 x 20 cm, dispostas sobre bancada de madeira de 1 x 1 x 5 m, localizadas em áreas cobertas com sombrite a 50% em casa de vegetação. A semeadura foi feita a 0,5 cm de profundidade.

A irrigação foi feita com auxílio de um regador, adicionando-se água em quantidade suficiente para manter apenas a umidade do substrato sem encharcá-lo.

Foi considerado desenvolvimento pós-seminal o período compreendido desde o entumescimento da semente até a liberação dos cotilédones, antes da total expansão do eofilo.

Para a descrição morfológica do processo germinativo foram consideradas apenas as unidades que apresentaram raiz primária, hipocótilo e cotilédones normais.

As avaliações, tomadas de medidas e aquisição de fotografias foram feitas diariamente, durante todo o período do desenvolvimento seminal até a formação das plantas jovens.

Esta fase foi acompanhada detalhadamente, foram verificados, através de estereomicroscópio binocular Zeiss, todos os caracteres morfológicos, potencialmente diferenciáveis e úteis na identificação das espécies.

Os mesmos recipientes e substratos da germinação foram utilizados para a obtenção das plântulas e plantas jovens, e então foram descritas as dez plântulas que se apresentaram mais vigorosas.

Considerou-se plântula quando os eofilos estavam totalmente formados (Duke & Polhill, 1981), e planta jovem quando do aparecimento do metafilo.

Os elementos vegetativos descritos e ilustrados foram os mesmos utilizados por Gurgel *et al.* (2002) e a terminologia está de acordo com Systematics Association Committee for Descriptive Terminology (1962), Font-Quer (1963), Duke (1965, 1969), Hickey (1979), Duke & Polhill (1981), Roderjan (1983), Stern (1992), Oliveira (1993, 1997, 2001).

As observações sobre a morfologia foram efetuadas visualmente quando possível e complementadas com o auxílio de estereomicroscópio binocular Zeiss Stemi SV6, para melhor identificação das estruturas e do indumento.

Para os estudos anatômicos, eofilos e metafilos foram seccionados transversalmente com auxílio de lâmina de barbear, posteriormente fixados em FAA 50% (Johansen 1940) por 24 horas e então conservados em álcool etílico a 50%, após desidratação em série etílica, o material foi incluído em hidróxi-etil-metacrilato (Leica) (Gerlach, 1969, *apud* Ruzin, 1999) e outras amostras passaram por bateria de acetato de butíla para inclusão em parafina histológica (Johansen, 1940), para então serem seccionadas em micrótomo com 8 μ m de espessura, as seções obtidas foram coradas com azul de toluidina 05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montadas em Bálsamo do Canadá e resina sintética, os cortes frescos foram corados com azul de Astra e safranina (Bukatsch, 1972 *apud* Krauss & Arduin, 1997).

Para os testes histoquímicos foram utilizadas secções transversais de amostras frescas, alguns dos cortes histológicos foram montados e fotografados simultaneamente sem submetê-los aos reagentes, visando constatar o aspecto natural das substâncias secretadas.

Algumas secções foram submetidas aos procedimentos controle, conforme as recomendações dos respectivos autores dos testes histoquímicos realizados. Utilizaram-se os procedimentos indicados na literatura especializada (Quadro 1).

Para a microscopia eletrônica de varredura algumas secções foram fixadas na solução de paraformaldeído (4%), glutaraldeído (2,5%) com cacodilato de sódio tri-hidratado (0,1 ml) e sacarose (1%) (Karnovsky, 1965 *apud* Ruzin, 1999), também por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, lavadas três vezes no mesmo tampão e também armazenadas em álcool etílico a 70% (Kraus & Arduin, 1997) e desidratadas em série alcoólica (Gahan, 1984), processadas em secador de ponto crítico usando o CO₂ como líquido de transição (Bozzola & Russel, 1991), foram fixados com grafite sobre suporte de alumínio e recobertos com carbono e ouro. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico LEO modelo 1450 VP.

Para dissociação das epidermes, eofilos e metafilos foram submetidos à solução de Jeffrey a 10% por 24 horas (Johansen, 1940). Após a separação das epidermes adaxial e

abaxial, as mesmas foram lavadas em água destilada, retirando o excesso de mesófilo com auxílio de pincéis, posteriormente coradas com azul de astra e fucsina básica (Krauss & Arduin, 1997), desidratada em série etanólica (Johansen, 1940) e série aceto-butílica (Krauss & Arduin, 1997) crescentes e, em seguida montadas entre lâmina e lamínula em bálsamo-do-canadá.

Para análise a cada 50 de variação dos perfílos e motófilos de cada espécie estudada

avermelhada na base (Fig. 1C, 2C, 3C). Nesta fase também os cotilédones começam a liberar-se do tegumento, surgindo assim os eófilos esverdeados em *C. martii* (Fig. 2D) e avermelhados em *C. duckei* (Fig. 1D) e em *C. reticulata* (Fig. 3D).

O hipocótilo, quando reto, continua cilíndrico e glabro em *C. duckei* e em *C. reticulata*, cuja região basal é esbranquiçada e a apical avermelhada. Em *C. martii* o hipocótilo é glabrescente, com região basal branco-esverdeada e apical avermelhada.

O hipocótilo apresenta bons caracteres diagnósticos na delimitação de gêneros e para a identificação ao nível de espécie, ressaltando-se a conformação geral, indumento e cor, presença de sulcos, tricômas, catáfilos e lenticelas (Oliveira, 1993).

Os cotilédones das três espécies são ligeiramente oblongos, côncavos, carnosos, em um só plano, com lâminas paralelas e faces superiores em contato, opostos quando totalmente abertos. Os de *C. martii*, inicialmente rosados, quando totalmente isentos dos restos do tegumento apresentam-se sésseis, amarelo-esverdeados (Fig. 2C), com regiões avermelhadas, margem inteira e pubescente, ápice arredondado e base auriculada. Os de *C. duckei* (Fig. 1C) e *C. reticulata* (Fig. 3C) são semelhantes aos descritos para *C. martii*, porém com a margem glabra, base decorrente, subsésseis, já que o pulvino é reduzido, semelhante a uma extensão do cotilédone envolvendo parte do eixo caulinar. Os cotilédones caem assim que os eófilos tornam-se verdes

Durante o processo germinativo observa-se que a região do coleto é glabrescente, ferruginea próxima a raiz e castanho-clara próxima ao hipocótilo (Fig. 1B, 2B, 3B). As raízes laterais são bem visíveis, curtas e pouco ramificadas.

Em todas as três espécies a prefolheação é mutuamente equitante. Inicialmente os folíolos são esverdeados em *C. martii* (Fig. 2D) e avermelhados em *C. duckei* (Fig. 1D) e *C. reticulata* (Fig. 3D), porém após a total expansão adquirem a coloração verde. São discolores uma vez que a face adaxial é mais escura que abaxial.

Plântula – Os eófilos em *C. duckei* apresentam dois a três pares de folíolos (Fig. 4), em *C. reticulata* dois a quatro pares, em abasa as espécies são opostos e coriáceos (Fig. 6).

Os folíolos de *C. duckei* (Fig. 7) e *C. reticulata* (Fig. 9) são opostos ou sub-opostos, oblongo-ovados ou elípticos, subfalcados, podem-se apresentar tanto simétricos como assimétricos, base breve angusta, em geral assimétrica e raramente cuneada, ápice agudo, podendo apresentar apículo.

Martins-da-Silva (2006) revisando o gênero *Copaifera* L. observou que *C. duckei* é afim de *C. reticulata*, e que o número de pares de folíolos é um dos caracteres mais seguros na

separação desses dois táxons, pois *C. duckei* apresenta três a quatro pares e *C. reticulata* quatro a seis, ressaltou que nas amostras por ela analisadas, não foram encontradas as combinações de 3-5 ou 3-6 ou até mesmo 3-4-5 pares de folíolos. Este caráter, na fase de plântula não é seguro, uma vez que na maioria das plântulas formadas, em ambas as espécies, foram observados dois pares de jugas com a mesma frequência nas duas espécies.

C. martii apresenta apenas um eófilo, também paripinado, com dois pares de folíolos opostos (Fig. 5), coriáceos, cujos folíolos distais medem 5,0–4,1 x 2,0–3,1 cm e os proximais 1,9–2,9 x 0,8–1,1 cm, são ovados, as vezes elípticos ou rotundos, ápice retuso ou agudo, base assimétrica (Fig. 8).

As células epidérmicas dos folíolos são irregulares, isodiamétricas, heterodimensionais, com parede periclinal irregular e parede anticlinal sinuosa (Fig. 28, 29, 30). Metcalfe (1979) considera que a sinuosidade é muito mais acentuada na face abaxial que na adaxial, porém as espécies objeto deste estudo não apresentaram este perfil.

Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) enfatizaram que, provavelmente, ao desenvolver sinuosidades há um aumento na superfície de contato entre células, ampliando a resistência do sistema dérmico e sua eficiência na transferência de substâncias célula a célula.

O caráter sinuosidade das paredes anticlinais epidérmicas associado a outros dados constituíram valor para a identificação de espécies do gênero *Bauhinia* (Kotresha & Seetharam, 1995).

Moraes & Paoli (1999) constaram que o uso do caráter sinuosidade de paredes anticlinais de células epidérmicas, para fins taxonômicos não é seguro, devido a grande variação que ocorre em nomofilos de uma mesma espécie.

Em geral, ceras e substâncias lipofílicas constituem a epicutícula, um polímero complexo, heterogêneo, resultante da interação entre o oxigênio e cadeias longas de ácidos graxos, alcoóis alifáticos e alcanos, é considerada uma ornamentação terciária (Barthlott, 1981; Alquini *et al.*, 2006).

Na caracterização histoquímica dos limbos eofilares das espécies estudadas (Tab. 2), observa-se a presença de compostos lipofílicos recobrimdo toda a epiderme eofilar (Fig. 48). Apenas *C. martii* apresenta cera epicuticular ornamentada, do tipo estrelada (Fig. 38).

Tanto eófilos quanto metafilos, das espécies aqui investigadas, são hipostomáticos, com estômatos paracíticos (Fig. 29), o mais comum na subfamília Caesalpinioideae (Solereeder, 1908, Metcalfe & Chalk, 1950 e Watson, 1981). Estes estômatos encontram-se no mesmo nível das células epidérmicas e estão regularmente distribuídos na lâmina foliar.

Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) observaram o mesmo nos folíolos de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Hymenaea stilbocarpa* Hayne (tribo Detarieae), ressaltaram que o tipo anomocítico e hipoestomático é o mais freqüente nas epidermes dos limbos cotiledonares e epifilares das espécies de Caesalpinioideae por elas estudadas.

Caesalpinioideae são, geralmente, dorsiventrais, exceto em certas espécies dos gêneros *Hoffmanseggia* Harms e *Hymenaea* L, constataram ainda que os estômatos apresentem uma combinação de células subsidiárias muito variável conforme a espécie.

A estrutura do mesofilo e espessura do limbo podem estar relacionadas, com a freqüência e ocorrência dos estômatos na folha (Moreira-Coneglian & Oliveira, 2006). Há correlação entre folhas hipoestomáticas e delgadas com mesofilo dorsiventral, enquanto que as anfiestomáticas tendem a ser mais espessas e isobilaterais (Wilkinson, 1979).

Nos folíolos, em secção transversal, foi observado epiderme unisseriada e mesofilo dorsiventral com parênquima paliçádico, formado por apenas um estrato de células alongadas e justapostas (Fig. 46), cujo teste histoquímico revelou a presença de amido (Fig. 47) (Tab. 2). Seguido de parênquima lacunoso, também amiláceo, com cerca de quatro camadas de células com forma e distribuição irregulares e, muitos espaços intercelulares.

A nervura central é imersa na face adaxial (Fig. 39) e proeminente na abaxial (Fig. 43). As células epidérmicas são estreitas, variam de quadradas a retangulares, estando estas últimas, dispostas no sentido do comprimento do limbo foliolar, as paredes são retas onde ocorrem raros estômatos. Em *C. duckei* e *C. reticulata* a face adaxial é pubescente (Fig. 39) e a

uma característica comum na maioria das Leguminosae, principalmente quando localizados próximos ao sistema vascular (Zindler-Frank, 1987). Como em outras famílias a localização e o tipo de cristais são característicos de certos táxons (Francheschi & Horner, 1980).

Moreira-Coneglian & Oliveira, (2006) comparando a anatomia dos eofilos com a dos metafílos (Morretes, 1966) de *C. langsdorffii*, registraram que as principais variações são feixe colateral, tricômas na face adaxial da epiderme e ausência de cristais nos eofilos, diferentemente, nos metafílos, constataram ausência de tricômas, de feixe anficrival e de cristais de oxalato de cálcio.

Os resultados aqui obtidos diferem do de Morretes (1966), já que o feixe vascular do metafílo de *C. duckei*, *C. martii* e *C. reticulata* é colateral (Fig. 51), e há fina pubescência na nervura central (Fig. 39) e nos bordos.

A nervação é predominantemente broquidódroma (Fig. 31, 32, 33), pois as nervuras secundárias unem-se as terciárias e formam arcos próximo a nervura marginal (Fig. 36), isto é, cerca de $\frac{3}{4}$ de distância da nervura principal. As aréolas tem forma e arranjo irregulares (Fig. 34). As terminações, das nervuras terciárias, em geral são curvadas e ramificadas.

A nervura marginal é inteira, conspícua na face abaxial, glabrescente em *C. duckei* e em *C. reticulata*. Em *C. martii* é revoluta, pubescente na face adaxial e glabrescente na abaxial (Fig. 44).

Na região basal da nervura marginal, observam-se, em todas as espécies, duas glândulas assimetricamente dispostas (Fig. 34, 35).

Segundo Fahn (1979) é comum a ocorrência de cavidades e canais secretores abaixo da epiderme. São espaços intercelulares relativamente largos, denominados de lumen ou lacuna, circundados por um epitélio de células secretoras. O lúmen pode ter várias formas, quando mais ou menos esférico é denominado cavidade secretora, e quando alongado é denominado canal secretor. As células podem secretar somente terpenos, ou terpenos com carboidratos ou outras substâncias.

Todas as espécies, objeto deste estudo, apresentaram cavidades secretoras no limbo, na região mediana do mesofilo sempre próximo as nervuras (Fig. 56) e próximo ao feixe vascular da nervura marginal (Fig. 34, 55). Ocorrem ainda na nervura central (Fig. 59), na raque (Fig. 60), no pulvinulo (Fig. 62,63), no pecíolo e no pulvino. Um número variável de estratos celulares constituem o epitélio das cavidades secretoras (Fig. 29, 58), as quais formam um lúmen esférico.

Segundo Lersten & Curtis (1994, 1996), nas Caesalpinioideae, as variações morfológicas e distribuição das estruturas secretoras possuem valor taxonômico. Neste trabalho não foi possível separar as espécies com base nesta característica.

Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) evidenciaram a presença de substâncias lipídicas no interior das cavidades secretoras de *Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea stilbocarpa* Hayne. Para as espécies aqui investigadas não foi observada reação positiva para lipídeos.

Idioblastos fenólicos foram observados na região das fibras e em células do floema (Fig. 54). Fahn (1990) reporta a ocorrência dos mesmos nas Leguminosae.

Moreira-Coneglian & Oliveira (2006) verificaram a presença de idioblastos fenólicos em *Senna multijuga* (Rich.) Irwin & Barn., *Hymenaea stilbocarpa*, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Pterogyne nitens* Tul., e em *Bauhinia forficata* Link chamou a atenção para a preponderância de idioblastos fenólicos no feixe vascular, especialmente no floema. Ressaltou que nas demais espécies estudadas, existem idioblastos fenólicos dispersos e em pequena quantidade.

É muito comum os compostos fenólicos apresentarem atividade antimicrobiana, com propriedades que protegem as plantas primariamente contra fungos e bactérias, sendo também importantes contra herbívoros (Swain 1979).

Foi verificado o crescimento de hifas sobre cutícula de todas as espécies aqui estudadas (Fig. 41), no entanto não foi detectado crescimento micelial endógeno nas mesmas.

A raque, em todas as espécies aqui estudadas, é longa e delgada, cilíndrica esverde-esbranquiçada. Pubescente em *C. duckei* reta, com estipela apical também pubescente. O estrato epidérmico apresenta uma camada de células com formato irregular, recobertas por cera.

Os pulvínulos são cilíndricos e pubescentes (Fig. 45), verde avermelhados em *C. duckei* (Fig. 10) e verde-amarelados em *C. reticulata* (Fig. 11), e *C. martii* (Fig. 12).

A epiderme no pulvínulo é semelhante a da raque, abaixo da qual observam-se várias camadas adicionais de parênquima, caracterizando, desta forma, o pulvínulo (Fig. 60).

O pecíolo é levemente canaliculado esverdeado, glabrescente e curto tanto em *C. duckei*, quanto em *C. reticulata* e em *C. martii*, deve-se ressaltar que, nesta última espécie, apresenta longas suturas verde-avermelhadas.

O pulvino das espécies examinadas é cilíndrico, em *C. reticulata* (Fig. 15) é pubescente, enquanto as de *C. duckei* (Fig. 13) e *C. Martii* (Fig. 14) são glabrescentes. Na base do pulvino, protegendo a gema apical, ocorrem duas estipulas interpeciolares ensiformes e lanceoladas, inicialmente avermelhadas e, posteriormente a base torna-se verde e o ápice amarelado

Epicótilo cilíndrico, reto, verde amarelado em toda a sua extensão. Glabro em *C. duckei*, glabrescente e densamente lenticelado em *C. Martii* e, pubescente em *C. reticulata*.

Em todas as espécies o hipocótilo é cilíndrico, delgado, longo, líneo, esverdeado, porém torna-se ferrugíneo. O hipocótilo de *C. reticulata* e *C. duckei* apresenta lenticelas bem visíveis, estrias na base, e pubescência na região apical. O de *C. Martii* apresenta base estriada e pubescente.

Coleto não evidente em *C. reticulata* e em *C. duckei*, porém em *C. martii* há uma cicatriz, circundando toda a região.

Os tricômas presentes no eixo vegetativo aéreo são tectores, simples (unicelulares), hialinos, adpressos ou retos, curtos e longos, impregnados por cera em sua superfície, no mesmo nível da epiderme cujas células arranjam-se radialmente (Fig. 28, 30,42).

Raiz principal axial, cilíndrica, levemente sinuosa, herbácea, crassa, glabra, espessa na base, afilada no ápice, com raízes laterais formando um conjunto irregular castanho-claro, raízes laterais pouco ramificadas, glabras, irregularmente distribuídas, nódulos ausentes.

Planta jovem – Em *C. duckei* (Fig. 16) e em *C. reticulata* (Fig. 18) após o nó eofilar, na planta jovem, a filotaxia passa a ser alterna, *C. martii* (Fig. 17) já apresenta este tipo de filotaxia desde a fase de plântulas

Os metafílos (Fig. 19, 0,21) são semelhantes aos eofilos descritos anteriormente. Na base dos eofilos, tanto a estipela apical da raque quanto as estipulas interpeciolares tornam-se caducas.

A diferença mais marcante encontrada nesta fase é a presença de estipulas foliáceas conspícuas em *C. reticulata* (Fig. 27), ausentes em *C. duckei* (Fig. 25) e semelhantes as do eofilo em *C. martii* (Fig. 26).

Raque, pulvínulos (Fig. 22,23,24), pecíolo e pulvinos apresentam pilosidade dispersa, isto é, tornam-se glabrescente. Na planta jovem não há espessamento do caule, somente o hipocótilo. A raiz principal torna-se mais alongada, porém com poucas raízes laterais não ramificadas e não são observados nódulos radiculares.

O conhecimento morfológico do limbo, margem, ápice e posição dos eofilos; presença ou ausência de látex ou resina, relação comprimento/largura dos cotilédones, tamanho e número de pinas, pecíolo alado ou não, presença ou não de indumento (tricomas e/ou glândulas), permitem caracterizar famílias, gêneros e até mesmo espécies, algumas destas características citadas por Duke (1965) são efetivamente úteis para separar *C. martii* das demais espécies alvo deste trabalho.

Os caracteres morfológicos descritos para as espécies estudadas constituem dados seguramente válidos para separar, principalmente, *Copaifera martii* de *C. duckei* e *C. reticulata*.

Percebeu-se que são escassas as diferenças morfológicas entre *C. duckei* e *C. reticulata*, cabendo, aqui destacar, a mais marcante, ou seja, estípulas foliáceas conspícuas, visíveis a vista desarmada, na fase de plantas jovem em *C. reticulata*.

Características reconhecidamente úteis na separação de espécies, como as do hipocótilo e ornamentação cuticular, não separam *C. duckei* de *C. reticulata*.

Cabe ressaltar ainda o número de folíolos, um dos caracteres mais seguros para separar *C. duckei* de *C. reticulata* na fase adulta. Na maioria das plântulas e plantas jovens foram observados dois pares de jugas com a mesma freqüência, em ambas as espécies.

Anatomicamente constatou-se que a sinuosidade das paredes anticlinais da epiderme é igual em ambas as faces, característica incomum nas leguminosas, porém apresentam folíolos dorsiventrais e aparelho estomático do tipo paracítico, comuns em Caesalpinioideae.

Nos limbos foliolares foram observados diversos metabólitos, como amido, substâncias lipofílicas e pécticas, idioblastos mucilaginosos, fenólicos e cristalíferos, estes últimos localizados ao longo dos feixes vasculares. Mesmo com a presença de compostos fenólicos, foi verificado o crescimento de hifas sobre cutícula de todas as espécies aqui estudadas, no entanto não foi detectado crescimento micelial endógeno nas mesmas.

Importante salientar que foram observadas características anatômicas semelhantes para eofilos e metafílos

Todas as espécies apresentaram cavidades secretoras e glândulas, nas mesmas regiões e em quantidade variável. As variações morfológicas destas estruturas não possibilitaram separar as espécies, bem como não foram observadas substâncias lipídicas no interior das mesmas.

Referências bibliográficas

- Albuquerque, J. M. 1987. **Estudo morfológico da semente e sua germinação até a fase de plântula, principalmente de plantas invasoras de culturas e de essências florestais da Amazônia.** Dissertação de mestrado. Manaus. Universidade Federal do Amazonas e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Albuquerque, J. M. 1993. **Identificação e germinação de sementes amazônicas.** FCAP. Serviço de Documentação e Informação.
- Alencar, J. da C. 1981. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* na Amazônia Central. 1 - Germinação. *Acta Amazonica* 11(1):3-11.

- Dwyer, J. D. 1951. The Central American, West Indian and South American Species of *Copaifera* (Caesalpinioideae). *Brittonia* 7(3):143-172.
- Fahn, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. London. Academic Press.
- Fahn, A. 1990. **Plant anatomy**. 4th ed. Pergamon Press, Oxford.
- Ferreira, A. B. de H. 1988. Novo dicionário da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Nova fronteira.
- Ferreira, R. A.; Botelho, S. A.; Davide, A. C. & Malavasi, M. de M. 2001. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista brasileira de Botânica* 24(3):303-309.
- Font-Quer, P. 1963. **Dicionário de botânica**. Barcelona: Labor.
- Francheschi, V. R. & Honer, H. T. 1980. Calcium oxalate crystal in plants. *Botanical Review* 46:361-427.
- Gahan, P. B. 1984. **Plant histochemistry and citochemistry**. London: Academic Press.
- Gerlach, D. 1969. **Botanische mikrotechnik**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Gifford, E. M. & Foster, A. S. 1989. **Morphology and evolution of vascular plants**. 3rd ed. New York W.H. Freeman.
- Gurgel, E. S. C. 2000. **Morfologia de frutos, sementes, germinação e plântulas de leguminosas presentes em uma vegetação de mata secundária na Amazônia Central**. Dissertação de Mestrado. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade do Amazonas.
- Gurgel, E. S. C; Silva, M. F. da & Carreira, L. M. M. 2002. Morfologia do fruto, da semente e da plântula de *Calopogonium mucunoides* Desv. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Leguminosae, Papilionoideae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica*, 18(1):37-60.
- Hickey, L. J. 1979. A revised classification of the architecture of dicotyledonous. Pp 25-39. In: C.R. Metcalfe & L. Chalk (eds.). **Anatomy of dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem**. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press.
- Jensen, W. A. 1962. **Botanical histochemistry: principle and practice**. San Francisco. W.H. Freeman.
- Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. New York. McGraw-Hill Book.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in eletron microscopy. *Journal of Cellular Biology* 27:137-138.
- Kotresha, K. & Seetharam, Y.N. 1995. Epidermal studies in some species of *Bauhinia* L. (Caesalpinioideae). *Phytomorphology* 45:127-137.

- Kraus, J. E. & Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em Morfologia Vegetal**. Edur, Seropédica.
- Lee, Y. & Langenheim, J. H. 1975. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany** 69:109 p.
- Léonard, J. 1957. Genera des Cynometreae et des Amherstieae africaines (Leguminosae - caesalpinioideae). Essai de Blatogénie appliquée à la systematique. **Memoires Class. Sc. Academie Royale Belgique serie 2**, 30(2):312.
- Lersten, N. R. & Curtis, J. D. 1994. Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. **Plant Systematics and Evolution** 192:231-255.
- Lersten, N. R. & Curtis, J. D. 1996. Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe Caesalpinieae (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution** 200:21-39.
- Lewis G. P.; Mackinder, B. & Lock, M. 2005. **Legume of the world.**, England, Kew, Richmond. Royal Botanic Garden.
- Lima, H. C. 1990. Tribo Dalbergieae (Leguminosae Papilionoideae): morfologia dos frutos, sementes e plântulas e sua aplicação na sistemática. **Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** 30:1-42.
- López, J.; Devesa, J. A.; Ruiz, T. & Ortega-Olivencia, A. 1998. Seedling morphology in Genisteae (Fabaceae) from south-west Spain. **Botanical Journal of the Linnean Society** 127: 229-250.
- Marchiori, J. N. C. 1997. **Dendrologia das angiospermas leguminosas**. Santa Maria – RS. Ed. UFSM.
- Martins-da-Silva, R. C. V. 2006. **Taxonomia das espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae Caesalpinioideae) ocorrentes na Amazônia brasileira**. Tese de doutorado. Museu Nacional / Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. 258p.
- Martins-da-Silva, R. C. V.; Pereira, J. F. & Lima, H. C. de. 2008. O gênero *Copaifera* (Leguminosae – Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia** 59(3): 455-476.
- McCully, M. E. 1970. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences** 175:702-711.
- Melo, M. da G. G. 2001. **Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de cinco espécies arbóreas utilizadas em Sistemas Agroflorestais na Amazônia**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

- Melo, M. da G. G. de; Mendonça, M. S. de & Mendes, A. M. S. 2004. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazonica** 34(1):9-14.
- Melo, M. de F. F. & Varela, V. P. 2006. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de duas espécies florestais da Amazônia. I. *Dinizia excelsa* Ducke (Angelim pedra). II *Cedrelinga catenaeformis* Ducke (cedrorana) - Leguminosae: Mimosoideae. **Revista Brasileira de Sementes** 28(1):54-62.
- Mendonça Filho, C. V. 2002. **Citotaxonomia de *Machaerium* Pers. e revisão taxonômica de *Machaerium* sect. *Oblonga* (Benth.) Taub. (Leguminosae-Papilionoideae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Metcalfe, C. R. 1979. The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. Pp 63-75. In: C.R. Metcalfe & L. Chalk (eds.). **Anatomy of dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem**. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press.
- Metcalfe, C. R. & Chalk L. 1950. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. Vol. I. Oxford: Clarendon Press.
- Miquel, S. 1987. Morphologie fonctionnelle de plantules d'especies forestières Du Gabon. **Bulletin Muséum National d'Histoire Naturelle, serie 4, Section B, Adansônia Botanique Phytochimie** 9:101-121.
- Moraes, P. L. R. & Paoli, A. A. S. 1999. Epiderme e padrão de venação foliar de espécies de Lauraceae. **Acta Botanica Brasilica** 13(1):87-97.
- Moreira-Coneglian, I. R. & Oliveira, D. M. T. 2006. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). **Revista brasileira de Botânica** 29(2):193-207.
- Moreira, F. M. S. & Moreira, F. W. 1996. Características da germinação de sementes de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. **Acta Amazônica** 26(1-2):3-16.
- Mori, S. A. & Prance, G. T. 1990. Lecythidaceae - Part II: the zygomorphic-flowered New World Genera (*Couroupita*, *Corythophora*, *Bertholletia*, *Couratari*, *Eschweilera*, & *Lecythis*). With a study of the secondary xylem of Neotropical Lecythidaceae by Carl de Zeeuw. **Flora Neotropica** 21:1-376.
- Morretes, B. L. 1966. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado II. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**. 305:209-244.

- Nemoto, T. & Ohashi, H. 1993. Seedling morphology of *Lespedeza* (Leguminosae). **Journal of Plant Research**. 106: 121-128.
- Nozzolillo, C. 1985. Seedling morphology and anatomy of eight *Cicer* species and their taxonomic value. **Canadian Journal of Botany** 63: 1-6
- O'Brien, T. P.; Feder, N. & McCully, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59:368-373.
- Oliveira, D. M. T. 1997. **Análise morfológica comparativa de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Fabaceae ocorrentes no Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista. 212p.
- Oliveira, D. M. T. 1999. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Leguminosae. **Acta Botanica Brasílica** 13(3):263-269.
- Oliveira, D. M. T. 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas

Revista brasileira de Botânica 24(1):85-97.

- Oliveira, D. M. T. & Beltrati, C.M. 1992. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga fagifolia* e *I. urugüensis*. **Turrialba** 42(3):306-313.
- Oliveira, E. C. 1993. Morfologia de plântulas florestais. pp.175-214. In Aguiar, I.B.; Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliola, M.B. (Eds.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES.
- Ramos, M. B. P. & Ferraz, I. D. K. 2008. Estudos morfológicos de frutos, sementes e plântulas

- Ruzin, S. E. 1999. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press.
- Scatena, V. L. & Scremin-Dias, E. 2006. Parênquima, colênquima e esclerênquima. Pp. 109-119. In: B. Appezzato-da-Glória & S.M. Carmello-Guerreiro, (eds.). **Anatomia vegetal**, 2ª ed., Viçosa, Editora da Universidade Federal de Viçosa.
- Silva, L. M. de M. & Matos, V. P. 1998. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. – Caesalpinaceae) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. – Rhamnanaceae). **Revista Brasileira de Sementes** 20(2):.25-31.
- Silva, M. F. 1986. *Dimorphandra* (Caesalpinaceae). **Flora Neotropica**. New York: New York Botanical Garden. 44:126.
- Silva, M. F.; Goldman, G.H.; Magalhães, F.M. & Moreira, F.W. 1988. Germinação natural de 10 espécies arbóreas da Amazônia - I. **Acta Amazonica** 18:9-26.
- Silva, M.F.; Carreira, L. M. M.; Tavares, A. S.; Ribeiro, I. C.; Jardim, M. A. G.; Lobo, M. G. A. & Oliveira, J. O. 1989. As Leguminosas da Amazônia Brasileira, lista prévia. **Acta Botanica Brasilica** 2(1):193-237.
- Solereeder, H. 1908. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. II. Oxford: Clarendon Press.
- Stern, W. T. 1992. **Botanical latin. History, grammar, syntax, terminology and vocabulary**. New York: Hafner Publishing Company.
- Swadlow, A.P.; Vennart, R. 1983. **Chromatography of Alkaloids**. New York: Elsevier

- Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface (mainly Leaf). Pp. 97-165. In: C.R. Metcalfe & L. Chalk (eds.). **Anatomy of dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem**. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press.
- Zindler-Frank, E. 1987. Calcium crystals in legumes. Pp. 279-316. In C.H. Stirton (ed.). **Advances in Legumes Systematics**, part 3. England, Kew, Richmond: Royal Botanic Garden.

Quadro 1. Testes histoquímicos aplicados para detecção das principais classes de metabólitos

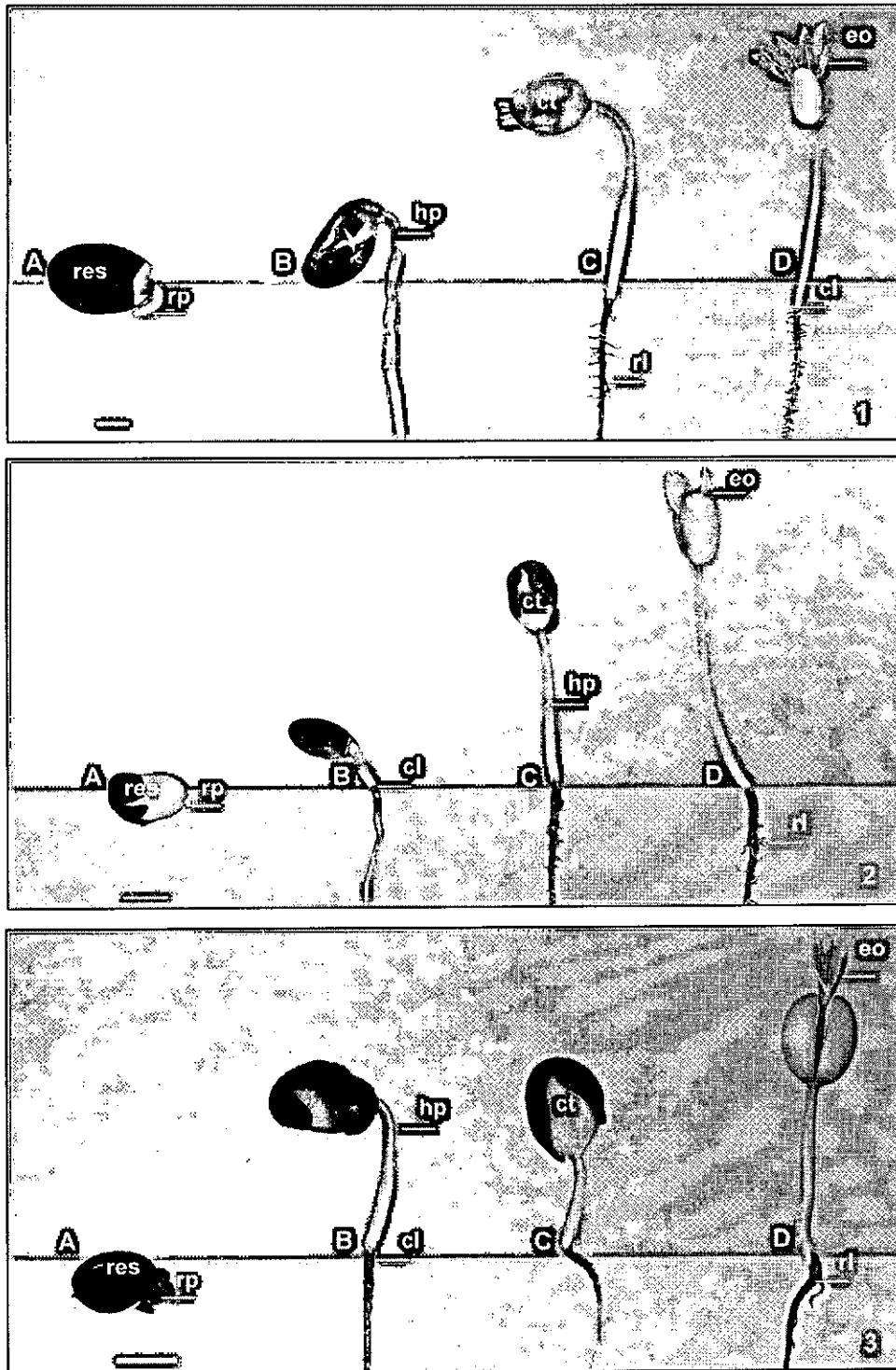
Grupos metabólicos		Reagente	Referência Bibliográfica
Lipídios	Lipídios totais	Sudan III	Johansen, 1940
Compostos fenólicos	Fenólicos gerais	Cloreto férrico	
	Lignina	Floroglucinol	
Glicídios	Ácido (pectinas)	Vermelho de Rutênio	McCully, 1970
	Ácido (pectinas, mucilagens)	Azul de toluidina 0,5%	
	Neutro (Amido)	Lugol	Jensen, 1962
Alcalóides		Reagente de Dragendorff	Svendsen & Verpoorte, 1983
Cristais de oxalato de cálcio		Ácido Clorídrico	Chamberlain, 1932

Tabela 1. Cronologia das principais transformações morfológicas, do desenvolvimento pós-seminal a formação da planta jovem das espécies de *Copaifera* L. estudadas (média dos dados em dias).

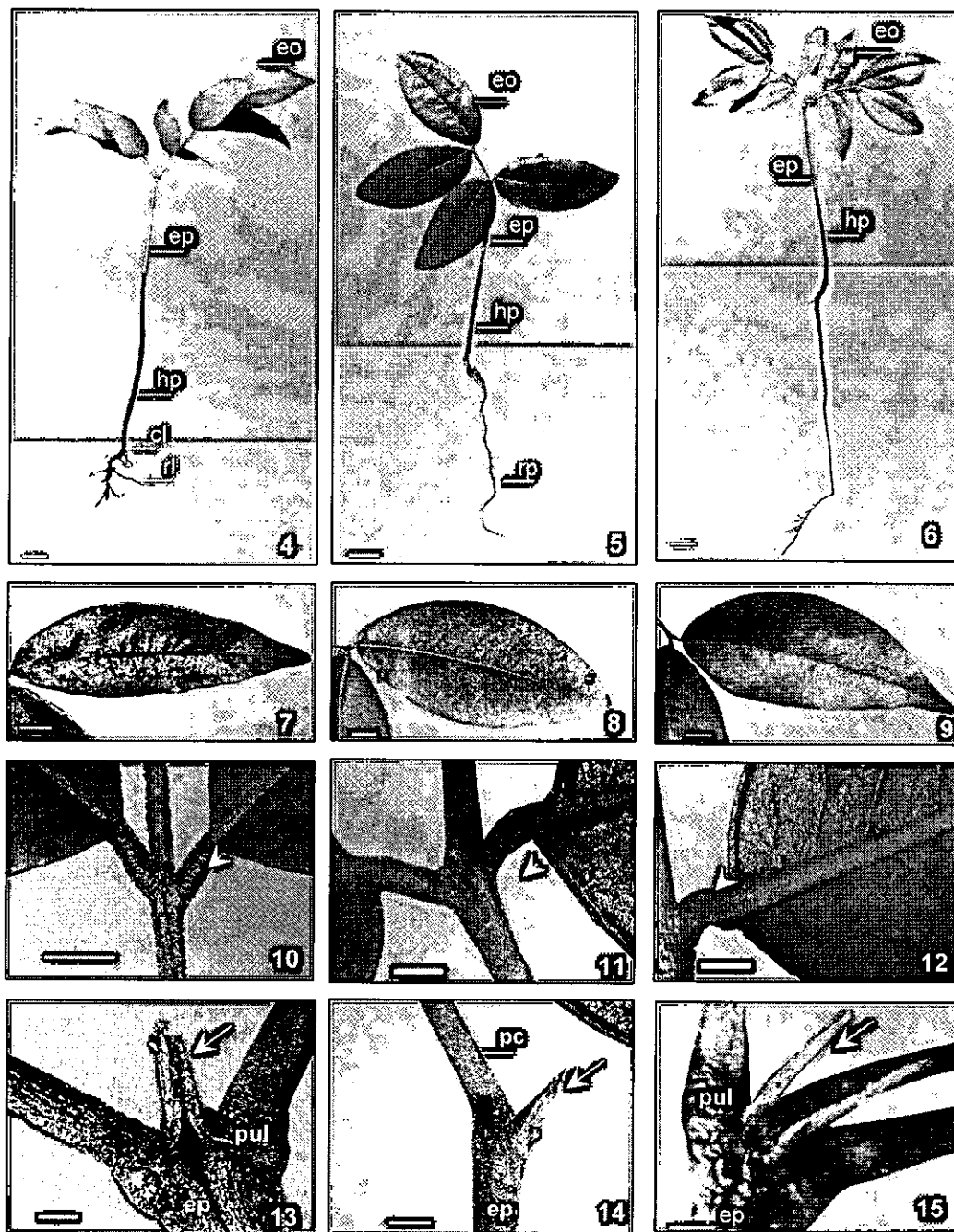
Espécie	Protrusão da raiz	Alça hipocotilar	Cotilédone livre	Surgimento do eofilo	Plântula	Planta jovem
<i>C. duckei</i>	8	10	17	20	22	45
<i>C. martii</i>	7	10	19	21	23	45
<i>C. reticulata</i>	13	16	21	23	42	105

Tabela 2. Resultado histoquímico do limbo dos eofilos e metafílos de *Copaifera duckei*, *C. martii* e *C. reticulata*.

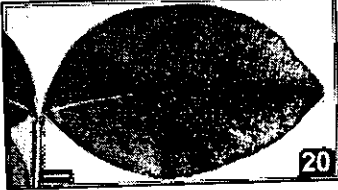
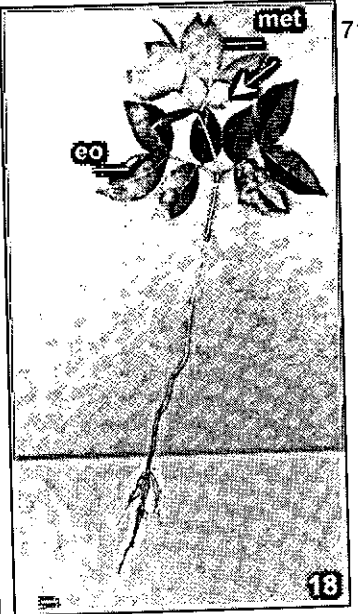
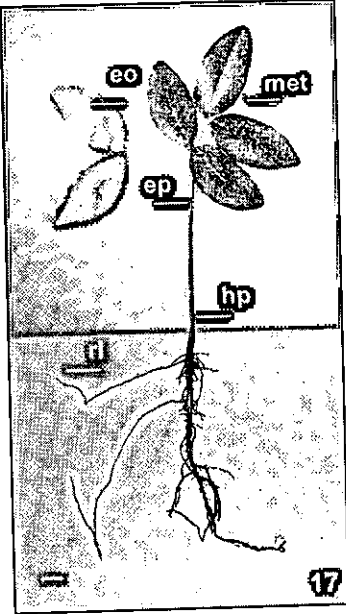
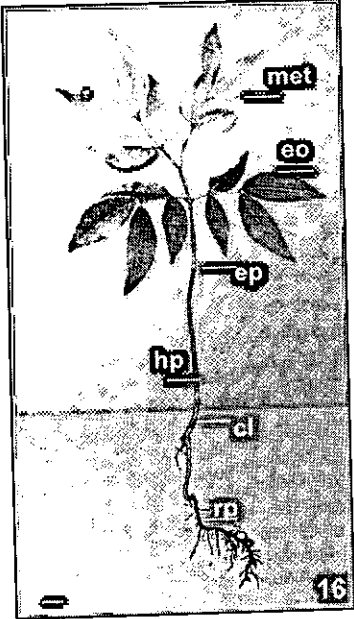
Metabólito	Teste	Resultado
Lipídios totais	Sudan III	+
Compostos fenólicos gerais	Cloreto férrico	-
Lignina	Floroglucinol	+
Pectina	Vermelho de Rutênio	+
Pectinas e mucilagem	Azul de toluidina 0,5%	+
Amido	Lugol	+
Alcalóides	Reagente de Dragendorff	-
Cristais de oxalato de cálcio	Ácido Clorídrico	+

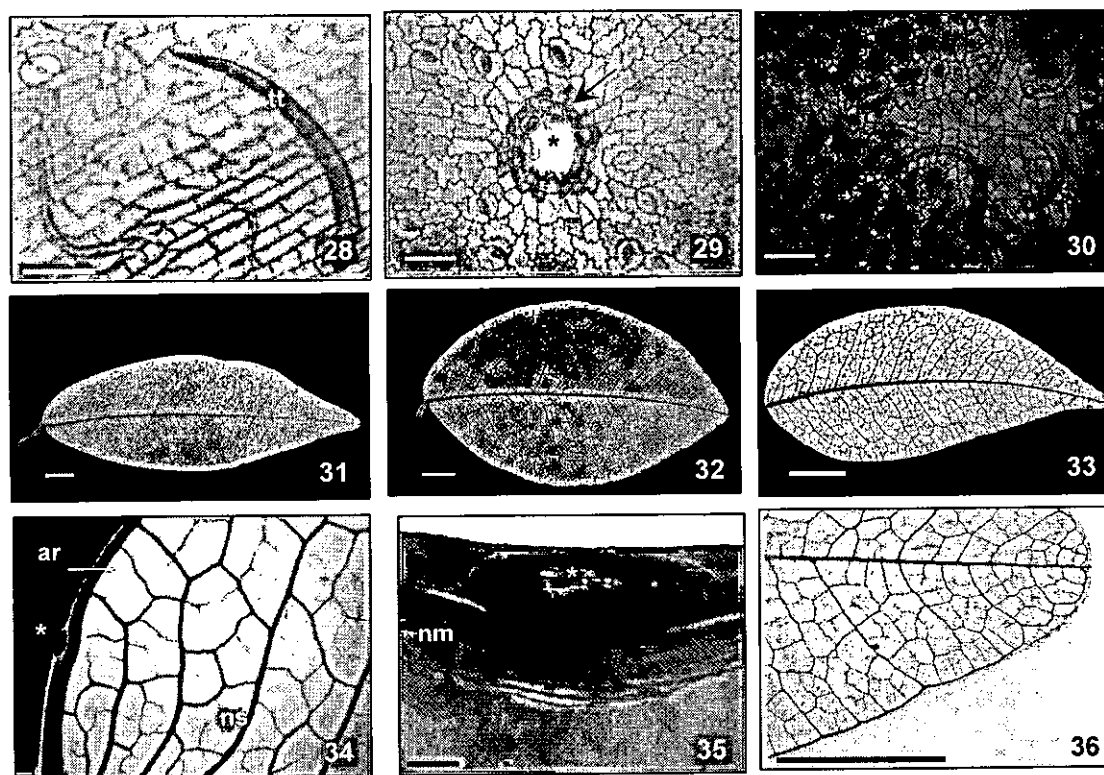


Figuras 1-3. Desenvolvimento pós-seminal. 1. *Copaifera duckei*. 2. *C. martii*. 3. *C. reticulata*. A. Protrusão da raiz. B. Diferenciação da alça hipocotilar. C. Alongamento do hipocótilo. D. Cotilédones livres e surgimento dos eófilos compostos. Barras = 1 cm. cl = coleto; ct = cotilédone; eo = eófilos; hp = hipocótilo; res = restos seminais; rl = raiz lateral; rp = raiz principal.

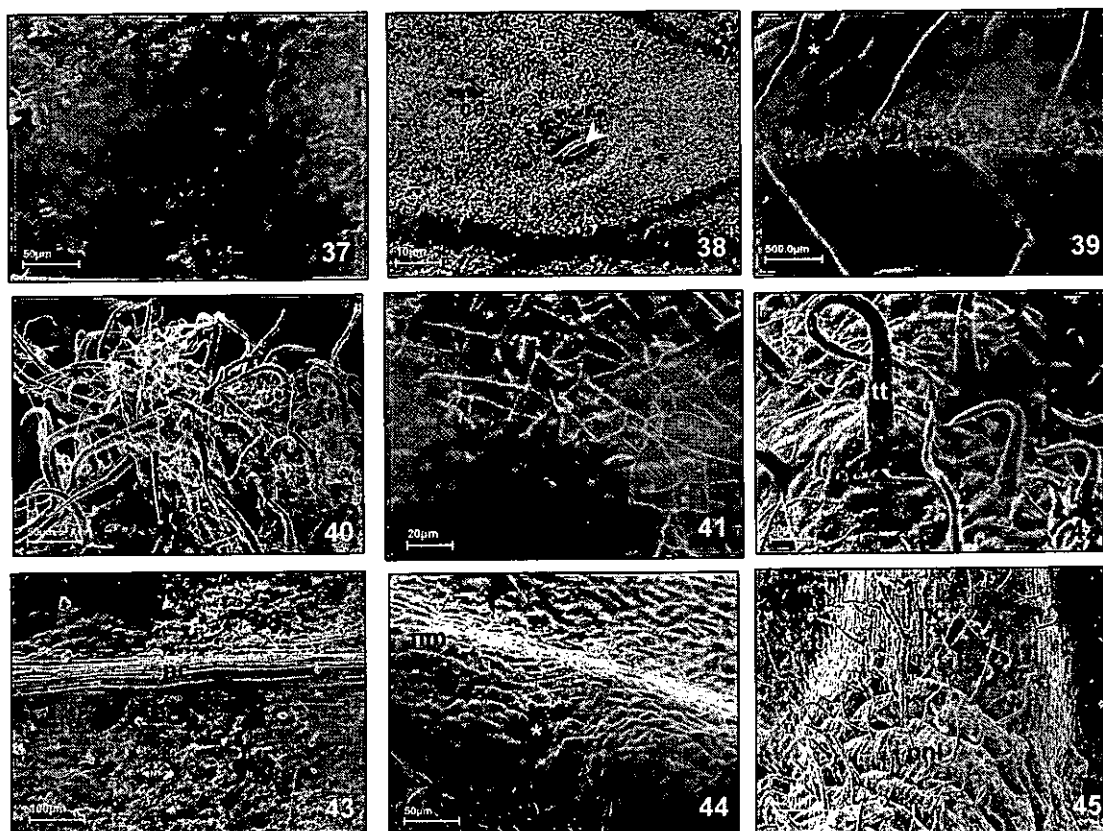


Figuras 4-15. Plântula. 4.7.10.13. *Copaifera duckei*. 5.8.11.14. *C. martii*. 6.9.12.15. *C. reticulata*. 4-6. Plântula totalmente formada. 7-9. Eofilos, face adaxial. 10-12. Pulvinutos. 13-15. Estípulas. Barras = 1 cm (4-9); 5mm (10-15). cl = coleto; eo = eofilos; ep = epicótilo; hp = hipocótilo; pc = peciolo; pul = pulvino; rl = raiz lateral; rp = raiz principal; rq = raque; seta = estípula; ponta da seta = pulvinulo.

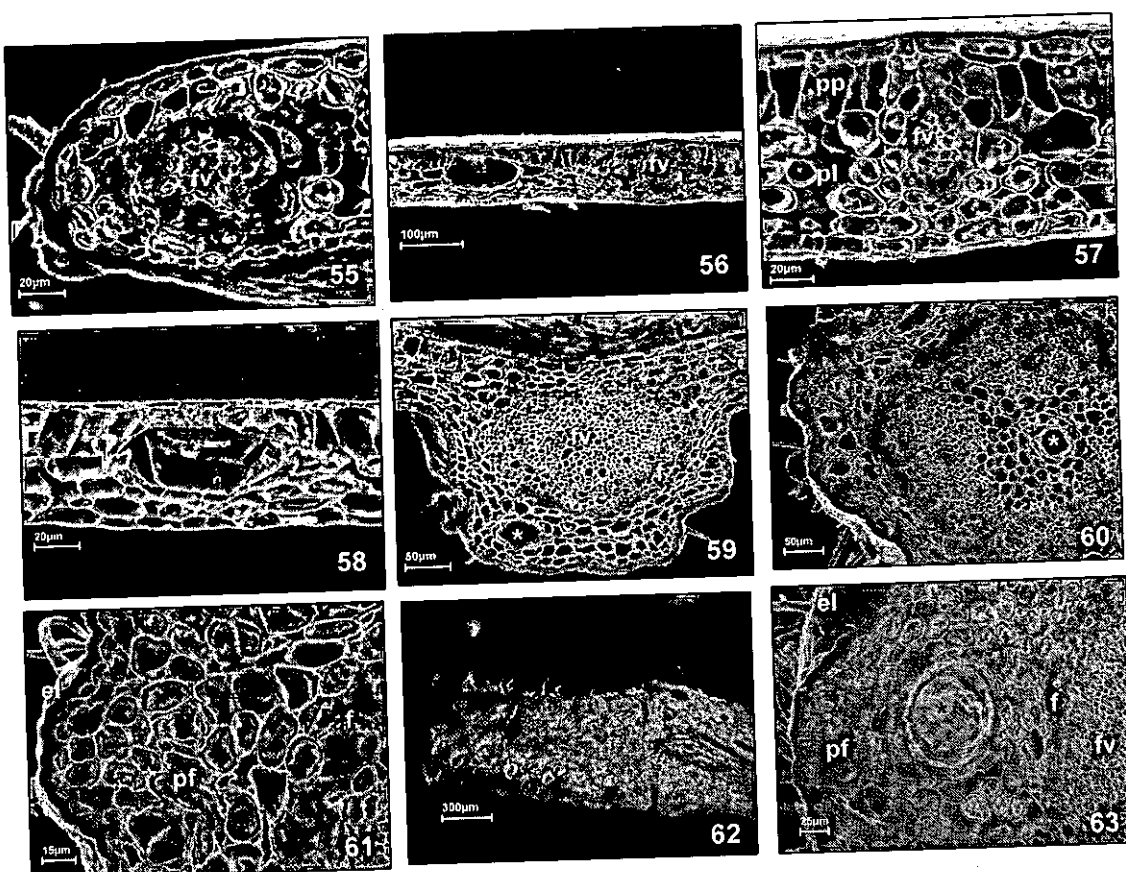




Figuras 28-36. Eofilos e metafilos. 28-30. Epiderme dissociada. 31-36. Diafanização. 28.31.34. *Copaifera duckei*. 29.32.35. *C. martii*. 30.33.36. *C. reticulata*. 28. Eofilo, face abaxial, nervura central, tricoma tector. 29. Idem, idem, nervura secundária, cavidade secretora. 30. Idem, face adaxial, nervura central. 31,32,33. Metafilos diafanizados. 34. 35. Eofilos diafanizados, região basal, evidenciando a cavidade secretora. 36. Idem, região apical. Barras = 50 μ m (28-30,34,35) e 5 mm (31-33,36). ar = aréola; nm = nervura marginal; ns = nervura secundária; tt = tricoma tector; asterisco = cavidade secretora.



Figuras 37-45. Epidermes de eofilos e metafilos em Microscopia Eletrônica de Varredura. 37.40.43. *Copaifera duckei*. 38.41.44. *C. martii*. 39.42.45. *C. reticulata*. 37. 38. Eofilo, face abaxial, região mediana, semi-limbo. 39. Metafilo, face adaxial, região mediana, nervura central. 40. Eofilo, face abaxial, região anical. 41. Metafilo, idem, região mediana, semi-limbo.



Figuras 55-63. Microscopia Eletrônica de Varredura de eofilos e metafílos em secção transversal, exceto 62. Secção longitudinal. 55,58,61. *Copaifera duckei*. 56,59,62. *C. martii*. 57,60,63. *C. reticulata*. 55. Eofilo, nervura marginal. 56,57. 58. Idem, semi-límbo. 59. Idem, nervura central. 60,61. Metafilo, raque. 62. 63. Idem, pulvinulo. Barras = 50 µm. f = feixe perivascular; fv = feixe vascular; pf = parênquima fundamental; pl = parênquima lacunoso; pp = parênquima paliçádico. asterisco = cavidade secretora.

ARTIGO III

**ATIVIDADE POTENCIALMENTE ALELOPÁTICA DE ÓLEOS
ESSENCIAS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Copaífera* L.
(LEGUMINOSAE - CAESALPINIOIDEAE)**

Elaborado de acordo com as normas do Allelopathy Journal – Anexo D

ATIVIDADE POTENCIALMENTE ALELOPÁTICA DE ÓLEOS ESSENCIAS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Copaifera* L. (LEGUMINOSAE – CAESALPINIOIDEAE)

ELY SIMONE CAJUEIRO GURGEL^{1,*}, JOÃO UBIRATAN M. DOS SANTOS², MARIA SILVIA DE MENDONÇA³

RESUMO: A rica e diversificada flora amazônica pode fornecer novas estruturas químicas com potencial de uso na atividade agrícola, notadamente aquelas espécies produtoras de óleo essencial. Neste trabalho, foi caracterizada a atividade alelopática de óleos essenciais de *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne e *C. reticulata* Ducke bem como as variações decorrentes da fonte e da composição química dos óleos. Foram analisados os efeitos alelopáticos sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento da raiz e do hipocótilo das plantas *Mimosa pudica* L. (malícia) e *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby (mata-pasto). Foram identificados os constituintes químicos (%) dos óleos das folhas e galhos das três espécies. A atividade alelopática variou em função da espécie de planta receptora, das espécies doadoras e das frações das plantas doadoras de onde foram obtidos os óleos. Os efeitos inibitórios foram mais intensos sobre o desenvolvimento da raiz e os de menor intensidade sobre a germinação de sementes. Malícia tendeu a ser mais sensível aos efeitos alelopáticos do que mata-pasto. As espécies de *Copaifera* não revelaram grandes diferenças quanto à atividade alelopática de seus óleos. Por outro lado, os óleos das folhas apresentaram maior potencial para inibir o desenvolvimento da raiz e do hipocótilo, enquanto que os do galho inibiram, preferencialmente, a germinação de sementes, embora, em algumas ocasiões essas diferenças não foram estatisticamente significativas. A composição química (%) dos óleos variou mais entre as frações oriundas de folhas e galhos do que entre as espécies doadoras. Adicionalmente, os constituintes majoritários estavam em concentrações mais elevadas nas folhas do que nos galhos, o que justifica as diferenças na intensidade dos efeitos alelopáticos observadas entre galhos e folhas. Dos constituintes identificados, apenas δ -cadineno e linalol, já foram relacionados à atividade alelopática. O conjunto desses resultados reforça a importância da flora Amazônica como fonte alternativa de constituintes químicos com potencial de uso na atividade agrícola.

Palavras-chave: Alelopatia, *Copaifera duckei*, *C. martii*, *C. reticulata*, inibição.

¹ Museu Paraense Emílio Goeldi, Cx. Postal 399. Av. Magalhães Barata, 376 - São Braz CEP: 66040-170 - Belém - PA - Brasil. Email: esgurgel@museu-goeldi.br*

² Universidade Federal Rural da Amazônia - Belém - PA

³ Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM) - Manaus - AM

use in agricultural activity.

Keywords: Allelopathy, *Copaifera duckei*, *C. martii*, *C. reticulata*, inhibition

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a agricultura está cada vez mais dependente do emprego de fertilizantes e de agroquímicos (herbicidas, fungicidas, inseticidas e outros). Tal aspecto tem suscitado insatisfação de ordem social, principalmente em relação aos prejuízos ambientais que esses produtos promovem. Apesar de todo o arsenal agroquímico aplicado anualmente nas lavouras, as perdas anuais promovidas por agentes bióticos são elevadas (31), o que revela problemas na eficiência dos produtos. Adicionalmente, raças de agentes bióticos resistentes (tolerantes) aos atuais produtos disponíveis no mercado emergem em diferentes países (5). No Brasil, vários casos de resistências de plantas daninhas foram divulgados em passado recente (9). O conjunto de todos esses aspectos mostra que inovadoras estratégias de controle de plantas daninhas precisam ser estabelecidas, as quais não apenas resguardem os interesses da sociedade, mas, também, que sejam eficientes no controle de plantas daninhas e tenham baixo custo de aquisição.

A rica e diversificada biodiversidade amazônica, notadamente aquela relativa às espécies vegetais, pode representar excelente oportunidade para fazer frente a esses novos desafios, proporcionando a oportunidade da descoberta de novas e reveladoras moléculas químicas com potencial de uso nas mais variadas atividades agrícolas. Nos últimos anos, alguns trabalhos de prospecção de plantas nativas da região amazônica, com vista à determinação de atividades bioherbicidas, foram desenvolvidos, como são o caso de *Sclerolobium paniculatum* Vogel (táxi-branco), *Tachigali myrmecophila* (Ducke) Ducke (táxi-preto), *Virola michelii* Heckel e *V. surinamensis* (Rol. Ex Rottb.) Warb. (virola) (2, 3, 26).

Entre as muitas espécies nativas encontradas na Amazônia, um grupo merece distinção aquelas produtoras de óleos essenciais, até pela grande diversidade biológica (28). Cabe ressaltar o papel dos óleos essenciais na planta, como agentes inseticidas (34) e fungicidas (19) e ainda o potencial como agentes herbicidas (39, 12).

Os óleos essenciais de algumas poucas espécies amazônicas já foram estudados em relação à atividade bioherbicida, como os de *Cymbopogon* sp. (11) e *Vouacapoua americana* Aubl. (36), revelando resultados promissores.

Uma fonte importante para este tipo de pesquisa é a família Leguminosae, com algo em torno de 727 gêneros e 19.325 espécies (25); representa um dos principais e mais importantes grupos de plantas superiores, sendo a terceira maior família de angiospermas, depois das Asteraceae (Compositae) e Orchidaceae. Na região amazônica, a família conta com aproximadamente 3.100 táxons específicos e infra-específicos, distribuídos em 198 gêneros

(40). Entre essa diversidade, merece destaque, pelos seus diversos usos, o gênero *Copaifera* L., compreendendo cerca de 28 espécies, das quais 16 são encontradas no Brasil e nove na Amazônia brasileira. Todas as espécies contempladas no presente estudo são encontradas no estado do Pará; sendo que *C. duckei* ocorre ainda no Maranhão, *C. martii* no Maranhão e no Tocantins e *C. reticulata* no Amapá e no Mato Grosso. São conhecidas popularmente por "copaíba", "copaibeira", "árvore milagrosa", "pau d'óleo", entre outros nomes. Os indígenas denominaram o "produto milagroso" como "copahu" ou "copaiva", proveniente de "kupa' iwa" da língua tupi, que quer dizer "planta da qual se extrai um óleo com propriedades medicinais" (10,15, 29).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar a atividade potencialmente alelopática dos óleos essenciais de três espécies de *Copaifera* e determinar suas variações em função da espécie e da fonte doadora. Também buscou verificar as implicações dos constituintes químicos dos óleos na atividade potencialmente alelopática.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação taxonômica

Para a obtenção do óleo essencial, foram coletadas amostras de folhas e galhos de matrizes localizadas Nordeste do Estado do Pará, no Distrito de Mosqueiro, pertencente à cidade de Belém, na fazenda Mari-Mari, às margens da PA 391, no km 28, e na Vila dos Cabanos, na Praia do Caripi, em Barcarena.

Para cada matriz, foi coletado material botânico fértil, contendo frutos, os quais foram herborizados, identificados e incorporados aos acervos dos Herbários do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará (MG) e da Embrapa Amazônia Oriental, Belém – Pará (IAN), como segue: *Copaifera duckei* Dwyer (IAN 175.605) *Copaifera martii* Hayne (IAN 176.276) e *Copaifera reticulata* Ducke (MG 186.090).

Secagem e trituração do material botânico coletado para extração de óleo essencial

Para a obtenção do óleo essencial, as amostras, já separadas em folhas e galhos, passaram por processo de secagem, em sala apropriada, com ar condicionado e desumidificador ligados 24 horas, durante sete dias e, posteriormente, trituradas com auxílio de moinho tipo Willey.

Extração dos óleos essenciais

As amostras trituradas foram submetidas à hidrodestilação, em sistemas de vidro do tipo Clevenger, durante 3 h, em balões com capacidade para um litro cada, utilizando baterias de extração contendo seis mantas de aquecimento, acopladas ao sistema de refrigeração para manutenção da água de condensação entre 12-15°C. Após extração, os óleos foram centrifugados durante 5 min, a 3000 rpm, posteriormente desidratados com sulfato de sódio anidro e novamente centrifugados. Foi feito o cálculo do rendimento dos óleos em ml/100g, os quais foram armazenados em ampolas de vidro âmbar, vedadas, acondicionadas em geladeira a 5°C e, incorporadas à coleção de óleos essenciais do MPEG.

Análise da composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados com auxílio de cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), em sistema Shimadzu QP-2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 mm de espessura de filme) nas seguintes condições operacionais: gás de arraste: hélio, em velocidade linear de 32 cm/s (medida a 100 °C); tipo de injeção: "splitless", (2ml de óleo em 1ml de hexano); temperatura do injetor e do detector: 250°C; programa de temperatura: 60 – 240°C (3°C/min); EM: impacto eletrônico, 70 eV; temperatura da fonte de íons e partes de conexão: 180°C.

A identificação foi feita por comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas do sistema e com os dados da literatura (01). Os IR foram obtidos utilizando-se a série homóloga dos n-alcenos e a quantificação dos componentes por cromatografia de gás (CG) em equipamento Shimadzu QP-2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC), nas mesmas condições operacionais acima citadas, exceto pelo uso do hidrogênio como gás de arraste.

Análise da atividade alelopática dos óleos essenciais

Foram selecionadas as sementes das espécies receptoras *Mimosa pudica* L. – Leguminosae Mimosoideae (malícia) e *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby – Leguminosae Caesalpinioideae (mata-pasto) uniformemente quanto ao tamanho, formato e coloração (24), coletadas no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém, Estado do Pará, as quais passaram por processo de limpeza e tratadas visando à quebra da dormência, via imersão em ácido sulfúrico (44).

Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro recebeu 20 sementes de cada espécie receptora. A germinação foi monitorada em períodos de 10 dias, com contagens diárias e

eliminação das sementes germinadas. Os bioensaios foram desenvolvidos em câmaras tipo BOD, com temperatura controlada para 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Consideraram-se sementes germinadas aquelas que apresentavam raiz com extensão igual ou superior a 2,0 mm (21, 13).

Os bioensaios de desenvolvimento da raiz e do hipocótilo foram desenvolvidos nas mesmas condições do bioensaio de germinação, tendo por diferença o fotoperíodo de 24 horas. Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forrada com uma folha de papel filtro qualitativo, recebeu duas sementes pré-germinadas aproximadamente três dias antes.

Outros procedimentos experimentais

Em todos os bioensaios, a concentração de teste foi de 1,0%. Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro recebeu 3,0 mL da solução teste, adicionada apenas uma vez, no início de cada bioensaio, sendo, a partir de então, acrescentado apenas água destilada sempre que necessário. Após a adição das soluções, deixava-se evaporar o solvente par adicionar água destilada, em volume correspondente, mantendo, dessa forma, a concentração original.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para todos os bioensaios, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, em modelo hierárquico com dois fatores e, como tratamento testemunha água destilada. Os dados foram analisados pelo teste de F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% (46). Os dados foram transformados para arc. sen. \sqrt{x} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de extratos brutos ou mesmo de óleos essenciais em bioensaios de avaliação de atividade alelopática exige atenção especial em relação aos efeitos do potencial osmótico do material que se está avaliando. As principais conseqüências da não observância desse aspecto é superestimar a atividade alelopática do extrato ou, então, admitir a existência de atividade alelopática em casos onde não existe (50). Esses aspectos apontam para a necessidade de se separar tais efeitos para que não haja comprometimento dos resultados. No presente estudo, a concentração utilizada foi de 1,0%, pois para concentrações igual ou ligeiramente acima, a contribuição do potencial osmótico pode ser desconsiderada (43). Assim sendo, os resultados encontrados neste trabalho podem ser atribuídos, exclusivamente, aos efeitos da atividade alelopática dos óleos sobre a germinação de sementes e sobre o desenvolvimento da raiz principal e do hipocótilo.

O desdobramento da interação planta doadora x fração da planta doadora, tanto para a espécie malícia quanto para a mata-pasto, para o bioensaio germinação de sementes, é apresentado na Fig. 1. Os dados indicam que a inibição foi extremamente baixa, não ultrapassando o valor de 17,3%, para a espécie malícia e 18%, para mata-pasto. Para todas as três espécies doadoras do óleo essencial, a fração galhos foi a que apresentou maior potencial inibitório. A germinação das sementes de malícia tendeu a ser inibida em intensidades maiores do que às de mata-pasto. Considerando os efeitos promovidos pelos óleos essenciais de cada espécie, *C. reticulata* foi a que evidenciou maior habilidade para inibir a germinação das sementes de malícia e mata-pasto.

A intensidade dos efeitos inibitórios sobre a germinação de sementes, verificada neste trabalho, é inferior à obtida utilizando óleos essenciais de duas espécies de *Cybopogon* (42). Alguns autores ressaltam o potencial dos óleos essenciais como agentes inibitórios da germinação de sementes (41, 4). Os baixos efeitos verificados para os óleos das espécies estudadas neste trabalho, em relação a outros resultados, podem estar associados às diferenças na composição química dos óleos e às concentrações com que se apresentam.

A análise de variância para os efeitos sobre o desenvolvimento da raiz apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) para a interação entre espécie doadora x fração da planta doadora, para a espécie malícia, e não significativo ($p > 0,05$) para mata-pasto. Na Fig. 2 é apresentado o desdobramento da interação entre esses dois fatores, para a espécie malícia. As inibições verificadas foram de magnitude bem superior àquelas verificadas sobre a germinação de sementes. Ao contrário do observado no bioensaio de germinação de sementes, o óleo

essencial das folhas revelou potencial inibitório superior ao dos galhos, com valores sempre acima dos 42,0%. Para galhos, os efeitos foram mais expressivos para a espécie *C. martii*, com inibição acima de 43,0%.

Face à ausência de efeito significativo ($p > 0,05$) para a interação entre esses fatores, para a espécie mata-pasto, os dados são apresentados separadamente. Na Fig. 3, observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as inibições promovidas pelos óleos essenciais das três espécies doadoras sobre o desenvolvimento da raiz de mata-pasto. Já na comparação do fator fração da planta doadora (Fig. 4), observa-se que os óleos essenciais das folhas promoveram inibições superiores a 50%, enquanto que os oriundos de galhos estiveram abaixo dos 40%. Esse resultado confirma a maior capacidade do óleo essencial das folhas em inibir o desenvolvimento da raiz nas duas espécies de plantas receptoras.

Foi observado, também, ausência de efeitos significativos ($p > 0,05$) para a interação entre planta doadora x fração da planta doadora, para as duas espécies receptoras, no bioensaio de desenvolvimento do hipocótilo. Isoladamente, *C. duckei*, *C. martii* e *C. reticulata* promoveram inibições sobre o desenvolvimento do hipocótilo de malícia acima de 69%, com destaque para a espécie *C. reticulata*, com inibição acima de 76%. Em relação aos efeitos sobre a espécie mata-pasto, a intensidade dos mesmos foi de ordem inferior, sendo o efeito promovido por *C. Martii*, com 47,2%, o mais expressivo (Fig. 5). Esses dados mostram claramente a espécie malícia como sendo mais sensível aos efeitos dos óleos essenciais.

Folhas e galhos não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) com relação às inibições promovidas sobre o desenvolvimento do hipocótilo de malícia e mata-pasto. Entretanto, as folhas apresentaram intensidades de inibição em maior escala (Fig. 6). Comparativamente, o desenvolvimento do hipocótilo de malícia foi mais intensamente inibido do que o de mata-pasto. Essas informações confirmam a maior sensibilidade da espécie malícia aos efeitos alelopáticos dos óleos essenciais das três espécies de *Copaifera*, independentemente da fração da planta.

Quando se considera as inibições potencialmente alelopáticas promovidas pelos óleos essenciais das três espécies de *Copaifera* sobre a germinação de sementes, desenvolvimento da raiz e do hipocótilo, observa-se que os efeitos incidiram com maior intensidade sobre o desenvolvimento do hipocótilo e, em menor intensidade, sobre a germinação das sementes. Em relação às duas frações das plantas doadoras, os óleos essenciais dos galhos apresentaram potencial inibitório superior na germinação, enquanto os de folhas foram superiores na inibição do desenvolvimento da raiz e do hipocótilo, embora, em determinadas ocasiões, essas

diferenças não foram estatísticas significativa ($p > 0,05$), especialmente em relação aos efeitos sobre o desenvolvimento do hipocótilo (Fig. 6).

Em estudos de alelopatia, variações no potencial alelopático são encontradas tanto entre diferentes espécies como entre espécies do mesmo gênero e ainda entre cultivares e acessos de uma mesma espécie. Bons exemplos desse aspecto podem ser encontrados em estudos com *Brachiaria* spp. (45), *Helianthus* sp. (27), *Pinus* sp (20), *Quercus* sp., *Spiraea* sp. (30) e *Sorghum* spp. (14), dentre outros. No mesmo sentido, diferenças na atividade alelopática entre cultivares de arroz foram encontradas (6, 7), bem como entre cultivares de trigo (51). No presente trabalho, diferenças no potencial alelopático das espécies de *Copaifera* também foram observadas, embora, em determinadas ocasiões essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

As plantas produzem e estocam um sem-número de metabólitos com atividade de defesa, os quais se distribuem nos diferentes órgãos sem padrão definido.

Atividade alelopática e diferentes aleloquímicos já foram identificados tanto em folhas como frutos, sementes, flores, rizomas e outras partes das plantas (51, 30, 33, 37, 22, 17, 47, 18, 8, 35). Aparentemente, os óleos essenciais apresentam o mesmo padrão dos demais aleloquímicos em relação à sua distribuição, podendo ser encontrados tanto em rizomas (48) como em folhas e galhos, como neste trabalho.

Os efeitos alelopáticos de óleos essenciais devem ser vistos como o resultado da ação conjunta dos seus diferentes componentes. No presente trabalho, a composição química dos óleos essenciais variou consideravelmente entre as espécies e entre as duas frações das plantas (Fig. 1). Do total de constituintes identificados, quatro eram monoterpenos (linalol, Butanoato de (3Z)-hexenil, butanoato de hexil e o 2-metilbutanoato de (3Z) hexenil), um diterpeno (kaureno) e os restantes eram sesquiterpenos. Os monoterpenos foram identificados apenas nas folhas das espécies *C. duckei* (somente linalol) e *C. martii* (todos os quatro monoterpenos). Os componentes majoritários foram: β -cariofileno, β -copaeno, α -humuleno; germacreno D, biciclogermacreno e δ -cadineno. No total, os constituintes majoritários representaram 62% e 60% dos constituintes de *C. duckei*, 54% e 45% de *C. reticulata* e 57% e 24% de *C. martii*, respectivamente para folhas e galhos. Como se pode observar, as folhas apresentaram maior percentual de constituintes majoritários, especialmente na espécie *C. martii*. Foram observados resultados semelhantes em relação às variações dos constituintes químicos de óleos essenciais em diferentes partes de planta de *Chamaecyparis obtusa* (23). Essas diferenças podem explicar, em parte, a superioridade das atividades inibitórias das folhas em relação aos galhos, notadamente em relação aos efeitos promovidos sobre o

desenvolvimento da raiz e do hipocótilo. Porém, as pequenas variações na atividade alelopática observadas entre as três espécies não acompanhou a variação dos constituintes químicos majoritários, o que indica a participação de outros constituintes não majoritários na atividade alelopática dos óleos.

Os trabalhos disponíveis na literatura abordando os efeitos alelopáticos de óleos essenciais são relativamente raros. Quando se considera os efeitos de constituintes isoladamente ou em grupos menores, os trabalhos são ainda mais escassos (32, 16). Dos constituintes identificados como fazendo parte dos óleos essenciais das espécies estudadas neste trabalho, atividade alelopática foi reportada apenas para δ -cadineno e linalol. O δ -cadineno é um sesquiterpeno, considerado um aleloquímico em estado puro e tem apresentado fitotoxicidade sobre o desenvolvimento da raiz de algodão e trigo, em concentração de 1,0 nM (38). O linalol foi apontado como importante agente alelopático, com potente atividade inibitória (49). Os dados da Fig. 1 mostram que δ -cadineno está presente em todas as espécies e nas duas frações das plantas, enquanto linalol foi identificado apenas nas folhas de *C. duckei* e *C. martii*, em concentração abaixo de 1,0%. No geral, as folhas apresentaram maiores concentrações de δ -cadineno, com exceção dos galhos de *C. martii*. Evidências de atividade alelopática para outros constituintes não foram encontradas na literatura, contudo não se pode descartar essa possibilidade.

O conjunto dos resultados obtidos permite atribuir importante atividade alelopática aos óleos essenciais de *C. duckei*, *C. reticulata* e *C. martii*. A intensidade e as variações verificadas se devem mais às fontes (folhas ou galhos) do que à espécie. Comparativamente, os óleos obtidos das folhas foram mais efetivos na inibição do desenvolvimento da raiz e do hipocótilo, enquanto que os dos galhos promoveram inibição de maior grandeza sobre a germinação das sementes. A ação alelopática dos óleos incidiu com mais intensidade sobre a planta malícia do que mata-pasto. O desenvolvimento do hipocótilo foi mais sensível aos efeitos alelopáticos, enquanto que a germinação foi menos afetada. As diferenças na composição química dos óleos podem explicar, em parte, as diferenças obtidas, especialmente em relação à presença dos componentes δ -cadineno e linalol, moléculas com atividade alelopática já comprovada. Esses resultados conferem à flora Amazônica importância biológica e econômica, na medida em que pode se constituir em importante fonte de moléculas químicas com potencial uso na atividade agrícola.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Técnicos da Embrapa Amazônia Oriental Miguel Pastana do Nascimento, João Carlos Lima de Oliveira e Jair Freitas da Costa.

Aos bolsistas de PCI do Museu Paraense Emílio Goeldi M.Sc. Raimunda Alves Pereira; Júlio Souza e Maria Maricélia Félix da Silva pela valiosa contribuição durante o processamento do material botânico até a extração dos óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

1. Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Pub. Corp., London, 804 pp.
2. Barros, A.P.Q., Morais, R.C. (2006). *Potentially allelopathic activity in leaves of táxi-branco (Sclerolobium paniculatum Vogel). Atividade potencialmente alelopática em folhas de táxi-branco (Sclerolobium paniculatum Vogel)*. Trabalho de Conclusão de Curso, Centro Universitário Superior do Pará, Belém Pará. 36 pp. (In Portuguese).
3. Borges, F.C. (2003). *Phytochemical, allelopathic and pharmacological study of chemical constituent from leaves of Virola michelii (Heckel) and Virola surinamensis (Roll. Warb.)*. *Estudo fitoquímico, alelopático e farmacológico de constituintes químicos das folhas de Virola michelii (Heckel) e Virola surinamensis (Rol. Warb.)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém Pará, 148 pp. (In Portuguese).
4. Bradow, J.M., Connick, W.J. (1990). Volatile seed germination inhibitors from plant residues. *Journal of Chemical Ecology*, **16**(3): 645-666.
5. Christoffoleti, P.J., Moreira, M.S. (2007). Resistance of weeds plants to the herbicides. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: *I Simpósio Internacional Amazônico Sobre Plantas Daninhas*. (Eds. AP.S. Souza Filho and D. Karam) pp. 207-255. Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. Anais... Belém, Pará. (In Portuguese).
6. Chung, I.M., Ahn, J.K., Yun, S.J. (2001). Assessment of allelopathic potencial of banyard grass (*Enchinochloa crus-galli*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection* **20**: 921-928.
7. Chung, I.M., Kim, K.H., Ahn, J.K., Ju, H.J. (1997). Allelopathic potential evaluation of rice cultivars on *Enchinochloa crus-galli*. *Weed Science* **17**: 52-58.
8. Corcuera, L.J., Argandoña, V.H., Zuñiga, G.E. (1992). Allelochemicals in wheat and barley: role in plant-insect interactions. In: *Allelopathy*. (Ed., S.J.H Rizvi) pp. 119-127. Chapman & Hall, New York.
9. Cortez, M. G. (2000). *Resistance of Brachiaria plantaginea (Link) Hitchc. Biotypes to acetil coenzyme a carboxilase inhibitor herbicides. Resistência de biótipos de Brachiaria plantaginea (Link) Hitchc. A herbicidas inibidores da Acetil Coenzima A Carboxilase*. Tese de Doutorado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo. 214 pp. (In Portuguese).

10. Cunha, A.G. da. (1999). *Historical dictionary of the Portuguese words from tupi origin. Dicionário histórico das palavras portuguesas de origem tupi*. Brasília: Melhoramentos, 120p. (In Portuguese).
11. Dias, A.P.C., Souza Filho, A.P.S. (2005). I allelopathic activity in hidroalcoholic extrats of *Cymbopogon* sp. (Poaceae). Atividade potencialmente alelopática em extratos hidroalcóolicos de *Cymbopogon* sp. (Poaceae). *Revista de Ciências Agrárias* **44**: 37-48. (In Portuguese).
12. Duke, S.O., Dayan, F.E., Rimando, A.M, Schrader, K.K, Aliota, G., Oliva, A., Romagni, J.G. (2002). Chemical from nature for weed management. *Weed Science* **50**(2): 138-151.
13. Duram, J.M., Tortosa, M.E. (1985). The effects of mechanical and chemical scarification on germination of charlock (*Sinapsis arvensis* L.) seeds. *Seed Science and Technology*, **13**(1): 155-163.
14. Einhellig, F.A., Leather, G.R. (1988). Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop production. *Journal of Chemical Ecology* **14**(10): 1829-1844.
15. Ferreira, A.B. de H. (1988). *New dictionary of Portuguese language. Novo dicionário da língua portuguesa*. Rio de Janeiro: Nova fronteira. 1498p. (In Portuguese).
16. Fischer, N.H. (1991). Plant terpenoids as allelopahty agents. In: *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. (Eds. J.B. Harbone and F.A. Tomes-Barberan) pp.377-399. Oxford: Clarendon.
17. Fukuhara, K., Shimizu, K., Kubo, I. (2004). Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. *Phytochemistry* **65**: 1283-1286.
18. Heisey, R.D. (1996). Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and characterization of its herbicidal activity. *American Journal of Botany*, **83**(2): 192-200.
19. Hoagland, R.E. (1999). Allelopahtic interactions of plant and pathogens. In: *Recent advances in allelopathy* (Eds. F.A. Macias, J.C.G. Galindo, J.M.G. Molinillo and H.G. Cutler) pp. 423-450.
20. Jobidon, R. (1986). Allelopathic potential of coniferous species to old-field weeds in eastern Quebec. *Forest Science* **32**(1) 112-118.

33. Nasir, H., Iqbal, Z., Hiradate, S., Fujii, Y. (2005). Allelopathic potential of *Robina pseudo-acacia* L. *Journal of Chemical Ecology* **31**(9): 2179-2192.
34. Ngoh, S.P., Hoo, I., Pang, F.Y., Huang, Y., Kimi, M.R., Ho, S.H. (1998). Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach (*Periplaneta Americana* L.). *Pesticide Science* **54**: 261-268.
35. Niemeyer, H.M., Peres, F.J. (1995). Potential of hydroxamic acids in the control of cereal pests, diseases and weeds. In: *Allelopathy: organisms, processes and applications*. (Eds. K.M.M. Inderjit Dakshine and F.A. Einhellig) pp. 260-270. American Chemical Society, Washington.
36. Paracampo, N.E.N. (2002). *Chemical study and cytotoxic and fungitoxic evaluation of extracts of Vouacapoua cf. americana. Estudo químico e avaliação fitotóxica e fungitóxica de extratos de Vouacapoua cf. americana*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 63 pp. (In Portuguese).
37. Rashid, A., Furness, N.H., Ellis, B.E., Upadhyaya, M.K. (2005). Inhibition of seed germination and seedling growth by hound's-tongue (*Cynoglossum officinale* L.) seed leachate. *Weed Biology Management* **5**: 143-149.
38. Riffle, M.S., Waller, G.R., Murray, D.S., Sgaramello, R.P. (1990). Devil's-claw (*Proboscidea louisianica*) essential oil and its components. *Journal of Chemical Ecology* **16**(6): 1927-1940.
39. Romagni, J.G., Duke, S.O., Dayan, F.E. (2000). Inhibition of plant aspergine synthetase by monoterpene cineol. *Plant Physiology* **123**:725-732
40. Silva, M.F., Carreira, L.M.M., Tavares, A.S., Ribeiro, I.C., Jardim, M.A.G., Lobo, M.G.A., Oliveira, J.O. (1989). Brazilian Amazonian Legumes. As Leguminosas da Amazônia Brasileira, Lista Prévia. *Acta Botânica Brasílica* **2**(1): 193-237 (In Portuguese).
41. Souto, X.C., Gonzáles, L., Reigosa, M.J. (1995). Allelopathy in forest environmental in Galícia, Spain, *Allelopathy Journal* **2**: 67-78.
42. Souza Filho, A.P.S. (2006). *Allelopathy and plants. Alelopatia e as plantas*. Embrapa, Belém. 159p. (In Portuguese).
43. Souza Filho, A.P.S., Alves, S.M. (2000). Allelopathic potential of "acapú" (*Vouacapoua americana*) plants: effects on pasture weeds. Potencial alelopático de plantas de acapú (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. *Planta Daninha*, **18**(3): 435-441. (In Portuguese).
44. Souza Filho, A.P.S., Alves, S.M. (1998). Potentially allelopathics and autotoxicus effect in *Pueraria phaseoloides*. Efeitos potencialmente alelopáticos e autotóxicos em

- Pueraria phaseoloides*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de zootecnia, **35**, pp. 88-89. Anais... Botucatu, São Paulo. (In Portuguese).
45. Souza Filho, A.P.S., Rodrigues, L.R.A., Rodrigues, T.J.D. (1997). Inhibition of the germination and radicle elongate of pasture weeds by watery extrats of tropical grass Inibição da germinação e alongamento da radícula de invasoras de pastagens pelos extratos aquosos de gramíneas forrageiras tropicais. *Pasturas Tropicales* **19**(1): 45-50. (In Portuguese).
 46. Statistical Analysis System – SAS (1989). User's Guide. Version 6.4. ed. Cary: 846 pp.
 47. Tawata, S., Kongo, F. (1987). Mimosine allelopathy of *Leucaena*. *Leucaena Research Report* **8**: 40-41.
 48. Vilhena, K.S.S. (2006). Chemical study and allelopathic activity of rude extracts and the essential oil from rhizomes of *Cyperus articulatum* L. and *Cyperus giganteus* (Cyperaceae). Estudo químico e atividade alelopática dos extratos brutos e do óleo essencial dos rizomas de *Cyperus articulatum* L. e *Cyperus giganteus* (Cyperaceae). Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 130 pp. (In Portuguese).
 49. Vokou, D, Douvli P., Blionis, G.J., Halley, J.M. (2003). Effects of monoterpenoids acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, **29**(10): 2281-2301.
 50. Wardle, D.A., Nicholson, K.S., Ahmed, M. (1992). Comparision of osmotic and allelopathic effects of grass leaf extracts on grass seed germination and radicle elongation. *Plant Soil*, **140**: 315-319.
 51. Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D., Haig, T. (2000). Evaluation of seedling allelopathy in 453 wheat (*Triticum aestivum*) accessions against annual ryegrass (*Lolium rigidum*) by the equal-compartment-agar method. *Australian Journal of Agricultural Research* **51**: 937-944.

Tabela 1. Componentes químicos (%) dos óleos essenciais de três espécies de *Copaifera*.

Nome	Irc	<i>C. duckei</i>		<i>C. reticulata</i>		<i>C. martii</i>	
		Folha	Galho	Folha	Galho	Folha	Galho
Linalol	1103	0,38	-	-	-	0,53	-
Butanoato de (3Z)-hexenil	1189	-	-	-	-	2,81	-
Butanoato de hexil	1194	-	-	-	-	0,38	-
2-Metilbutanoato de (3Z)-hexenil	1234	-	-	-	-	0,14	-
δ -Elemeno	1340	3,35	1,37	1,93	1,46	3,47	0,51
α -Cubebeno	1353	0,50	-	0,46	-	0,36	-
Ciclosativeno	1369	-	-	0,30	1,60	-	-
α -Ilangeno	1375	0,73	0,57	0,46	0,68	0,41	-
α -Copaeno	1379	1,01	2,21	1,15	1,97	3,18	14,41
Hexanoato de (3Z)-hexenil	1384	-	-	-	-	0,41	-
β -Bourboneno	1389	0,37	-	0,42	-	-	-
β -Cubebeno	1394	-	-	-	-	-	5,19
β -Elemeno	1395	1,81	1,35	1,67	4,18	2,50	-
Cipereno	1404	0,29	1,80	2,44	1,54	2,19	8,25
Sesquitujeno	1409	-	0,16	-	-	-	-
α -Gurjuneno	1415	-	-	-	-	0,19	-
<i>cis</i> - α -bergamoteno	1420	-	0,25	-	-	-	-
β -Cariofileno	1425	13,92	33,45	20,06	24,77	19,90	9,20
β -Copaeno	1432	4,45	1,47	2,22	1,34	2,12	0,47
γ -Elemeno	1437	-	1,16	0,56	0,80	0,84	-
<i>Trans</i> - α -Bergamoteno	1439	-	-	-	-	-	6,76
Aromadendreno	1444	0,59	0,54	0,70	0,57	-	-
(z)- β -Farneseno	1446	-	-	-	-	-	3,03
<i>Cis</i> -Muuroala-3,5-dieno	1450	-	-	-	-	-	0,82
<i>Trans</i> -Muuroala-3,5-dieno	1455	-	-	0,49	-	-	-
α -Humuleno	1458	4,81	7,63	4,35	4,97	4,90	1,85
Aloaromadendreno	1466	-	-	-	-	-	3,07
<i>Cis</i> -Cadina-1(6), 4-dieno	1468	1,32	0,62	0,71	0,11	1,32	-
4,5-di- <i>epi</i> -Aristolocheno	1474	-	-	-	0,33	-	-
δ -Muuroleno	1479	-	-	-	-	-	3,90

Cont...

Nome	IRc	<i>C. duckei</i>		<i>C. reticulata</i>		<i>C. martii</i>	
		Folha	Galho	Folha	Galho	Folha	Galho
γ -Gurjuneno	1479	-	-	1,13	-	1,11	-
γ -Muuroleno	1482	-	5,91	4,76	4,79	1,72	-
Germacreno D	1486	23,37	12,00	17,53	10,61	15,82	4,92
β -Selineno	1491	-	1,03	1,96	14,36	0,56	2,15
<i>Trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1497	-	-	0,83	-	1,21	-
Valenceno	1500	-	4,79	-	-	-	-
α -Selineno	1500	-	-	-	11,57	-	4,06
Viridifloreno	1500	-	-	2,98	-	-	-
Biciclogermacreno	1502	9,15	-	3,16	-	8,86	-
α -Muuroleno	1504	-	-	1,98	1,06	-	-
δ -Amorfenol	1511	-	-	-	0,61	-	-
β -Bisaboleno	1511	-	1,09	-	-	-	1,01
δ -Amorfenol	1512	1,36	-	0,92	-	1,08	-
γ -Cadineno	1518	2,50	2,53	2,35	1,67	1,04	1,12
7- <i>epi</i> - α -Selineno	1522	-	-	-	0,40	-	-
δ -Cadineno	1527	6,18	5,26	6,61	3,74	5,19	7,19
<i>Trans</i> -Cadina-1,4-dieno	1535	0,53	0,17	0,37	0,12	0,34	0,58
α -Cadineno	1540	0,72	0,34	0,48	0,17	0,36	-
α -Calacoreno	1546	0,25	0,27	0,18	0,08	-	1,04
Elemol	1552	0,15	-	-	-	-	-
Germacreno B	1560	0,41	-	-	0,13	-	-
(E)-Nerolidol	1563	-	-	-	-	0,71	-
β -Calacoreno	1565	0,12	0,13	-	0,06	-	-
Espatuleno	1579	1,36	0,67	1,08	0,15	0,30	3,32
Óxido de cariofileno	1583	1,95	3,71	1,34	1,47	-	1,16
β -copaen-4- α -ol	1592	-	-	-	-	-	0,80
Rosifoliol	1603	0,43	-	-	-	-	-
Epóxido de humuleno II	1611	-	0,53	-	-	-	-
1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1617	-	-	0,09	-	-	-
1- <i>epi</i> -Cubenol	1631	-	-	0,56	-	1,11	0,65

Cont...

Nome	IRc	<i>C. duckei</i>		<i>C. reticulata</i>		<i>C. martii</i>	
		Folha	Galho	Folha	Galho	Folha	Galho
γ -Eudesmol	1635			0,26			
Cubenol	1636	0,99				0,19	
α -Muurolol	1646	3,09		0,57		2,98	1,12
<i>epi</i> - α -Cadinol	1646			1,78			
α -Cadinol	1659	4,08		2,41		3,30	
14-hidroxi-9- <i>epi</i> - β -Cariofileno	1665	0,28		0,19			0,16
Mustacona	1685						0,95
Eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	1693	0,26	0,13	0,13			
Pentadecanal	1717	0,31					
Kaureno	2051	0,69	1,52	1,35	1,54	0,18	1,68

IRc = Índice de retenção calculado

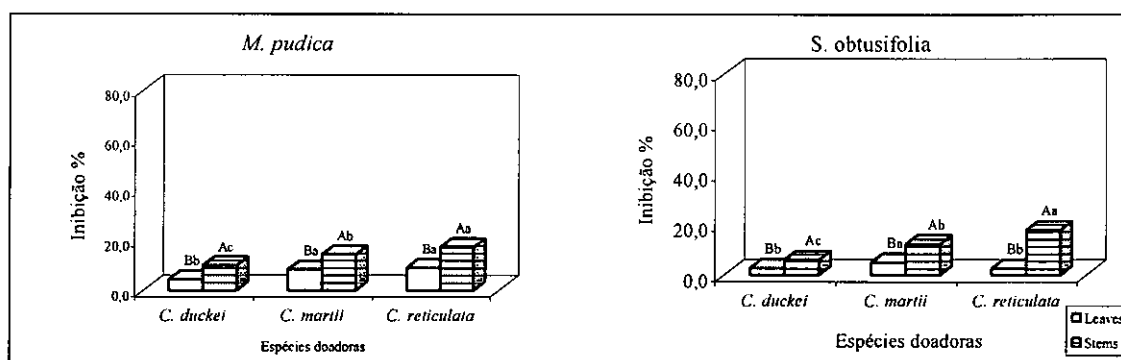


Figura 1. Efeitos dos óleos essenciais de duas frações de plantas, sobre a germinação de sementes de plantas daninhas. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para fração dentro de cada espécie e minúsculas para fração entre espécies não diferem pelo teste de Tukey (5%)

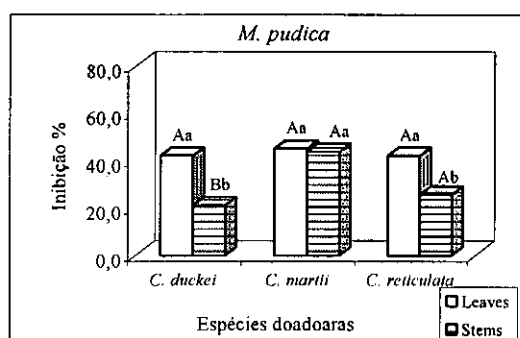


Figura 2. Efeitos dos óleos essenciais de duas frações de plantas, sobre o desenvolvimento da raiz da planta daninha malícia. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para fração dentro de cada espécie e minúsculas para fração entre espécies não diferem pelo teste de Tukey (5%).

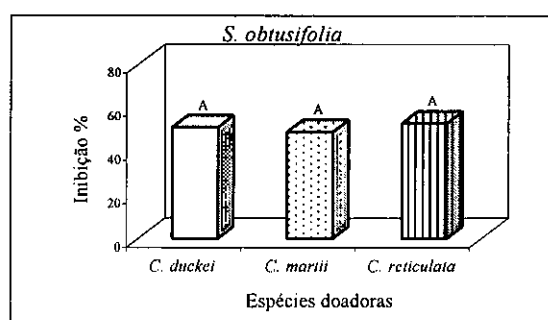


Figura 3. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos de diferentes óleos essenciais de três espécies de *Copaifera*, sobre o desenvolvimento da raiz da planta daninha mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha.

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (5%).

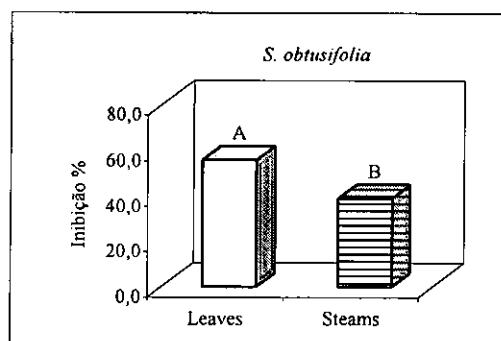


Figura 4. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos de duas frações de três espécies de Copaifera, sobre o desenvolvimento da raiz da planta daninha mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha.

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (5%).

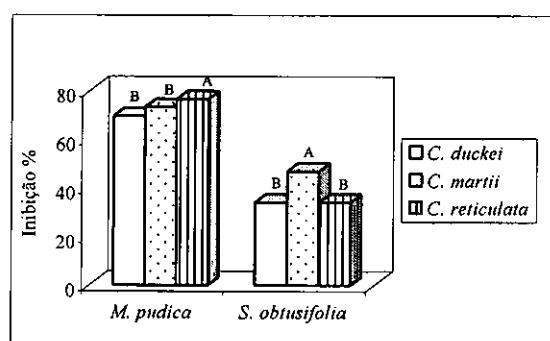


Figura 5. Efeitos alelopáticos dos óleos essenciais de diferentes plantas doadoras, sobre o desenvolvimento do hipocótilo de plantas daninhas. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre espécies, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

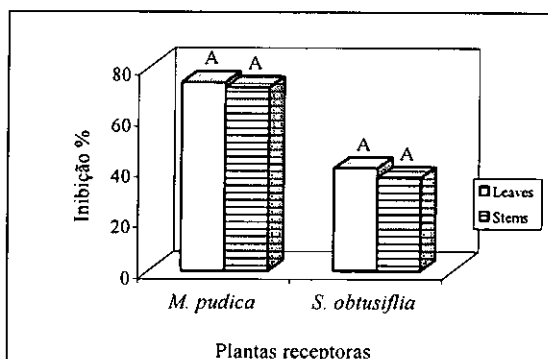


Figura 6. Efeitos alelopáticos dos óleos essenciais de duas frações de plantas doadoras, sobre o desenvolvimento do hipocótilo de plantas daninhas. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Médias seguidas de letras iguais para cada espécie receptora não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Importante ressaltar que algumas características, amplamente divulgadas como taxonomicamente úteis, como as variações morfológicas e distribuição das estruturas secretoras, não são seguras para distinguir as espécies aqui estudadas.

Para as sementes das espécies aqui investigadas, compostos fenólicos e alcalóides, presentes no tegumento e nos cotilédones, respectivamente, são provavelmente as principais substâncias relacionadas à defesa do embrião. Polissacarídeos ácidos, corpos protéicos e lipídicos das células cotiledonares, possivelmente constituem as principais reservas.

Em relação a histoquímica dos limbos foliolares de eófilos e metafilos, observou-se amido, substâncias lipofílicas e pécticas, idioblastos mucilaginosos, fenólicos e cristalíferos, estes últimos localizados ao longo dos feixes vasculares, comum a maioria das Leguminosae.

Mesmo com a presença de compostos fenólicos, foi verificado o crescimento de hifas sobre cutícula de todas as espécies aqui estudadas, no entanto não foi detectado crescimento micelial endógeno nas mesmas.

Com os estudos da atividade alelopática dos óleos essenciais de *C. duckei*, *C. reticulata* e *C. martii*, constatou-se que a intensidade e as variações verificadas se devem mais às fontes (folhas ou galhos) do que à espécie, já que os óleos obtidos das folhas foram mais efetivos na inibição do desenvolvimento da raiz e do hipocótilo, enquanto que os dos galhos promoveram inibição de maior grandeza sobre a germinação das sementes.

O desenvolvimento do hipocótilo foi mais sensível aos efeitos alelopáticos, enquanto que a germinação foi menos afetada.

As diferenças na composição química dos óleos podem explicar, em parte, as diferenças obtidas, especialmente em relação à presença dos componentes δ -cadineno e linalol, moléculas com atividade alelopática já comprovada. Esses resultados conferem à flora Amazônica importância biológica e econômica, na medida em que pode se constituir em importante fonte de moléculas químicas com potencial uso na atividade agrícola.

Estudos de prospecção no que se refere a atividade dos componentes químicos sobre fitopatógenos são quase inexistentes.

Além da elevada taxa de desmatamento, nas áreas onde foi coletado material botânico das espécies aqui estudadas, foi verificado, também, o prejuízo causado pela extração das cascas para fazer chá. Diante deste fato recomenda-se que sejam feitos estudos para avaliar se também o chá dos galhos possuem as mesmas propriedades terapêuticas reputadas ao da casca.

3 CONCLUSÃO

Com este estudo constatou-se que as características morfoanatômicas inerentes às sementes e plantas jovens são efetivamente úteis para separar as espécies estudadas.

Foram observadas várias características que seguramente separam *C. martii* das outras duas espécies estudadas.

Em relação às sementes as características mais conspícuas e úteis, para separar *Copaifera duckei*, *C. martii* de *C. reticulata* foram o padrão da superfície do tegumento predominante punctada nas duas primeiras e microrreticulada na última.

Nos cotilédones foi possível verificar que a superfície da parede periclinal externa é levemente estriada e levemente convexa com depressões em *C. duckei* e, estriada e convexa em *C. reticulata* e em *C. martii*.

Quanto ao eixo embrionário, *C. duckei* apresenta pequeno diâmetro em relação ao seu comprimento, enquanto que os de *C. reticulata* e de *C. martii* são proporcionais. Os eixos de *C. duckei* e de *C. martii* têm base angulosa, ápice truncado e apresentam plúmula rudimentar, havendo, nas respectivas espécies, um e dois relevos na região apical do eixo embrionário; já em *C. reticulata*, a base é angulosa e o ápice irregular, e a plúmula é pouco diferenciada, pois além do relevo no ápice do eixo embrionário há reentrância apical diferenciada.

A principal diferença encontrada entre as plantas jovens destas espécies foi a presença de estípulas foliáceas conspícuas, visíveis a vista desarmada, em *C. reticulata*, ausentes em *C. duckei* e semelhantes a da plântula em *C. martii*, sendo também foliáceas, porém menos conspícuas. As plântulas de *C. martii* apresentam filotaxia alterna, enquanto que nas duas outras é oposta.

Embora outros diferentes atributos tenham sido encontrados em todas as espécies estudadas, foi observado que, conforme aumentava o número de material analisado às características se sobrepunham, exceto as ressaltadas anteriormente.

Eofilos e metafílos de *C. duckei*, *C. martii* e *C. reticulata* apresentaram o mesmo padrão anatômico.

O número de folíolos é um dos caracteres mais seguros para separar *C. duckei* de *C. reticulata* na fase adulta, mas não nas fases de plântulas e plantas jovens.

- Cunha, A.G. da. 1999. *Dicionário histórico das palavras portuguesas de origem tupi*. Brasília: Melhoramentos, 120 pp.
- Dop, P; Gautié, A. 1928. *Manuel of Technique Botanique et Microbie Végétales*. 2.ed. Lamarre editeur, Paris, 594 pp.
- Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M. ; Pereira, B.; Magalhães, P.M. Delarmelina, C. 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14(1)supl:06-08.
- Dudik, N.M. 1981. Morphology of the pods of Leguminales (Fabales). *In*: Polhill, R.M.; Raven, P.H. (Eds.). *Advances in Legumes Systematics*, part. 2. Royal Botanic Garden, England, Kew, Richmond, p. 897-901.
- Duke, J.A. 1965. Keys for the identification of seedlings of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 52(3):314-350.
- Duke, J.A. 1969. On tropical tree seedlings, systems and systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 56(2):135-161.
- Duke, J.A.; Polhill, R.M. 1981. Seedlings of Leguminosae. *In*: Polhill, R.M; Raven, P.H. (Eds). *Advances in Legume Systematics*, part 1. Royal Botanic Garden, England, Kew, Richmond, p 941-949.
- Duram, J.M., Tortosa, M.E. 1985. The effects of mechanical and chemical scarification on germination of charlock (*Sinapsis arvensis* L.) seeds. *Seed Science and Technology*, 13(1): 155-163.
- Embrapa, 2008. www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/control.htm Acesso: 14/12/2008.
- Fahn, A. 1990. *Plant anatomy*. 4th ed. Pergamon Press, Oxford, 302 pp.
- Fernandes, A. 1996. *Compêndio botânico: diversificação-taxionomia*. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 144 pp.
- Ferreira, A.B. de H. 1988. *Novo dicionário da língua portuguesa*. Editora Nova fronteira, Rio de Janeiro. 1498p.
- Font-Quer, P. 1963. *Dicionário de botânica*. Labor .Barcelona: 1244 pp.
- Gahan, P.B. 1984. *Plant histochemistry and citochemistry*. London: Academic Press. 301 pp.
- Garwood, N.C. 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. *In*: Swaine, M.D (Ed). *The Ecology of Tropical Forest Tree Seedlings*. Man and the biosphere series. Department of Plant; Soil Science, University of Aberdeen, UK. 18:59-129.
- Gerlach, D. 1969. *Botanische mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag,.311 pp.
- Gunn, C.R. 1981a. Seeds of Leguminosae. *In*: Polhill, R.M; Raven, P.H. (Eds). *Advances in Legumes Systematics part 2*. Royal Botanic Garden, England, Kew, Richmond, 913-925.

- Gunn, C.R. 1981b. Seed topography in the Fabaceae. *Seed Science ; Technology*, Zürich, 9(3): 737-757.
- Gunn, C.R. 1991. Fruits and seeds of genera in the sub-family Caesalpiinoideae (Fabaceae). U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1755, 408 pp.
- Gurgel, E.S.C.; Silva, M.F.da; Carreira, L.M.M. 2002. Morfologia do fruto, da semente e da plântula de *Calopogonium mucunoides* Desv. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Leguminosae, Papilionoideae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica*, 18(1):37-60.
- Hickey, L. J. 1979. A revised classification of the architecture of dicotyledonous. In: C.R. Metcalfe; Chalk, L. (Eds.). *Anatomy of dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford. p. 25-39.
- Hulin, V.; Mathot, A. G.; Mafart, P.; Dufossé, L. 1998. Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des Aliments*.18:563-582.
- Jensen, W. A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 408 pp.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York. McGraw-Hill. 523 pp.
- Juntilla, O. (1976). Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as effects by temperature during seed development. *Physiologia Plantarum* 29(2): 264-268.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 27:137-138.
- Kraus, J. E.; Arduin, M. 1997. *Manual básico de métodos em Morfologia Vegetal*. Edur, Seropédica. Rio de Janeiro. 198 pp.
- Kuniyoshi, Y.S. 1983. *Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 232 pp.
- Labouriau, L.G. 1983. *A germinação de sementes*. OEA, Washington, 170 pp.
- Langenheim, J.H. 1981. Terpenoids in the Leguminosae. In: Polhill, R.M; Raven, P.H. (Eds). *Advances in Legumes Systematics*, part 1. Royal Botanic Garden, England, Kew, Richmond, 627- 655.
- Lawrence, G.H.M. 1970. *Taxonomy of vascular plants*. New York: The Macmillan Press. 823 pp.
- Lewis G.P.; Mackinder, B.; Lock, M. 2005. *Legume of the world*. Royal Botanic Garden, England, Kew, Richmond, 577 pp.
- Lewis, G.P.; Schrire, B.D. 2003. Leguminosae or Fabaceae? In: Klitgaard, B.B.; Bruneau, A. (Eds.). *Advances in Legumes Systematics: Higher Level Systematics*, part 10. Royal Botanic Garden, England, Kew, Richmond, p. 1-3.

- Lima, H.C. 1990. Tribo Dalbergieae (Leguminosae Papilionoideae): morfologia dos frutos, sementes e plântulas e sua aplicação na sistemática. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 30:1-42.
- Marchiori, J.N.C. 1997. *Dendrologia das angiospermas leguminosas*. Ed. UFSM. Santa Maria, Rio Grande do Sul. p. 11-13.
- Martin, A.C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist*, 36(3):513-660.
- Martins-da-Silva, R.C.V. 2006. *Taxonomia das espécies de Copaifera L. (Leguminosae Caesalpinioideae) ocorrentes na Amazônia brasileira*. Tese de doutorado. Museu Nacional / Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 258 pp.
- Martins-da-Silva, R.C.V. Pereira, J.F.; Lima, H.C. de. 2008. O gênero *Copaifera* (Leguminosae – Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. *Rodriguésia*, 59(3):455-476.
- McCully, M. E. 1970. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 175:702-711.
- Melo, M. da G.G. 2001. *Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de cinco espécies arbóreas utilizadas em Sistemas Agroflorestais na Amazônia*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 111 pp.
- Metcalf, C. R. 1979. The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. In: C.R. Metcalf; L. Chalk (Eds.). *Anatomy of dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press. p 63-75.
- Moreira, F.M.S.; Moreira, F.W. 1996. Características da germinação de sementes de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. *Acta Amazônica*, 26(1-2):3-16.
- Moreira-Coneglian, I.R.; Oliveira, D.M.T. 2006. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). *Revista brasileira de Botânica*, 29(2):193-207.
- O'Brien, T. P.; Feder, N.; McCully, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59:368-373.
- Oliveira, D.M.T. 1997. *Análise morfológica comparativa de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Fabaceae ocorrentes no Estado de São Paulo*. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 212 pp.
- Oliveira, D.M.T. 1999. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. *Revista Brasileira de Botânica*, 22(3):413-427.

- Oliveira, D.M.T. 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Thephrosieae. *Revista brasileira de Botânica*, 24(1):85-97.
- Oliveira, E.C. 1993. Morfologia de plântulas florestais. In: Aguiar, I.B.; Piña-Rodrigues, F.C.M.; Figliola, M.B. (Eds.) *Sementes florestais tropicais*. ABRATES, Brasília, p. 175-214.
- Pijl, L. van der. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. Berlin: Springer-Verlag. 162pp.
- Reigosa, M.J.; Sánchez-Moreiras, A.; González, L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(5):577-608.
- Rizvi, S.J.H., Tahir, M., Kohli, R.K.; Ansari, A. 1999. Allelopathic interactions in agroforestry systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18:773-779.
- Roderjan, C.V. 1983. *Morfologia do estágio juvenil de 24 espécies arbóreas de uma floresta com araucária*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 148 pp.
- Roth, I. 1977. *Fruits of Angiosperms*. Handbuch der Pflanzenanatomie Gebrüder Born-traeger, Berlin, 675 pp.
- Ruzin, S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, New York. 322 pp.
- Shanley, P; Leite, A.; Alechandre, A.; Cleuza Azevedo, J.. 2005. Copaíba. In: Shanley, P; Medina, G (Eds.). *Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica*. CIFOR: IMAZON, Belém, Pará, 200 pp.
- Silva, M.F., Goldman, G.H., Magalhães, F.M.; Moreira, F.W. 1988. Germinação natural de 10 espécies arbóreas da Amazônia - I. *Acta Amazonica* 18:9-26.
- Souza Filho, A.P.S., Alves, S.M. 1998. Efeitos potencialmente alelopáticos e autotóxicos em *Pueraria phaseoloides*. In: *Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de zootecnia* 35, Botucatu, São Paulo, p. 88-89.
- Spjut, R.W. 1994. A systematic treatment of fruit types. *Memoirs of The New York Botanical Garden*, 70:180.
- Statistical Analysis System – SAS. 1989. User's Guide. Version 6.4. ed. Cary: 846 pp.
- Stern, W.T. 1992. *Botanical latin. History, grammar, syntax, terminology and vocabulary*. Ed. Hafner Publishing Company, New York. 566 pp.
- Svensden, A.B.; Verpoorte, R. 1983. *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York. 517 pp.
- Systematics Association Committee for Descriptive Terminology. 1962. Terminology of simple symmetrical plane shapes (chart 1). *Taxon*, 9:104-109.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Iannas, T.; Arsenakis, M. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa*. Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:1739-1745.
- Adams, R.P. 2007. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Pub. Corp., London, 804 pp.
- Barroso, G.M.; Amorim, M.P.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F. 1999. *Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais. 443 pp.
- Boelcke, O. 1946. Estudio morfológico de las semillas de Leguminosae Mimosoideae y Caesalpinoideae de interés agronómico em la Argentina. *Darwiniana*, 7(2):240-321.
- Bozzola, J.J.; Russel, L.D. 1991. *Electron microscopy*. Jones and Bartlett Publishers. Boston. 542 pp.
- Brundett, M. C.; Kendrick, B.; Peterson, C. A. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic e Histochemistry*, 66:111-116.
- Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, 61:255.
- Cascon, V.; Gilbert, B. 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guyanensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, 55:773-778.
- Chamberlain, C. J. 1932. *Methods in plant histology*. 5 ed. Illinois: University of Chicago.
- Cheema, Z. A.; Khaliq, A. 2000. Use of sorghum allelopathic properties to control weeds in irrigated wheat in a semi arid region of Punjab. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 79:105-112.
- Constantin, J. 2001. Métodos de Manejo. In: Oliveira Jr, R.S.; Constantin, J. (Eds.) *Plantas Daninhas e Seu Manejo*. Livraria e Editora Agropecuária Ltda, Guaíba, Rio Grande do Sul. p. 103-121.
- Corner, E.J.H. 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology*, 1:117-150.
- Crestana, C.M.; Beltrati, C.M. 1988. Morfologia e anatomia das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinoideae). *Naturalia*, 13:45-54.