



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

YNGRID HENRIQUE TAVARES DE MELO RODRIGUES

**CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DO IPÊ AMARELO
(*Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose): Morfologia e quantificação de 20-
hidroxiecdisona**

7/15/2013
583.627
R.696

**BELÉM
2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

YNGRID HENRIQUE TAVARES DE MELO RODRIGUES

**CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DO IPÊ AMARELO
(*Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose): Morfologia e quantificação de 20-
hidroxiecdisona**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bioquímica de plantas
Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli

**BELÉM
2013**

Rodrigues, Yngrid Henrique Tavares de Melo

Crescimento e desenvolvimento inicial do ipê amarelo (*handroanthus serratifolius* (vahl) s.o. grose): morfologia e quantificação de 20-hidroxicdisona/Yngrid Henrique Tavares de Melo Rodrigues. Belém, 2013.

51 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2013.

1. Ecdisteróide (ECD) 2. 20-hidroxicdisona (20E) 3. Biodiversidade 4. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) I. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

YNGRID HENRIQUE TAVARES DE MELO RODRIGUES

CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DO IPÊ AMARELO
(*Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose): MORFOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO
DE 20-HIDROXIECDISONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade
Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre em
Agronomia.

Aprovada em 13 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli – Presidente/Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dr.^a Maria do Socorro Padilha de Oliveira – 1º Examinador
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/AMAZÔNIA ORIENTAL

Dr.^a Simone Miranda Rodrigues – 2º Examinador
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/AMAZÔNIA ORIENTAL

Prof.^a Dr.^a Elisa Moura – 3º Examinador
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/AMAZÔNIA ORIENTAL

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por seu amor incondicional, pela fé que me concedeu fazendo com que eu acreditasse que tudo é possível, basta querer e ter fé!

Aos meus pais, Henrique Melo (*in memoriam*) e Maria Ângela, pela criação e principalmente pelo amor eterno, por ensinar como devemos buscar nossos sonhos.

Aos meus irmãos Rachel Rodrigues, André Luiz Rodrigues, minha tia Socorro com suas famílias e aos demais familiares que torceram e oraram bastante pelas minhas conquistas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade para a realização deste curso e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Professor Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli, pela grande oportunidade, ensinamentos, confiança, amizade, pela compreensão, pela competente e exemplar orientação e por acreditar em mim.

Ao Professor Dr. Wagner Campos Otoni pela co-orientação e sua grande receptividade, carinho, brincadeiras e amizade juntos com todos os "LCTs" da UFV em especial Elyabe, Lorena, Cris, Diego, João, Marcia, Maria, Ana, Andrea, Leidy, Anyela, Lili e Elci.

Ao professor Dr. Hugo Alves Pinheiro pela co-orientação, ensinamentos e prestatividade.

Aos membros da banca Dra. Socorro Padilha, Dra. Simone Miranda, Dra. Elisa Moura e Dra. Gisele Barata pela grande colaboração para a melhoria do trabalho, pelos ensinamentos e pela compreensão.

As estagiárias que me ajudaram muito, tanto no trabalho como na força e grande amizade que construímos ao longo desses anos: Ana Karla Pontes e Tassia Takashima.

Ao meu namorado e amigos que estiveram presentes em momentos difíceis, me dando muita força: Eduardo Santana (namorado), Cyntia Almeida, Moara Bandeira, Jackeline Figueira, Suellen Alves, Luma Castro, Nilvan Melo, Sérgio Heitor, Gabriella Tavares e Fabrícia Cabral, eu agradeço verdadeiramente e eternamente!

Aos amigos e colegas da pós-graduação, Rodolfo Santos, Deyvison Medrado, Cristine, Priscila, Jhony, Núbia, Robertinho, Kilma, Katiane, Michel, Gleice por momentos descontraídos e companheirismo na sala de estudos.

Aos técnicos, Rivaldo, Doquinha e Roxo (UFRA) pela ajuda e ensinamentos práticos, Hugo e Eduardo (UFV) pela orientação e amizade durante o período de análise em HPLC.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, sintam-se eternamente agradecidos.

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai (in memoriam),
minha mãe, Rachel e André
(irmãos) e amigos que me
ajudaram em momentos
muito difíceis...*

LISTA DE ABREVIATURAS

E - Ecdisona
ECD - Ecdisteróide
20E - 20-hidroxiecdisona
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
PE - Fitoecdisteróide
ZE - Zooecdisteróide

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Estrutura geral dos ecdisteróides (ECDs) C ₂₇ , C ₂₈ , e C ₂₉	18
Figura 2 – Correlações entre o desenvolvimento e os pulsos de 20E em <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Figura 3 – Biossíntese de ecdisona e 20-hidroxiecdisona em espinafre.	21

CAPÍTULO 01 - CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DO IPÊ AMARELO (*Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose): Morfologia e quantificação de 20-hidroxiecdisona

Figura 4. Etapas da germinação de <i>H. serratifolius</i>	37
Figura 5. Crescimento e desenvolvimento pós-seminal de <i>H. serratifolius</i>	38
Figura 6. Desenvolvimento de plântulas de <i>H. serratifolius</i>	38
Figura 7. Acúmulo de massa seca, percentual de 20E e 20E total em sementes embebidas em água de <i>H. serratifolius</i>	39
Figura 8. Acúmulo de massa seca, percentual de 20E e 20E total nos cotilédones durante o desenvolvimento de <i>H. serratifolius</i>	40
Figura 9. Acúmulo de massa seca, percentual de 20E e 20E total em folhas durante o desenvolvimento de <i>H. serratifolius</i>	42
Figura 10. Acúmulo de massa seca nos epicótilos e/ou caules, percentual de 20E e 20E total durante o desenvolvimento inicial de <i>H. serratifolius</i>	43
Figura 11. Acúmulo de massa seca nas raízes, percentual de 20E e 20E total durante o desenvolvimento inicial de <i>H. serratifolius</i>	44

TABELAS

Tabela 1. Tempo (dias) necessário para a germinação, crescimento e desenvolvimento pós-seminal, plântula e formação de mudas de Ipê amarelo.....	34
Tabela 2. Material vegetal, período de coleta e a quantidade coletada por dia.....	32

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	11
REFERÊNCIAS.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Considerações gerais sobre ipê amarelo.....	16
2.2 Importância econômica do ipê amarelo	16
2.3 Aspectos morfológicos de sementes e plântulas.....	17
2.4 Ecdisteróides	18
2.5 Fitoecdisteróides (pes) e sua importância	20
2.6 Cromatografia líquida de alto desempenho (hplc)	22
2.7 Considerações finais	23
REFERÊNCIAS.....	25
3 CAPÍTULO 01 – CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DO IPÊ AMARELO (<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.O. Grose): MORFOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO DE 20-HIDROXIECDISONA	30
3.1 INTRODUÇÃO.....	30
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.2.1 Material Vegetal	32
3.2.2 Local de execução dos experimentos	32
3.2.3 Tratamento, semeadura e germinação.	33
3.2.4 Coleta dos materiais vegetais (sementes e plântulas).	33
3.2.5 Caracterização morfológica de sementes e plântulas.....	34
3.2.6 Determinação e quantificação de 20-hidroxiecdisona.....	35
3.3 RESULTADO	36
3.3.1 Aspectos morfológicos	36
3.3.2 Morfologia das sementes de <i>H. serratifolius</i>	37
3.3.3 Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de sementes de ipê amarelo	37
3.3.4 Morfologia das plântulas.....	38
3.3.5 Massa seca e teores de 20E em sementes e plântulas de <i>H. serratifolius</i>	39
3.4 DISCUSSÃO.....	44
3.5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49

RESUMO

O hormônio ecdisteroide (ECD) 20-hidroxiecdisona (20E) está presente em todos os artrópodes (zooecdisteróides, ZEs) e em algumas plantas (fitoecdisteróides, PEs). Os ECDs podem apresentar aplicabilidade agroquímica, biotecnológica, medicinal e farmacológica. Com o objetivo de se analisar a presença e os teores do PE 20E durante o crescimento e desenvolvimento inicial do ipê amarelo (*Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose), os aspectos morfológicos foram primeiramente analisados. A caracterização morfológica possibilitou: i) a identificação do núcleo seminífero, radícula, raiz primária, raiz secundária, epicótilo, tegumento, cotilédone, eófilo, folha, caule e raízes e ii) a individualização das diferentes partes da planta. Em seguida, realizou-se a análise espacial e temporal de 20E por meio da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) durante 186 dias após a embebição da semente. As análises cromatográficas do extrato metanólico de sementes não embebidas; sementes embebidas; sementes embebidas apresentando radícula, raiz primária e cotilédones; epicótilos; eófilos; folhas; caules; e, raízes revelou a presença de uma molécula que apresenta o mesmo tempo de retenção de 20E, com exceção dos eófilos. Análise da matéria seca nos diferentes órgãos e da porcentagem desta molécula possibilitou a determinação de seu acúmulo em sementes durante a germinação do embrião, folhas, epicótilos, caules e raízes. Em cotilédones, a quantidade desta molécula decresce atingindo teores não detectáveis. Coletivamente, os resultados demonstram que uma molécula que apresenta o mesmo tempo de retenção de 20E é detectada em ipê amarelo durante seu crescimento e desenvolvimento inicial, sendo acumulada em todos os órgãos analisados, exceto em eófilos. Análises de espectrometria de massas determinarão a identidade precisa desta molécula.

Palavras Chaves: substância de defesa, biossíntese, cromatografia líquida, fitoecdisteróides (PEs).

ABSTRACT

The ecdysteroid (ECD) hormone 20-hydroxyecdysone (20E) is found in all arthropods (Zooecdysteroids, ZES) and some plants (Phytoecdysteroids, PEs). The ECDs may have agrochemical, biotechnology, medical and pharmacological applicability. In order to analyze the presence and levels of PE 20E during growth and early development of yellow ipe (*Handroanthus serratifolius* (Vahl) SO Grose), morphological features were first analyzed. The morphological characterization revealed: i) the identification of the seminiferous nucleus, root, primary root, secondary root, epicotyl, integument, cotyledon, first eophyll, leaf, stem and roots and ii) the individualization of the different plant parts. The 20E spatial and temporal analysis was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) during 186 days after seed imbibition. The HPLC analysis of the methanol extract of seeds, not imbibed; imbibed seeds; imbibed seeds showing radicle, cotyledons and primary root; epicotyl; eophylls; leaves; stems; and roots showed the presence of a molecule that has the same retention time of 20E, except eophylls. Analysis of dry mass in the different organs and the percentage of this molecule allowed determination of its accumulation in seeds during germination of the embryo leaves epicotyl, stems and roots. In cotyledons, the amount of this molecule decreases reaching undetectable levels. Collectively, the results demonstrate that a molecule that has the same 20 retention time was detected in yellow ipe during initial growth and development, and it is accumulated in all organs analyzed except for eophylls. Mass spectrometry analysis will determine the precise identity of this molecule.

Keywords: defense substance, biosynthesis, high performance liquid chromatography (HPLC), phytoecdysteroids (PEs).

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O manejo de insetos praga está enfrentando um grande desafio econômico e ecológico uma vez que a maioria dos pesticidas sintéticos pode representar um grande risco aos humanos e ao ambiente. Uma variedade de novos agentes que controlam insetos foi desenvolvida, muitos com novos mecanismos de ação. A crescente demanda por produtos de origem natural tem se intensificado nas últimas décadas à medida que são amplamente utilizados como compostos biologicamente ativos e está sendo considerada uma importante alternativa para o manejo sustentável de insetos praga na agricultura, pois são biodegradáveis e potencialmente adequados para o uso de programas de gestão integrada (RATTAN, 2010).

É importante ressaltar que o estudo sistemático de plantas envolve conhecimentos em várias áreas, como por exemplo: antropologia, bioquímica, genética, fisiologia vegetal, botânica, química e farmácia, entre outras. O estudo interdisciplinar pode permitir o estudo sistemático de cada espécie, relacionando as condições de cultivo e constituição genética da planta aos fatores que interferem na variação do teor de princípios ativos de interesse biotecnológico. A determinação da dosagem adequada da molécula também está relacionada com a possível toxicidade de algumas espécies (CASTRO et al., 2004).

A utilização intensiva de inseticidas tem grande efeito negativo sobre os recursos naturais (XU et al., 2004), como por exemplo, as populações de insetos que se tornaram resistentes aos inseticidas convencionais (SHELTON et al., 1993; TABASHNIK, 1994), a morte de inimigos naturais, reaparecimento e contaminações ao meio ambiente e homem. Estes fatos são determinantes para se enquadrar medidas contidas no manejo de pragas, dentre elas a utilização de inseticidas botânicos ou mesmo plantas transgênicas (BERENBAUM, 1988; CHIU, 1988; CLOUGH et al., 1994; THACKER, 2002). Algumas alternativas estão sendo estudadas com o objetivo de minimizar o uso inadequado de inseticidas convencionais. Atualmente, o estudo da interação inseto-planta é um tema altamente pesquisado em ecologia química. O desenvolvimento de novos biopesticidas de origem vegetal, envolvendo vários metabólitos secundários de plantas que podem interferir no comportamento, crescimento e desenvolvimento do inseto pode ser uma estratégia para se evitar os efeitos negativos dos inseticidas sintéticos. Moléculas que podem interferir no comportamento, crescimento e desenvolvimento do inseto podem apresentar grande potencial biotecnológico. Dentre

estas moléculas, podem-se citar os fitoecdisteróides (PEs), produzidos por algumas espécies de plantas (DINAN, 2001). Os PEs são moléculas análogas aos hormônios de insetos (ecdisteróides) (LAFONT, 1997).

Por meio de análises de raios-X, descobriu-se a presença de PEs em plantas, levando a várias investigações com o intuito de se conhecer qual a atuação destas moléculas no reino vegetal. Esses hormônios são descritos em menor escala em plantas, algas, cogumelos e alguns fungos (DINAN, 2001; SUN; YASUKAWA, 2008, DINAN et al., 2009). Os PEs representam o produto da biossíntese de terpenos e suas estruturas se diferenciam de acordo com as posições das hidroxilas presentes na estrutura básica dos esteróides (BATHORI; PÓNCRACZ, 2005). Os PEs além de possuírem função agroquímica, apresentam aplicabilidade biotecnológica, medicinal e farmacêutica e podem também estar envolvidos em processos bioquímicos e fisiológicos de plantas (GOLOVATSKAYA, 2004).

As concentrações de PEs são muito superiores do que as concentrações de zooecdisteróides (ZEs) (SVATOS; MACEK, 1994; DINAN, 1995). A natureza essencial dos ZEs em insetos e baixa incidência de PEs em plantas sugerem que os PEs podem agir como substâncias de defesa à herbivoria em plantas que os produzem (DINAN, 2001; GOLOVATSKAYA, 2004; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

O ecdisteróide 20-hidroxiecdisona (20E) é considerado um composto fisiologicamente ativo. O 20E está presente tanto em insetos quanto em plantas (LAFONT; DINAN, 2003; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a). Em insetos, pulsos específicos de 20E são responsáveis pelo processo de muda, desenvolvimento larval e metamorfose (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a). Porém, dependendo de sua concentração, 20E pode afetar o desenvolvimento de atividades metabólicas de algumas espécies de insetos (FRANCISCO; JOSEP 1993; HUANG et al., 2008).

Em plantas, a presença de 20E pode estar associada à defesa contra insetos fitófagos não adaptados, no entanto, ainda não se sabe a função precisa dos PEs em plantas. Supõe-se que os PEs atuem ainda como uma fonte de fitoesteróides poli-hidroxiados, sendo esses necessários para o crescimento e a proliferação celular e ainda podem atuar como compostos fisiologicamente ativos (DINAN, 1995; DINAN 2001; FESTUCCI-BUSELLI, et al., 2008a). Existem poucas informações sobre a ocorrência de 20E em plantas, uma vez que 2% da flora mundial ter sido analisada para a presença de ecdisteróides (ECDs) (DINAN, 2001).

Dentro das espécies cultiváveis, apenas algumas apresentam níveis detectáveis de PEs, tais como *Spinacia oleracea* L. (GREBENOK; ADLER, 1991; GREBENOK et al., 1991). Altas concentrações de 20E foram relatadas durante o desenvolvimento de algumas espécies já caracterizadas, como a *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), muito conhecida como ginseng brasileiro (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008; DE-PARIS et al., 2000). Recentemente, foi identificada a potencial presença de 20E na espécie florestal Ipê amarelo (*Handroanthus serratifolius*) após se analisar 105 espécies distintas (SONSIM, 2012 – dados não publicados). Esta espécie tem ampla distribuição, ocorrendo no Brasil e em muitos países, como Guiana Francesa, Peru e Bolívia. No Brasil, esta espécie pode ser encontrada em várias regiões (FERREIRA et al., 2004).

O ipê amarelo possui interesse econômico, ornamental, medicinal e madeireiro, sendo amplamente empregado em marcenaria, construções e estruturas externas. Devido suas atrativas flores amarelas, é bastante utilizada no paisagismo e em arborizações urbanas (FERREIRA et al., 2004). Além de ser indicada em programas de reflorestamentos (RIZZINI, 1971).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a morfologia e analisar os teores de 20E durante o crescimento e desenvolvimento inicial do ipê-amarelo.

REFERÊNCIAS

- BATHORI, M.; PONGRACZ, Z. Phytoecdysteroids - From isolation to their effects on humans. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p.153-172, 2005.
- BERENBAUM, M.R. North American ethnobotanicals as sources of novel plant-based insecticides. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticide of plant origin**. Washington, DC, American Chemical Society, v.387, p.44-58, 1988.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H. da. MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2 ed. Viçosa: Gráfica Suprema, 113p. 2004.
- CHIU, S-F. Recent advances in research on botanical insecticides in China. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticide of plant origin**. Washington, DC, American Chemical Society. v.387, p.69-77, 1988.
- CLOUGH, J.M.; EVANS, D.A.; FRAINE, P.J.D.; FRASER, T.E.M.; GODFREY, C.R.A.; YOULE, D.; HEDIN, P.A.; MENN, J.J.; HOLLINGWORTH, R.M. **Natural and engineered pest management agents**. Washington, DC. American Chemical Society, v. 53, p.37, 1994.
- DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUECEDO.; IZQUIERDO, I.; RATES, S.M.K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.261-269, 2000.
- DINAN, L.A. strategy for the identification of ecdysteroid receptor agonists and antagonists from plants. **European Journal of Entomology**, v.92, p.271-283, 1995.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v.57, p.325-339, 2001.
- DINAN, L.; HARMATHA, J.; VOLODIN, V.; LAFONT, R. Phytoecdysteroids: Diversity, biosynthesis and distribution. In G. Smaghe Ed. **Ecdysone, structures and functions**, p.3-45, 2009.
- FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo: *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, Manaus, v. 5, 2004.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, v.86, p.978-98, 2008a.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p.305-31, 2008b.
- FRANCISCO, C.; JOSEP, C. Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. **Phytochemistry**, v.32, p.1361-1370, 1993.

- GOLOVATSKAYA, I.F. Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.51, p.407-413, 2004.
- GREBENOK, R.J.; ADLER, J.H. Ecdysteroids distribution during development of spinach. **Phytochemistry** v.30, p.2905-2910, 1991.
- HUANG, Z.; ZHOU, F.C.; XU, D.; AFZAL, M.; BASHIR, M.H.; ALI, S.; FREED, S. Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against *Plutella xylostella*. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.1983-1992, 2008.
- LAFONT, R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.35, p.3-20, 1997.
- LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **Journal of Insect Science**, v.3, p.1-30, 2003.
- RATTAN R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, p. 913-920, 2010.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, p.294, 1971.
- SHELTON, A.M.; WYMAN, J.A.; CUSHING, N.L.; APFELBECK, K.; DENNEHY, T.J.; MAHR, S.; EIGENBRODE, S.D. Insecticide resistance of diamondback moth in North America. **Journal of Economic Entomology** v.86, p.11-19, 1993.
- SONSIM, A.C.S DE. **Bioprospecção de plantas produtoras do ecdisteróide 20-hidroxiecdisona**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.
- SUN, Y.; YASUKAWA, K. New anti-inflammatory ergostane-type ecdysteroids from the sclerotium of *Polyporus umbellatus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.3417-3420, 2008.
- SVATOS, A.; MACEK, T. The rate of ecdysteroid production in suspension cultured cells of the fern *Pteridium aquilinum*. **Phytochemistry**, v.35, p.651-654, 1994.
- THACKER, J.R.M. **An Introduction to arthropod pest control**. Cambridge, Cambridge University, p.360, 2002.
- TABASHNIK, B.E.. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annul Review of Entomology**, v.39, p.7-79, 1994.
- XU, Y.Y.; LIU, T.X.; LEIBEE, G.L.; JONES, W.A. Effects of selected insecticides on *Diadegmainsulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Biocontrol Science and Technology**, v.14, p.713-723, 2004.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE IPÊ AMARELO

A espécie florestal *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose, ocorre na Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname, Venezuela e no Brasil (LORENZI, 2008). Pertencente à família Bignoniaceae, que possui cerca de 750 espécies com distribuição predominantemente tropical, principalmente na América do Sul (MABBERLEY, 1997). É amplamente utilizada na ornamentação e na medicina popular, sua madeira apresenta grande interesse na indústria madeireira (RIBEIRO et al., 1999).

A família Bignoniaceae está entre as dez que apresentam maior diversidade de plantas lenhosas das florestas úmidas da região Neotropical, sendo a segunda família com maior número de espécies após a família Leguminosae (GENTRY, 1986).

A espécie *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose, tem como sinonímia botânica o nome de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson (LORENZI, 2008). No estado do Pará, é conhecida pelos nomes vulgares pau-d'arco-amarelo e ipê amarelo, possui altura aproximada de 8-20 m, com tronco de 60-80 cm de diâmetro, suas folhas são compostas, 5-folioladas e suas flores são amarelas. A espécie é muito frequente na região Amazônica, sua floração ocorre durante os meses de agosto a novembro com a planta totalmente despida de folhagem (LORENZI, 2008).

De acordo com estudos moleculares realizados por Grose e Olmstead (2007), algumas espécies de *Tabebuia* passaram para o gênero *Roseo dendron* Miranda, outras para *Handroanthus* Mattos, e a maioria permaneceu em *Tabebuia*. Dentre essas mudanças, foi estabelecida *Handroanthus ochraceus* (Cham.) Mattos ssp. *Ochraceus* e proposta a nova nomeação *H. serratifolius* (Vahl) S. Grose.

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO IPÊ AMARELO

O Ipê-amarelo possui interesse econômico, madeireiro, ornamental e medicinal. A madeira é empregada em marcenaria, construções e estruturas externas, tanto civis quanto navais. Pois sua madeira é altamente pesada (densidade 1,08 g/cm³), duríssima, difícil de ser serrada, muito durável, sob quaisquer condições sendo muito resistente a apodrecimento quando em contato com o solo, é também classificada como sendo muito

resistente a cupins subterrâneos e apresenta igual resistência a cupins que atacam a madeira seca (LORENZI, 2008).

A árvore é utilizada em paisagismo e arborizações urbanas por causa das suas atrativas flores amarelas (FERREIRA et al., 2004). O seu princípio ativo é o lapachol, uma naftoquinona que está presente tanto nas cascas do caule como na serragem da madeira (MATOS, 2000).

2.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE SEMENTES E PLÂNTULAS

O estudo da morfologia de sementes e das plântulas de espécies florestais contribui para uma melhor compreensão de parte do ciclo vegetativo destas espécies, incluindo a regeneração natural. É de grande utilidade também, no incremento das atividades silviculturais e, no fornecimento das informações para a tecnologia das sementes, como na interpretação correta dos testes de germinação, além de fornecer subsídios para estudos ecológicos bioquímicos e no melhoramento genético (MIRANDA, 1998).

São indispensáveis conhecimentos mínimos sobre as características morfológicas do estágio pós-seminal até a fase em que a parte aérea está desenvolvida, para a compreensão dos mecanismos naturais e do comportamento das espécies, nos diferentes estágios de desenvolvimento (KUNIYOSHI, 1983; RODERJAN, 1983).

A família Bignoniaceae apresenta frutos do tipo cápsula, suas sementes são presas pela base, possuem asas hialinas e núcleo seminífero; os cotilédones apresentam eixo hipocótilo - radícula curto (BARROSO et al., 1999). A germinação é geralmente fanerocotiledonar, com presença de cotilédones estreitos e largamente reniformes (DUKE, 1969).

Souza e Oliveira (2004) diferiram *Tabebuia avellanadae* Lor. Ex Griseb conhecida como ipê roxo, de *T. chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl, conhecida como Ipê-amarelo-cascudo analisando características morfológicas das plântulas, como subsidio para recomposição florestal, uma vez que as espécies possuem características muito semelhantes.

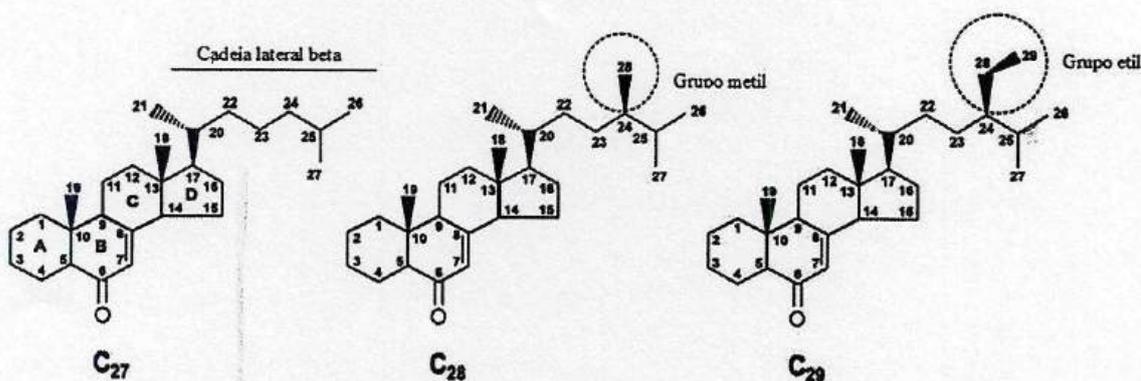
Barroso et al. (1999) afirmaram que sementes dos gêneros *Handroanthus* são mais ou menos estreitas, com núcleo seminíferos ligeiramente curto e com duas alas laterais membráceas, geralmente hialinas e adaptadas.

São poucos os estudos sobre morfologia de frutos, sementes, estágio pós-seminal e plântulas dessa espécie, porém, estes são de grande importância para subsidiar vários estudos, como: bioquímicos, fisiológicos e os de regeneração natural.

2.4 ECDISTERÓIDES

Os ecdisteróides são hormônios pertencentes a uma classe de esteróis (ciclopentano-perhidrofenantreno) que apresentam uma cadeia lateral no carbono 17 (Figura 1) e nas posições C₁₉, C₂₁ e C₂₄ ocorre a clivagem da cadeia lateral (Figura 1) (BATHORI; PONGRACZ, 2005; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008). É necessário que ocorram várias alterações na estrutura do esterol, para que sejam produzidos os ECDs (DINAN, 2001; BÁTHORI; PONCRÁZ, 2005; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a). Esta classe de hormônio está presente em insetos e em poucas plantas e fungos. Quando presentes em insetos são denominados zooecdisteróides (ZEs), porém quando presentes em plantas são chamados de fitoecdisteróides (PEs) e em fungos são denominados de micoecdisteróides que pode ser convertido em hormônio ativo chamado 20-hidroxiedisona (20E) (CHAPMAN, 1988; DINAN, 2001a; DINAN et al., 2009).

Figura 1 – Estrutura geral dos ecdisteróides (ECDs) C₂₇, C₂₈, e C₂₉.



Fonte: Modificado (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008).

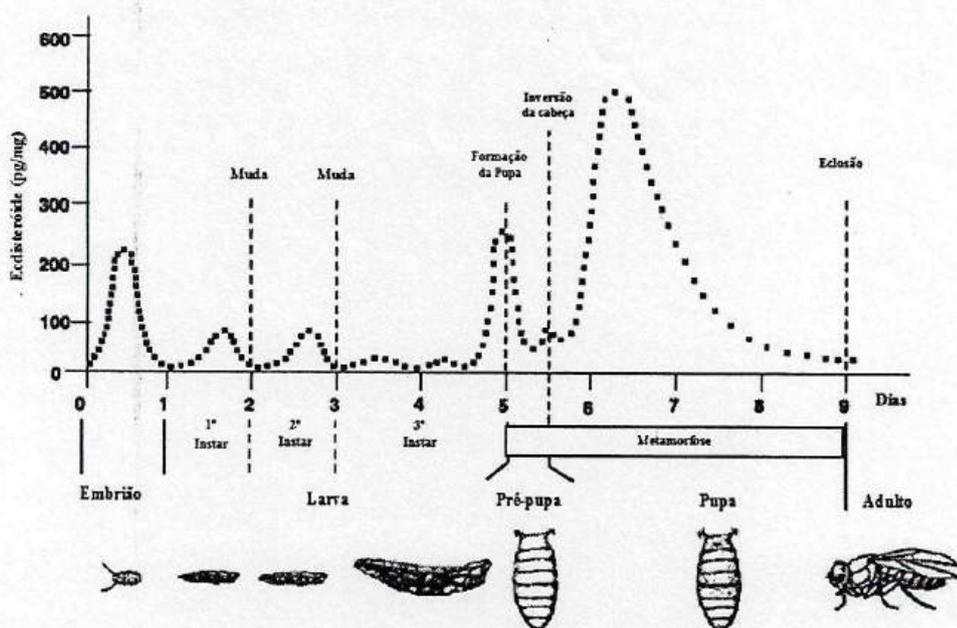
Os pulsos do hormônio 20E são responsáveis em controlar vários processos fisiológicos como a muda, metamorfose, morte celular programada, síntese de cutícula, desenvolvimento embrionário e estágio de pupa, sendo indispensável para a conclusão

do desenvolvimento em artrópodes. Entretanto, pulsos inespecíficos de 20E podem levar o inseto à morte (THUMMEL, 2001; LAFONT; DINAN, 2003; MAKAKA et al., 2002; GILBERT, 2004; GOLOVASTKAYA, 2004; BATHORI; PONGRACZ, 2005).

Para que o inseto se desenvolva é necessário que ocorra a muda que corresponde a uma etapa do crescimento onde há a finalização de uma etapa de desenvolvimento e início da outra. Porém, para que isso aconteça, o inseto precisa de pulsos de 20E, como ilustrado durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* (Figura 2) (THUMMEL, 2001; GILBERT, 2001; GILBERT et al., 2001; GILBERT et al., 2004).

O 20E além de ser conhecido por sua atividade como um hormônio de muda de insetos ele é amplamente utilizado na sericultura na China (CHOU; LU, 1980). Estudos no Japão demonstraram que a utilização de plantas que produzem 20E e usadas como alimentos para bicho-da-seda, aumentaram o rendimento dessa prática Chinesa (NINAGI; MARUYAMA, 1996).

Figura 2 – Correlações entre o desenvolvimento e os pulsos de 20E em *Drosophila melanogaster*. Os processos de desenvolvimento (embriogênese, desenvolvimento larval e metamorfose) são sincronizados por pulsos de ECDs. As transições que ocorrem durante o desenvolvimento são marcadas por linhas tracejadas.



Fonte: Adaptado (THUMMEL, 2001).

2.5 FITOECDISTERÓIDES (PEs) E SUA IMPORTÂNCIA

Os fitoecdisteróides (PEs) são hormônios esteróides produzidos por plantas que interferem na ecdise de insetos (LAFONT, 1997; MARION-POLL; DESCOINS, 2002). Eles são compostos secundários que protegem as plantas contra o ataque de insetos fitófagos (BERGAMASCO; HORN, 1985; CAMPS, 1991; LAFONT, 1997; ADLER; GREBENOK, 1999; MARION-POLL; DESCOINS, 2002). Como evidência, de que os PEs possuem papel de defesa, há indícios de pesquisas mostrando que ocorre acúmulo de PEs após o ataque e lesão de insetos (SCHMELZ et al., 1998; SCHMELZ et al., 1999).

Algumas espécies de plantas produzem PEs, ou seja, os análogos de hormônios esteróides de insetos. Existem evidências que os PEs atuam como defesa química das plantas contra insetos não adaptados (BAKRIM et al., 2008).

A maioria das espécies cultiváveis não acumula PEs. No entanto, tem sido proposto que a maioria das espécies de plantas, ou até mesmo todas, tem a capacidade genética para produzir PEs, porém a via biossintética não está ativa (BAKRIM et al., 2008).

Entre 5-6% das espécies de plantas, incluindo grupos primitivos, como as samambaias contêm quantidades mensuráveis de PEs (DINAN, 1998), sendo sua concentração variável nas espécies analisadas (BLACKFORD; DINAN, 1997; DINAN et al., 1999).

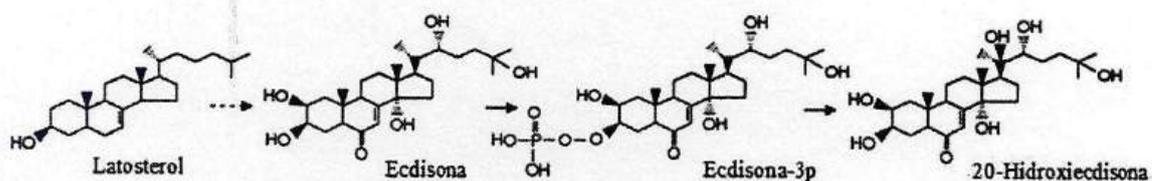
Pfaffia glomerta é uma das espécies já estudadas em que foram detectados níveis de PEs (SHIOBARA et al., 1993). Níveis detectáveis de PEs também foram encontrados em espinafre (*Spinacia oleraceae* L.) (GREBENOK; ADLER, 1991; GREBENOK et al., 1991) e quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) (DINAN, 1995; FESTUCCI-BUSELLI et al., 1998b).

Os esteróis de origem vegetal são triterpenos que incluem um grupo metil ou etil (GOODWIN, 1971). Algumas plantas contêm baixas quantidades de lanosterol (colesterol) e 7-déhidrocolesterol. Estes, por sua vez, não apresentam o grupo etil ou metil (SKILLIAR et al., 2000; SCHAFFER et al., 2001; SCHALLER, 2003; SCHALLER, 2004; RAMADAN et al., 2007). Enquanto que em animais, lanosterol é o precursor de 7-déhidrocolesterol e colesterol (SUZUKI; MURANAKA, 2007).

Na espécie *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), são necessários 24 genes para codificar 12 enzimas que atuam em 11 etapas para síntese cicloartenol e lanosterol a

partir do acetil-CoA (SUZUKI; MURANAKA, 2007). A via biossintética precisa envolvida na produção de PEs é desconhecida (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a). Em espinafre, lanosterol (Figura 3) pode ser precursor direto do 20E (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

Figura 3 – Biossíntese de ecdisona e 20-hidroxiecdisona em espinafre.



Fonte: Adaptado (ADLER; GREBENOK, 1999).

Devido a função precisa dos PEs em plantas ser desconhecida, três hipóteses têm sido propostas para mostrar o seu papel (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a; UHLIK et al., 2008): *i*) compostos fitohormonais (DINAN, 1998; GOLOVATSKAYA, 2004); *ii*) compostos protetores contra insetos fitófagos não adaptados (LAFONT, 1997); e, *iii*) fonte de fitoesteróides requeridos para o crescimento e proliferação celular (MACHACKOVA et al., 1995).

Algumas observações apoiam a primeira hipótese. O 20E, por exemplo, pode afetar a diferenciação somática de embriões em culturas de tecido de alfafa (MACHACKOVA et al., 1995). Pode também atuar como um composto biologicamente ativo, afetando processos morfológicos e fisiológicos em plantas, como por exemplo, o alongamento do coleóptilo, ativação da α -amilase e retardo de folhas amareladas. Processos distintos podem ser regulados diante de diferentes concentrações de 20E (GOLOVATSKAYA, 2004). Efeitos sinérgicos de 20E e ácido indol-3-acético (IAA) são observados no alongamento do coleóptilo (GOLOVATSKAYA, 2004). E de acordo com a segunda hipótese o 20E apresentou ter efeito sinérgico também com fungos entomopatogênicos como a *Isaria fumosorosea*, pois a combinação de ambos melhora a eficácia do controle de *Plutella xylostella*, um inseto que apresenta grandes problemas na agricultura, por ser muito resistente aos agrotóxicos (XU et al., 2011). Poucas evidências apoiam a primeira e a terceira hipótese, sendo a segunda hipótese a mais aceita (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

Algumas características dos PEs permitiriam seu uso como compostos medicinais. Os PEs apresentam baixa toxicidade em mamíferos ($DL_{50} > 6 \text{ g.kg}^{-1}$) e são eliminados rapidamente do organismo. Os PEs não causam hipertensão, não são androgênicos, estrogênicos, antiestrogênico e não induzem a virilização (LAFONT; DINAN, 2003). O 20E pode estimular o crescimento, acelerar cicatrização óssea de fraturas, aumentar a produção de leite, melhorar funções sexuais, estimular a biossíntese de proteínas (anabolismo), estimular a incorporação da glicose em glicogênio e proteína (glicoproteínas), aumentar a utilização da glicose, reduzir a biossíntese do colesterol e aumentar o seu catabolismo, melhorar funções nervosas, estimulam as funções hepáticas e cardíacas, melhoram funções pulmonares, melhoram funções renais, hepáticas e pode ter efeito antioxidante no processo de cicatrização de ferimento e regeneração óssea, sendo o aumento do tamanho e da força muscular o efeito mais conhecido dos fitoecdisteróides em humanos (SLAMA; LAFONT 1995; DINAN 2001; LAFONT; DINAN, 2003; BATHORI; PONGRACZ, 2005; DINAN; LAFONT, 2006; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008).

Levando em consideração a grande importância dos fitoecdisteróides, é essencial o entendimento de suas funções bioquímicas e fisiológicas em plantas, seu papel na interação planta-inseto, assim como seu uso como medicamento (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b).

2.6 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

A cromatografia líquida é um método físico-químico de separação, em que os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária e a outra com um fluido insolúvel, que percola através da primeira. A mistura que contém os componentes a serem separados é dissolvida na fase móvel. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, alguns componentes são fortemente retidos pela fase estacionária e por isso se movem lentamente com o fluxo da fase móvel; enquanto isso, outros componentes interagem fracamente com a fase estacionária, sendo transportados mais facilmente pela fase móvel. Devido a essas diferenças em mobilidade, os componentes da mistura podem ser separados e analisados de forma qualitativa e quantitativa (CÍOLA, 1985).

A técnica de HPLC (High Performance Pressure Liquide Chromatography) que em português significa cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada

pela primeira vez para a determinação de flavonóides em 1976 por Fischer e Wheaton. Esta técnica, em menos de trinta anos passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão relacionadas a sua adaptabilidade, para determinações quantitativas com boa sensibilidade a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (BRUGGINK, 2000).

No entanto a técnica é utilizada para analisar misturas voláteis de alta complexidade, por exemplo, óleos essenciais, inseticidas residuais, gorduras de todas as espécies, açúcares, monômeros entre outros compostos (CÍOLA, 1985). A HPLC emprega um conjunto de equipamentos para efetuar a cromatografia a líquido e se caracterizam por terem os seguintes componentes: 1- Reservatório de sistema de bombeamento da fase móvel; 2- Sistema de introdução da amostra; 3- Sistema analítico (coluna cromatográfica); 4- Sistema de detecção; 5- Sistema de registro e tratamento de dados. O solvente encontrado no reservatório é bombeado com o auxílio da bomba através do sistema de introdução da amostra até a coluna onde ocorre a separação dos componentes da mistura de acordo com a natureza da fase móvel, fase estacionária e a natureza dos componentes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, onde são detectadas alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é transformada em sinal elétrico que é registrado e transformado matematicamente por um processador conveniente e o gráfico obtido se chama cromatograma (CÍOLA, 1985). E através da técnica HPLC que é possível quantificar teores de ecdisteróides como o 20E.

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento da biossíntese de 20E em plantas, onde é encontrado em maiores quantidades do que em insetos, pode fornecer evidências para estudar sua função em plantas que podem ser usadas para aumentar seu teor por meio de engenharia metabólica, ou ainda produzir 20E em espécies de interesse agrônomico, visando o controle de insetos suscetíveis sem o uso de agrotóxicos. Adicionalmente, a comparação das rotas biossintéticas de 20E presente em plantas e insetos pode sinalizar para a elaboração de outras estratégias que visam o controle de insetos que danificam espécies cultiváveis, com possibilidades de estudar os mecanismos de transferência gênica.

Considerando a importância de 20E e a sua ampla aplicabilidade, e a detecção recente na espécie florestal *H. serratifolius*, são necessárias análises que indiquem o início de sua síntese, teor e distribuição na referida espécie.

REFERÊNCIAS

- ADLER, J.H.; GREBENOK, R.J. Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plants. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.253-264, 1999.
- APPLE, R.T.; FRISTROM, J.W.. 20-Hydroxyecdysone is required for, and negatively regulates, transcription of *Drosophila* pupal cuticle protein genes. **Developmental Biology** v.146, p.569-582, 1991
- BAKRIM, A.; MARIA, A.; SAYAH, F.; LAFONT, R.; TAKVORIAN N: Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): Biosynthesis, transport and dregulation of levels. **Plant physiology and biochemistry**.v.46, p.844-854, 2008.
- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, p. 443, 1999.
- BATHORI, M.; PONGRACZ, Z. Phytoecdysteroids - from isolation to their effects on humans. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p.153-172, 2005.
- BERGAMASCO, E.; HORN, D.H.S. Distribution and role of insect hormones in plants. In: Downer, R.G.H., Laufer, H. (Eds.), **Endocrinology of Insects**, Alan R Liss, New York, v. 1. p. 627-654, 1985.
- BLACKFORD, M.; DINAN, L. The effects of ingested ecdysteroid agonists (20-hydroxyecdysone, RH5849 and RH5992) and an ecdysteroid antagonist (cucurbitacin) on larval development of two polyphagous lepidopterans (*Acherontia atropos* and *Lacanobia oleracea*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.83, p.263-276, 1997a.
- BRUGGINK, C. Backgrounds and possibilities for electrochemical detection in conjunction with anion exchange chromatography. In AVH Association - 7th Symposium; Reims; 2000.
- CAMPS, F. Plant ecdysteroids and their interaction with insects. In: Harborne, J.B., Tomas-Barberan, F.A. (Eds.), **Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids**. Clarendon Press, Oxford, p. 331-376, 1991.
- CHAPMAN, R.F. The insect structure and function. New York: **American Elsevier Publishing Company**, p. 132-141, 1998.
- CHOU, W.S.; LU, M.S. Growth regulation and silk production in *Bombyx mori* L. from phylogenous ecdysteroids. In: Hoffmann, J.A. (Ed.), **Developments in Endocrinology**, 7 (Progress in Ecdysone Research). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 281-297, 1980.
- R. CIOLA. **Fundamentos da Cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**, 1ª Ed. São Paulo. ed. Edgard Blucher, 1998.

- DINAN, L.A. strategy for the identification of ecdysteroid receptor agonists and antagonists from plants. **European Journal of Entomology**, v.92, p.271-283, 1995.
- DINAN, L.A strategy towards the elucidation of the contribution made by phytoecdysteroids to the deterrence of invertebrate predators on plants. **Russian Journal of Plant Physiology** v.45, p.296-305, 1998.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v.57, p.325-339, 2001.
- DINAN, L.; LAFONT, R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. **Journal Endocrinology**, v.191, p.1-8, 2006.
- DINAN, L.; HARMATHA, J.; VOLODIN, V.; LAFONT, R. Phytoecdysteroids: Diversity, biosynthesis and distribution. In G. Smagghe Ed. **Ecdysone, structures and functions**, p.3-45, 2009.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, v.86, p.978-98, 2008a.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p.305-31, 2008b.
- FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo: *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, Maaus, v. 5, 2004.
- FRANCISCO, C.; JOSEP, C. Insectal allelochemicals from *Ajuga* plants. **Phytochemistry**, v.32, p.1361-1370, 1993.
- GENTRY, A.H. An overview of neotropical phytogeographic patterns with an emphasis on Amazonia. **An. 1o Simpósio do Trópico Úmido**, v.2, p.19-35, 1986.
- GILBERT, L.I. *Halloween* genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.215, p.1-10, 2004.
- GUITTARD, E. CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis **Developmental Biology**, v.349 p.35-45, 2011.
- GOLOVATSKAYA, I.F. Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.51, p.407-413, 2004.
- GOODWIN, T.W. Biosynthesis of carotenoids and plant triterpenes. **Biochemistry Journal**, v.123, p.293-329, 1971.

GROSE, S. O.; R. G. OLMSTEAD. Evolution of a Charismatic Neotropical Clade: Molecular Phylogeny of *Tabebuia* s. l., *Crescentieae*, and Allied Genera (Bignoniaceae). **Systematic Botany**.v.32, p. 650–659, 2007.

HUANG, Z.; ZHOU, F.C.; XU, D.; AFZAL, M.; BASHIR, M.H.; ALI, S.; FREED, S. Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against *Plutellaxylostella*. **Pakistan Journal of Botany**,v.40, p.1983–1992, 2008.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

KUNIYOSHI, Y.S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. p.232, 1983.

LAFONT, R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.35, p.3-20, 1997.

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **Journal of Insect Science**, v.3, p.1-30, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum v.1, p.368, 2008.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press. p.858, 1997.

MACHAKOVA, I.; VAGNER, M.; SLAMA, K. Comparison between the effects of 20-hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants. **European Journal of Entomology**, v.92, p.309-316, 1995.

MAKAKA, T.; SEINO, A.; TOMITA, S.; FUJUWARA, H.; SONOBE, H. A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.51, p.111-120, 2002.

MARION-POLL, F.; DESCOINS, C. Taste detection of phytoecdysteroids in larvae of *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis* and *Ostrinia nubilalis*, **Journal of Insect Physiology** v.48 p.467–476, 2002.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: UFC, 2. ed., 2000.

MIRANDA, P. R. M. **Morfologia de fruto, semente, germinação e plântula e efeito da temperatura na germinação e viabilidade de sete espécies florestais da Amazônia central**. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, p.119, 1998.

RAMADAN, M.F.; ZAYED, R.; EL-SHAMAY, H. Screening of some solanaceae plants. **Food Chemistry**, v.103, p.885-890, 2007.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VINCENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A. L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M. & PROCÓPIO, L.C. **Flora da reserva Ducke: guia de identificação de plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central.** Manaus, INPA. P.816, 1999.

RODERJAN, C.V. **Morfologia do estágio juvenil de 24 espécies arbóreas de uma floresta com araucária.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. p.148, 1983.

SCHAFFER, A.; BRONNER, R.; BENVENISTE, P.; SCHALLER, H. The ratio of campesterol to sitosterol which modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by sterol methyl transferase. **Journal Plant**.v.25, p.605-615, 2001.

SCHALLER, H. The role of sterol in plant growth and development. **Progress in Lipid Research**, v.42, p.163-175, 2003.

SCHALLER, H. New aspects of sterol biosynthesis in grown and development of higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.465-467, 2004.

SCHMELZ, E.A.; GREBENOK, R.J.; GALBRAITH, D.W.; BOWERS, W.S. Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: A rapid root response involving the octadecanoic acid pathway. **Journal Chemistry Ecology**, v.24, p.339-360, 1998.

SCHMELZ, E.A.; GREBENOK, R.J.; GALBRAITH, D.W.; BOWERS, W.S. Insect-induced synthesis of phytoecdysteroids in spinach, *Spinacia oleracea*. **Journal Chemistry Ecology**, v. 25, p.1739-1757, 1999.

SKILIAR, M.; CURIANO, A.; MILANESI, L.; BENASSATI, S.; BOLOAND, R. *Nicotiana glauca*: another plant species containing vitamin D3 metabolites. **Plant Science**, v.156, p.193-199, 2000

SLAMA, K.; LANFONT, R. Insect hormones - ecdysteroids: Their presence and actions in vertebrates. **European Journal Entomology**, v. 92, p. 355-377, 1995.

SOUZA, L.A.; OLIVEIRA, J.H.G. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellaneade* Lor. ex Griseb e *T. chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. (Bignoniaceae). **Acta Scientiarum** v.26, p. 217-226, 2004.

SUZUKI, M.; MURANAKA, T. Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. **Lipids**, v.42, p. 47-54, 2007.

THUMMEL, C.S. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. **Developmental Cell**, v.18, p.91-99, 2001.

UHLIK, O.; KAMLAR, M.; KOHOUT, L.; JEKER, R.; HARMANHTA, J.; MACEK, T. Affinity chromatography reveals Rubisco as an ecdysteroid-binding protein. **Steroids**, v.73, p.1433-1440, 2008.

XU, D.; ALI, S.; HUANG, Z. Insecticidal activity influence of 20-Hydroxyecdysone on the pathogenicity of *Isaria fumosorosea* against *Plutella xylostella*. **Biological Control**, v. 56, p. 239-244, 2011.

3 CAPÍTULO 01 – CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DO IPÊ AMARELO (*Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose): Morfologia e quantificação de 20-hidroxiecdisona

3.1 INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica tem um terço da biodiversidade do planeta, diversidade que engloba numerosas espécies de vertebrados, invertebrados e flora de múltiplos grupos taxonômicos. Estima-se que só a comunidade de plantas vasculares tenha cerca de quarenta mil espécies, das quais trinta mil são endêmicas (MITTERMEIER et al., 2003). No entanto, a Floresta Amazônica representa a maior floresta tropical úmida do planeta e com a maior diversidade. Mais de 20% de todas as espécies vivas do planeta convivem em harmonia na floresta, sendo 20 mil apenas de espécies vegetais superiores. Estima-se que somente 1% destas espécies passou por algum tipo de estudo químico. Existe, portanto um grande potencial a ser explorado nas plantas da Amazônia. Essas plantas apresentam múltiplas utilidades como plantas ornamentais e podem ser utilizadas para a identificação de fitoquímicos e genes que apresentam aplicabilidade agrônoma, biotecnológica e farmacêutica, assim como podem possibilitar o estudo da interação inseto-planta. Esse tema é atualmente muito estudado em ecologia química, e existem perspectivas interessantes para o desenvolvimento de novos biopesticidas de origem vegetal. Essa interação envolve numerosos metabólitos secundários de plantas que possam interferir no comportamento, crescimento e desenvolvimento de insetos (RHARRABE et al., 2009), como por exemplo, os ecdisteróides (ECDs).

Os ECDs, ecdisona (E) e 20-hidroxiecdisona (20E) são hormônios esteróides encontrados em insetos (ZEs) e plantas (PEs) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b; LAFONT, et al., 2002). São de grande importância, pois eles apresentam aplicabilidade farmacológica, medicinal e biotecnológica, não sendo produzidos por mamíferos. No entanto, quando presente em seu organismo pode apresentar efeito anabólico (BATHORI et al., 2008; DINAN; LAFONT, 2006; GORELICK-FELDMAN et al., 2008; LAFONT; DINAN, 2003). Os PEs são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de plantas (DINAN, 2001). Eles representam os análogos de hormônio ecdisteróides de insetos, que estão envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução de insetos (LAFONT, 1997). Acredita-se que fazem parte de processos de defesas de plantas contra insetos fitófagos (LAFONT, 1997;

ADLER, 1999). Estas moléculas são inócuas para os vertebrados e apresentam um grande potencial no manejo de pragas das culturas (SLAMA; LAFONT, 1995).

A ocorrência de PEs foi examinada em apenas 2% da flora mundial, e nas espécies testadas apenas de 5-6% apresentaram PEs (DINAN et al., 2001). Os PEs foram identificados em plantas como samambaias, gimnospermas e angiospermas, mas poucas espécies vegetais os produzem (DINAN, 1999). Plantas do gênero *Pfaffia* sp., incluindo as espécies *Pfaffia glomerata*, *P. iresinoides* e *P. paniculata* (Amaranthaceae) são usadas como plantas medicinais no Brasil e produzem 20E, tornando essas espécies de grande interesse uma vez que 20E pode apresentar aplicabilidade agrônômica, biotecnológica, farmacológica e até mesmo um importante papel na fisiologia da planta (NETO et al., 2004; MARQUES et al., 2004; NETO et al., 2005, TEIXEIRA et al., 2006).

Os PEs representam, em média, aproximadamente 0,1-0,5 % da matéria seca das plantas analisadas. A presença de 20E em plantas pode estar associada a um mecanismo de defesa, no entanto, pouco se sabe sobre a função precisa dos PEs em plantas. Supõe-se que os PEs podem ser compostos fisiologicamente ativos, ou ainda que forneçam algum tipo de proteção para plantas, ou que podem funcionar como uma fonte de fitoesteróides poli-hidroxiados que são necessários para o crescimento e a proliferação celular (DINAN, 1999; DINAN, 2001; FESTUCCI-BUSELLI, et al., 2008a).

O estudo das espécies vegetais da Amazônia pode fornecer informações sobre a ocorrência e distribuição de 20E em diferentes espécies (BARATA, 2000; VIEIRA, 2005; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a), assim como possibilitar o entendimento dos mecanismos de transferência gênica. Recentemente, foi identificada a potencial presença de 20E na espécie florestal *Handroanthus serratifolius* após se analisar 105 espécies distintas encontradas na região Amazônica (SONSIM, 2012 – dados não publicados). As espécies de ipê (*H. serratifolius*, *Tabebuia chrysotricha* e *T. roseoalba*) são árvores de interesses econômico madeireiro, ornamentais e indicadas em programas de reflorestamentos. O gênero *Tabebuia*, pertencente à família Bignoniaceae e compreende cerca de cem espécies com ampla distribuição desde o México e Antilhas até o Norte da Argentina (RIZZINI, 1971), apresentando flores de diferentes colorações. Os ipês são extremamente ornamentais, e nos últimos anos têm sido utilizados na arborização de ruas e parques e em reflorestamentos destinados à recomposição de vegetação arbórea, e a sua madeira pode ser empregada na construção civil. Embora

seja uma espécie de grande valor, existem poucas informações a respeito de suas sementes (LORENZI, 2008).

A espécie *H. serratifolius* (Vahl) S. Grose, também conhecida como pau d'arco amarelo mede de 8 a 20 metros e com o tronco com 60 – 80 cm de diâmetro, apresenta madeira pesada, durável em várias condições com alburno distinto. É excelente para o paisagismo em geral e já vem sendo largamente utilizado. Planta decídua, heliófita, característica da floresta pluvial densa, é largamente dispersa nas formações secundárias, como capoeiras e capoeirões, porém tanto na mata como na capoeira, prefere solos bem-drenados situados nas encostas. Sua dispersão é geralmente uniforme e sempre muito esparsa. Floresce nos meses de agosto a novembro, e a planta totalmente despida da folhagem. Os frutos amadurecem entre outubro e dezembro (LORENZI, 2008).

Dada à importância de 20E e considerando que recentemente foi detectada sua potencial presença em *H. serratifolius* e levando em consideração que ainda não se sabe se 20E está presente na referida espécie, esse trabalho teve como objetivo analisar o teor e a distribuição de 20E durante o crescimento e desenvolvimento inicial desta espécie, assim como obter informações morfológicas de sementes e do processo de germinação de ipê-amarelo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

As sementes de ipê-amarelo foram adquiridas de matrizes localizadas na Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Campus Universitário, Viçosa – MG, Brasil em novembro de 2011. Os frutos foram coletados e armazenados em temperatura de 5° C.

3.2.2 Local de execução dos experimentos

O experimento foi dividido em três ambientes. O período das atividades que resultaram na germinação foi conduzido no laboratório de Físico-Química, localizado no Centro de Tecnologia Agropecuária (CTA) da universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA – Belém – PA, Brasil). Em seguida as atividades de preparo do

substrato e plantio foram cultivadas em casa de vegetação, no setor de solos da UFRA e o 3º momento que constitui na análise química, foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos II, no BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2.3 Tratamento, semeadura e germinação.

Foram utilizadas aproximadamente 2.500 sementes de ipê amarelo, que foram submetidas a tratamentos para a assepsia superficial com hipoclorito de sódio a 2% durante dois minutos, seguida de lavagens com água destilada para remover os resíduos de acordo com as Regras da Análise de Sementes (RAS). Após assepsia, as sementes foram depositadas em caixas tipo "gerbox" forradas com papel Germitest®, sendo borrifadas diariamente com água destilada para manter a umidade e garantir a embebição das sementes que permaneceram em temperatura controlada entre 20° – 25°C durante oito dias até o aparecimento da raiz primária, momento em que foram realizadas as semeaduras.

As sementes de Ipê amarelo foram plantadas em 110 sacos de polietileno e em 30 bandejas (60x30x10cm) para emissão da parte aérea. Ambos foram preenchidos com substrato constituído de solo, areia, esterco de frango na proporção de 4:1:1. A mistura foi homogeneizada antes do plantio, sendo realizada a correção do solo com calcário, macronutrientes [N (6,40g), P (9,78g), K(5,31g)] e micronutrientes [B (14,44 mg), Mn (73,19mg), Zn (26,08), Mo (1,32mg), Cu (0,08mg)]. As bandejas e sacos de polietileno foram instalados em casa de vegetação, onde as sementes foram semeadas.

3.2.4 Coleta dos materiais vegetais (sementes e plântulas).

Para realização das coletas do material vegetal (sementes, eofilos/folhas, epicótilos/caules, cotilédones e raízes), foi utilizada uma pinça, uma peneira e um firmino. No primeiro dia, antes do semeio foram coletadas sementes não embebidas (controle). Durante oito primeiros dias em laboratório e durante trinta dias em casa de vegetação foram realizadas coletas diárias. Em seguida, também em casa de vegetação, foram realizadas quatro coletas semanais, uma quinzenal e quatro mensais.

No momento em que a espécie começou desenvolver a parte aérea, em média com 19 dias tornando-se plântula, foram realizadas coletas individualizadas de cada órgão vegetativo, resultando 47 coletas em um período de 186 dias. A quantidade de

material retirado por dia de coleta variou entre cinco e setenta indivíduos, devido a diferença de volume e quantidade de material vegetal ofertados pela planta e necessários para a realização das avaliações. Durante as coletas foram retiradas quantidades diferentes de material vegetal (n) por dia (Tabela 1).

Tabela 1. Material vegetal, período de coleta e a quantidade coletada por dia.

Material vegetal	Período de coleta (Dias)	Quantidade de amostras (n)/dia.
Sementes	Controle	50
	1 ^a - 4 ^a	50
	5 ^a - 18 ^a	30
Plântula	19 ^a - 23 ^a	70
	24 ^a	45
	25 ^a - 29 ^a	30
	30 ^a - 32 ^a	25
	33 ^a - 39 ^a	20
Mudas	40 ^a - 42 ^a	15
	43 ^a	10
	44 ^a - 47 ^a	5

3.2.5 Caracterização morfológica de sementes e plântulas

Para a descrição morfológica, foram avaliadas 50 unidades de sementes e plântulas, retiradas aleatoriamente durante seu crescimento e desenvolvimento. As características externas foram observadas ao longo do seu desenvolvimento, de maneira detalhada, com auxílio de uma lupa.

As características morfológicas externas analisadas foram àquelas mais empregadas em estudo de identificação morfológica. Foram utilizadas sementes, isentas de atrofias, injúrias e ataque de insetos e livre de impurezas. Parâmetros como cor, forma, cotilédone, epicótilo e eixo hipocótilo-radícula, foram analisados em sementes.

Durante o desenvolvimento pós-seminal (período compreendido entre o aparecimento do epicótilo até antes da liberação do primeiro par de eófilos), para descrição, foram consideradas as unidades que apresentavam raízes primárias, hipocótilo, epicótilo e cotilédones normais. Esta fase foi acompanhada diariamente e detalhadamente.

Para a descrição morfológica de plântulas, foram selecionadas e avaliadas 50 unidades de plântulas mais vigorosas. Considerou-se plântula quando o primeiro par de eófilos estava totalmente formado (DUKE; POLHILL, 1981)

Foram levados em consideração alguns dos aspectos principais já descritos por Roderjan (1983), como:

- Raiz (principal): forma, cor e pilosidade;
- Epicótilo: forma, cor e presença de estrias.
- Cotilédones: posição, forma e cor.
- Eófilos: forma, cor e pecíolo.

3.2.6 Determinação e quantificação de 20-hidroxiecdisona

Primeiramente, todo material coletado, tanto das sementes e das plântulas devidamente com suas partes seccionadas (eófilos ou folhas, epicótilo ou caule, raízes e cotilédones), foram devidamente identificados e levados a estufa com temperatura variando de 50- 60°C durante 3 dias com ventilação forçada e constante (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008). Após a desidratação, as amostras que apresentaram menores volumes foram maceradas em almofariz de porcelana com pistilo e as maiores quantidades de material e maior volume foram trituradas em moinho tipo Willey. Em seguida, o material foi armazenado em saquinhos de polietileno transparentes, hermeticamente fechados e etiquetados, com o nome da espécie, número da coleta, data da coleta e parte da planta (sementes, eófilos/folhas, epicótilo/caule, cotilédones ou raízes).

Para obtenção do extrato metanólico foram pesados 100 mg de cada parte do vegetal e colocados em tubos Falcon de 10 mL individualmente. Foram adicionados 10 mL de metanol em cada tubo e incubados a 25° C durante 7 dias sob agitação diária em Vortex. Após o período de incubação, a solução foi centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante das amostras foi recolhido e colocado em eppendorfs de 1,5 mL previamente identificados, antes de serem novamente centrifugados a 5.000 rpm por 12 minutos. O sobrenadante de cada amostra e pipetado em tubos vials devidamente identificados.

À determinação e quantificação de 20E presente no extrato metanólico foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008). A análise de 20E foi realizada em aparelho da

marca SHIMADZU SPD-10 AVP equipado com detector ultravioleta (UV), fixado em 245 nm e com coluna Luna C18 (150 X 4,6 mm) e fluxo lento de 0,8 mL/minuto, sendo a pressão da coluna foi 121 Kgf. A fase móvel utilizada consistiu de sistema isocrático com mistura de metanol grau HPLC e água deionizada na proporção (1:1) (v/v). O volume da amostra injetada foi de 20 µL por amostra. O tempo de corrida foi de 25 minutos por amostra.

A curva de calibração foi obtida preparando-se soluções-padrão de 20E (Sigma-Aldrich) em metanol grau HPLC nas concentrações de (5, 10, 20, 40, 60 e 80 ppm). A equação da reta obtida pela curva de calibração foi $Y = 23030x + 16566$, com $R^2 = 0,9983$.

Para amostras que apresentaram o mesmo tempo de retenção que o padrão (20E) foi submetido a uma segunda leitura para confirmação do resultado.

3.3 RESULTADO

Com o objetivo de se caracterizar a espécie *H. serratifolius*, foram avaliados: i) aspectos morfológicos; ii) morfologia das sementes; iii) morfologia do desenvolvimento pós-seminal; e, iv) morfologia das plântulas durante o crescimento e desenvolvimento inicial.

3.3.1 Aspectos morfológicos

Foi possível observar o crescimento e desenvolvimento inicial de Ipê amarelo em diferentes fases de desenvolvimento: germinação, surgimento da raiz primária, crescimento e desenvolvimento pós-seminal e plântulas, n= 50 (Tabela 2).

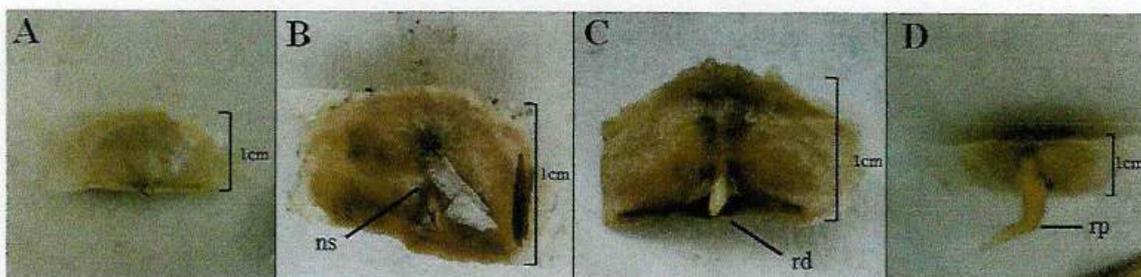
Tabela 2. Tempo (dias) necessário para a germinação, crescimento e desenvolvimento pós-seminal e formação de plântula.

Espécie	Germinação	Crescimento e Desenvolvimento pós-seminal	Plântulas
<i>H. serratifolius</i>	Emissão da radícula	Raiz primária	1º par de eófilo
	3-8 dias	9-18 dias	17-19 dias

3.3.2 Morfologia das sementes de *H. serratifolius*

As sementes de *H. serratifolius* podem ser descritas como aladas; apresentando ápices arredondados, margens aladas; possuem um núcleo seminífero ou eixo seminífero; tegumento membranáceo em tons castanhos e apresentam linha divisória quase negra na fase côncava da semente; embrião cotiledonar, cotilédones planos e carnosos, na cor creme; apresentando radícula exposta, que é inicialmente arredondada, curta, reta, branca amarelada, e rompe o tegumento em média oito dias após o intumescimento da semente e após um dia ocorre o aparecimento da raiz primária (Figura 4).

Figura 4. Etapas da germinação de *H. serratifolius*. A- semente intacta (controle), B- semente embebida após 1 dia, C- semente embebida após 3 dias, D- semente embebida após 8 dias.

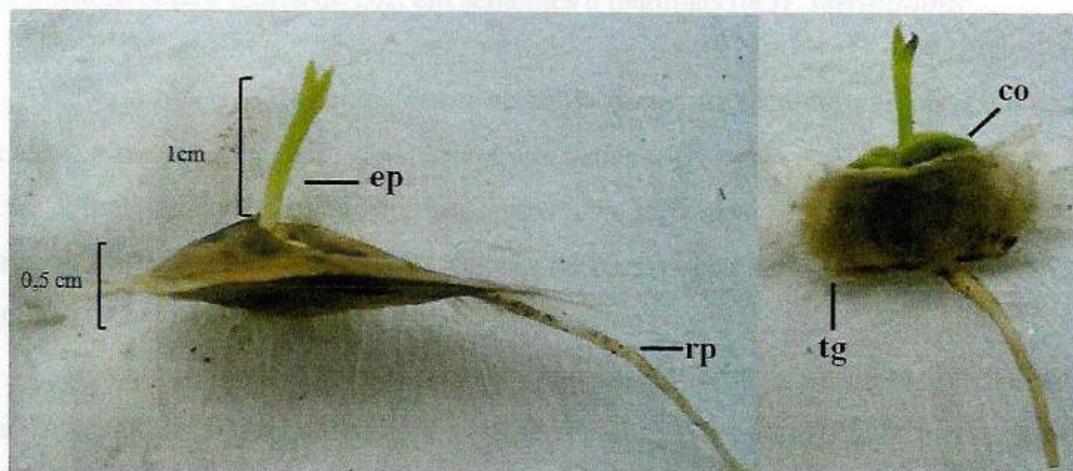


ns- núcleo seminífero, rd- radícula, rp- raiz primária

3.3.3 Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de sementes de ipê amarelo

A germinação é fanerocotiledonar epígea, emergência reta, a radícula quando alongada, torna-se raiz primária cilíndrica, mais fina e mais escura; o hipocótilo é epígeo, verde e curto, cilíndrico, reto e espesso; o epicótilo é reto, longo e verde; o tegumento das sementes que liberaram os cotilédones através do rompimento do ápice continua persistente na plântula (Figura 5).

Figura 5. Crescimento e desenvolvimento pós-seminal de *H. serratifolius*.

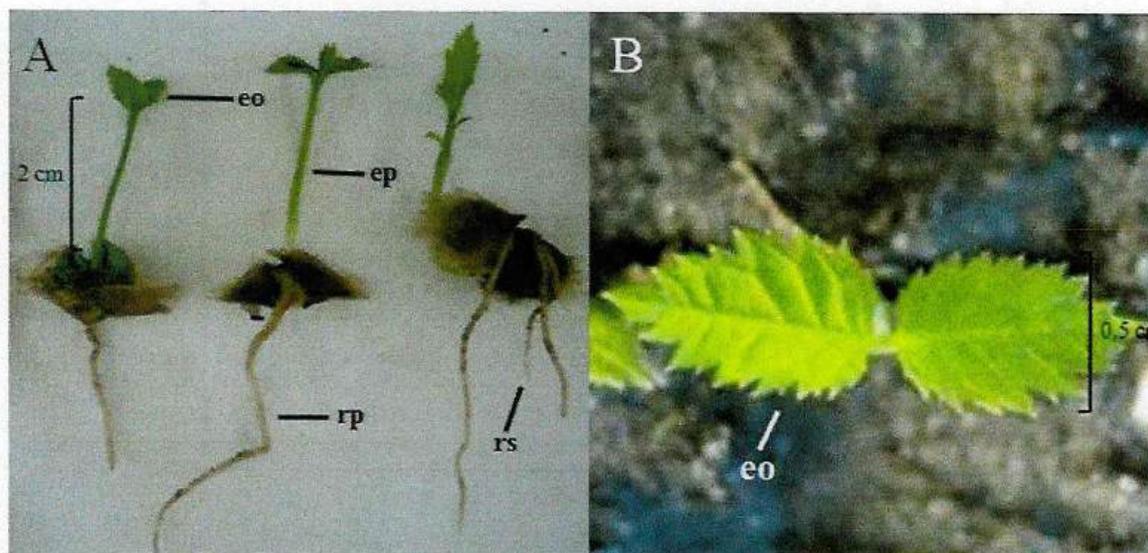


ep- epicótilo, rp- raiz primária, tg- tegumento, co - cotilédone.

3.3.4 Morfologia das plântulas

As plântulas apresentam raiz primária axial cilíndrica reta e sub-herbácea, branca amarelada, mais espessa na base; raízes secundárias brancas amareladas espessas com comprimento semelhante com a raiz principal; hipocótilo epígeo, curto; epicótilo epígeo, cilíndrico, longo reto, herbáceo, verdes com estrias verdes, longitudinais; par de eófilos simples, verdes e opostos, simétricos, ovais, ápice triangular, margem serrada; pecíolo verde, longo, reto com poucos tricomas (Figura 6).

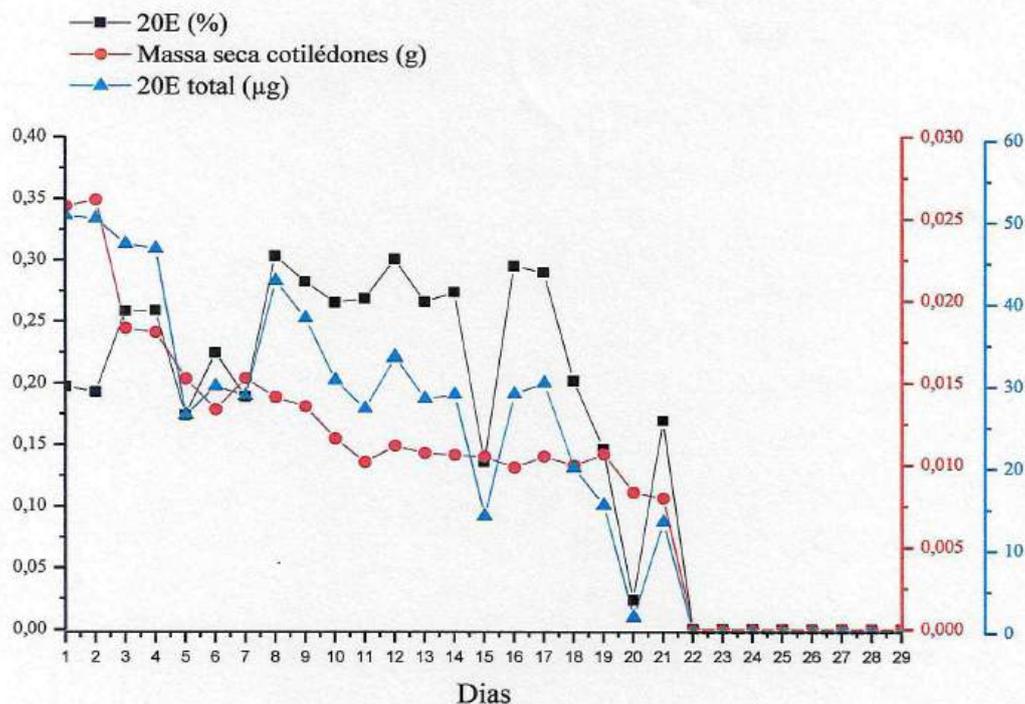
Figura 6. Desenvolvimento de plântulas de *H. serratifolius*.



eo- eófilo, ep- epicótilo, rp- raiz primária, rs- raiz secundária.

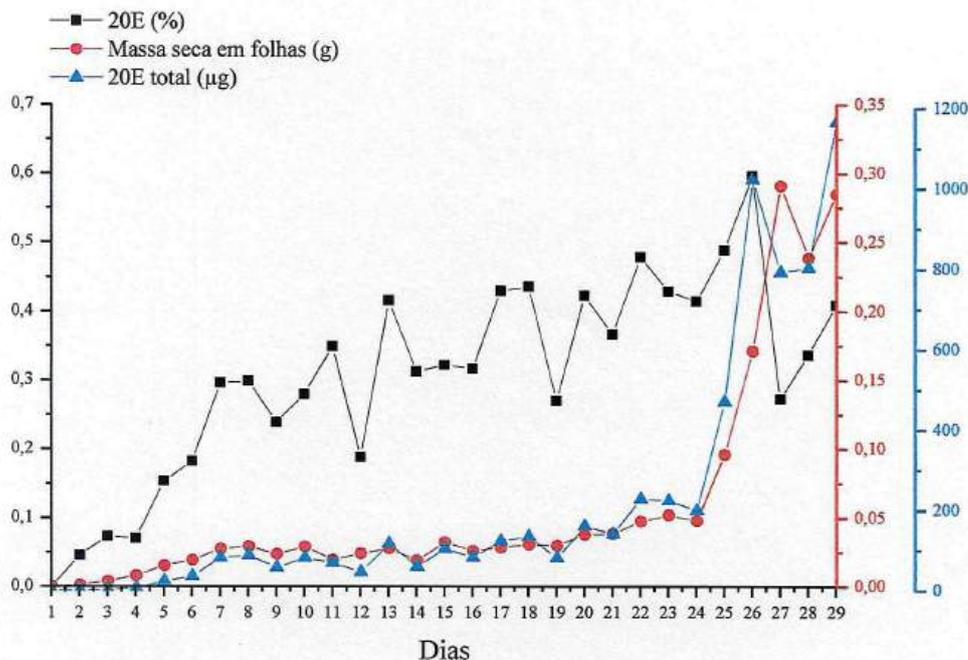
Diferentemente das demais partes da planta; contudo, como esperado, os cotilédones apresentaram teores de massa seca decrescente. Durante as coletas diárias nos 19^o-20^o não ocorreu uma grande variação, enquanto que a partir dos 21^o ao 39^o dias ocorreu um decréscimo significativo da massa seca que variou entre 0,018-0,008 g. No início da coleta semanal, com aproximadamente 46 dias, não foi mais possível visualizar os cotilédones. Como previsto, nos cotilédones os valores encontrados de 20E, reduziram ao longo do desenvolvimento da planta. Inicialmente os cotilédones apresentavam aproximadamente 0,2% de 20E, equivalentes à porcentagem adquirida na última coleta de caule. No entanto, a porcentagem de 20E variou entre 0,303-0,023%, mostrando-se decrescente a medida que os cotilédones estavam sendo degradados. A quantidade de 20E total em cotilédones também se apresentou de maneira decrescente, ocorrendo variação entre 50,97-1,974 μg (Figura 8).

Figura 8. Acúmulo de massa seca, percentual de 20E e 20E total nos cotilédones durante o desenvolvimento de *H. serratifolius* do 19^o ao 39^o dia. Os números correspondem às coletas realizadas após a transferência das plantas para casa de vegetação: n^o 1= 19, n^o 2 = 20, n^o 3 = 21, n^o 4 = 22, n^o 5 = 23, n^o 6 = 24, n^o 7 = 25, n^o 8 = 26, n^o 9 = 27, n^o 10 = 28, n^o 11 = 29, n^o 12 = 30, n^o 13 = 31, n^o 14 = 32, n^o 15 = 33, n^o 16 = 34, n^o 17 = 35, n^o 18 = 36, n^o 19 = 37, n^o 20 = 38, n^o 21 = 39, n^o 22 = 46, n^o 23 = 53, n^o 24 = 60, n^o 25 = 75, n^o 26 = 96, n^o 27 = 125, n^o 28 = 156 e n^o 29 = 186 dias.



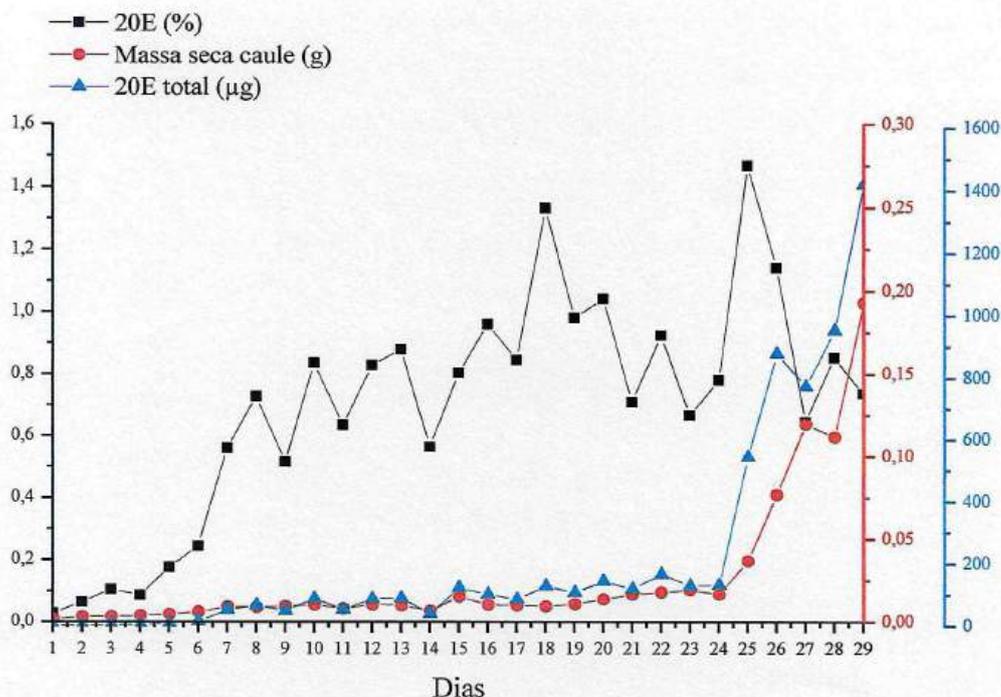
Os dados de massa seca de eófilos e/ou folhas provenientes de sementes de ipê-amarelo durante 19-60 dias foram crescentes, porém a variação foi relativamente baixa, entre 0,0005-0,048 g devido às coletas serem diárias e semanais. No entanto, aos 75º dias, período de coleta quinzenal, houve um aumento significativo até os 186 dias, no teor de massa seca das folhas, variando entre 0,096-0,285g. A porcentagem de 20E e valores de 20E total em folhas de Ipê amarelo tende a aumentar ao longo do crescimento e desenvolvimento inicial da espécie. Inicialmente aos 19 dias ocorreu o aparecimento do primeiro par de eófilo e apenas nessa amostra não foram observados níveis detectáveis de 20E, aos vinte dias surgiu o primeiro par de folhas apresentando aproximadamente 0,04% de 20E por amostra (Figura 9). A porcentagem de 20E apresentou variação com tendência ao aumento durante o crescimento da planta, sendo que aos noventa e seis dias chegou a 0,59% atingindo sua porcentagem máxima durante os dias de coleta. Em 20E total (Figura 9), aos dezenove dias não foi possível visualizar níveis detectáveis do hormônio, e durante os primeiros sessenta dias a quantidade de 20E total variou entre 0-1166,38 µg. Aos setenta e cinco dias, com 471,07 µg, a quantidade de 20E total aumentou significativamente, chegando a 1166,38 µg aos 186 dias, pois as coletas foram realizadas com um maior intervalo de tempo mostrando que quanto maior o crescimento vegetativo, maior será a produção do metabólito secundário.

Figura 9. Acúmulo de massa seca, percentual de 20E e 20E Total em folhas durante o desenvolvimento de *H. serratifolius* entre o 19º ao 186º dia de semeadura. Eófilos coletados apenas no 19º dia, a partir do 20º coletou-se folhas. Os números correspondem às coletas realizadas após a transferência das plantas para casa de vegetação: n° 1 = 19, n° 2 = 20, n° 3 = 21, n° 4 = 22, n° 5 = 23, n° 6 = 24, n° 7 = 25, n° 8 = 26, n° 9 = 27, n° 10 = 28, n° 11 = 29, n° 12 = 30, n° 13 = 31, n° 14 = 32, n° 15 = 33, n° 16 = 34, n° 17 = 35, n° 18 = 36, n° 19 = 37, n° 20 = 38, n° 21 = 39, n° 22 = 46, n° 23 = 53, n° 24 = 60, n° 25 = 75, n° 26 = 96, n° 27 = 125, n° 28 = 156 e n° 29 = 186 dias.



O acúmulo de massa seca em epicótilos e/ou caule (Figura 10), durante o desenvolvimento de *H. serratifolius* apresentou um crescimento maior a partir do 75º dias, resultado semelhante comparado com as folhas. Em caules, a porcentagem de 20E e a quantidade de 20E total apresentaram variação, mostrando valores crescentes no período de coleta (Figura 10). Entre os dias 19-22 houve pouca mudança na porcentagem de 20E, variando entre 0,02-0,08% porém a partir do 23º dia ocorreu um aumento que variou entre 0,17-0,73% durante o período experimental. Em 20E total ocorreu pouca variação nos primeiro 60 dias, atingindo aos 46 dias a quantidade máxima de 166,89 µg. Porém aos setenta e cinco dias ocorreu um aumento significativo, variando entre 543,98-1420,51 µg de 20E total, mostrando um resultado semelhante em folhas, que quanto maior a quantidade de biomassa do vegetal, maior a produção de ecdisteróide.

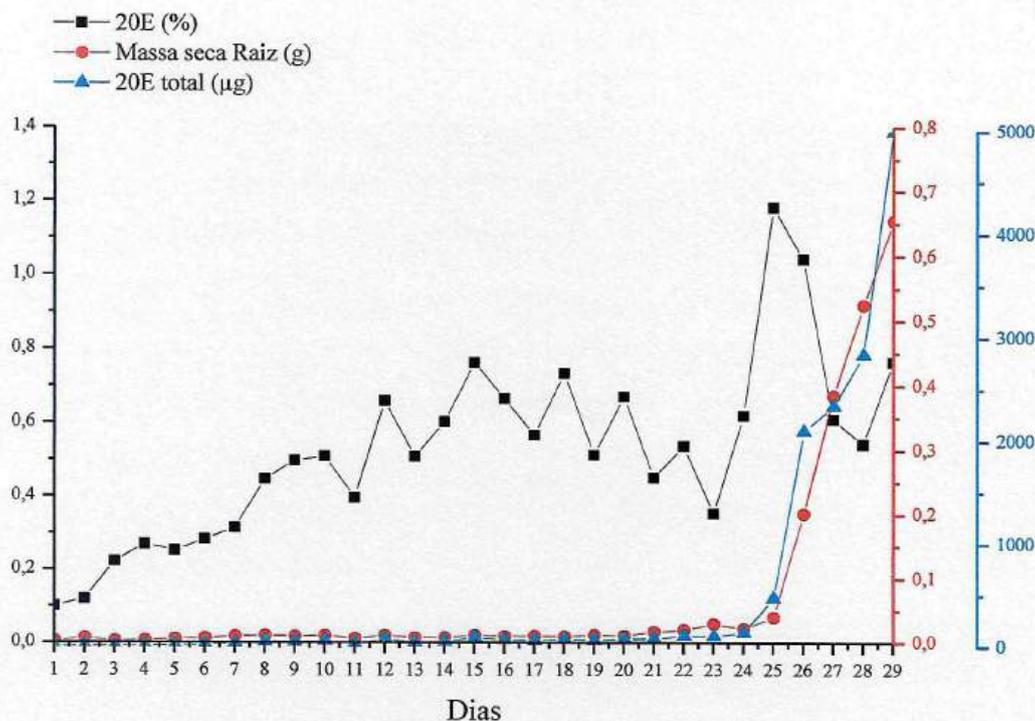
Figura 10. Acúmulo de massa seca nos epicótilos e/ou caules, percentual de 20E e 20E Total durante o desenvolvimento inicial de *H. serratifolius* entre o 19º ao 156º dia de semeadura. Presença de epicótilo do 19º-39º dia, a partir do 46º dia obteve-se os caules. Os números correspondem às coletas realizadas após a transferência das plantas para casa de vegetação: n° 1= 19, n° 2= 20, n° 3= 21, n° 4= 22, n° 5= 23, n° 6= 24, n° 7= 25, n° 8= 26, n° 9= 27, n° 10= 28, n° 11= 29, n° 12= 30, n° 13= 31, n° 14= 32, n° 15= 33, n° 16= 34, n° 17= 35, n° 18= 36, n° 19= 37, n° 20= 38, n° 21= 39, n° 22= 46, n° 23= 53, n° 24= 60, n° 25= 75, n° 26= 96, n° 27= 125, n° 28= 156 e n° 29= 186 dias.



Os teores de massa seca das raízes também se apresentaram crescentes, entre os dias 19º-75º ocorreu pouca variação. Enquanto que do 75º-96º dias, obteve-se um aumento variando de 0,04 a 0,2 g. No período de coleta mensal, a variação dos teores de massa seca foram maiores, devido há um intervalo maior de tempo entre as coletas, aumentando aproximadamente 1 g de massa seca por coleta.

Em raízes, os resultados indicaram que 20E foi detectado em todas as coletas, apresentando valores crescentes e maiores que as demais partes da planta que foram apresentadas (Figura 11). A porcentagem de 20E em raízes durante os primeiros 53 dias apresentou uma variação entre 0,1-0,35% no entanto a partir dos sessenta dias ocorreu um aumento significativo que variou entre 0,62-1,18%. Valores de 20E total apresentaram-se de maneira crescente, no entanto até os 75 dias ocorreram poucas variações chegando a aproximadamente 476,45µg e a partir dos 96 dias ocorreu um aumento com intervalo entre 2099,59 – 4997,45µg (Figura 11).

Figura 11. Acúmulo de massa seca nas raízes, percentual de 20E e 20E Total durante o desenvolvimento inicial de *H. serratifolius* entre o 19º ao 156º dia. Cada número corresponde os dias nº 1= 19, nº 2= 20, nº 3 = 21, nº 4 = 22, nº 5 = 23, nº 6 = 24, nº 7 = 25, nº 8 = 26, nº 9 = 27, nº 10 = 28, nº 11 = 29, nº 12 = 30, nº 13 = 31, nº 14 = 32, nº 15 = 33, nº 16 = 34, nº 17 = 35, nº 18 = 36, nº 19 = 37, nº 20 = 38, nº 21 = 39, nº 22 = 46, nº 23 = 53, nº 24 = 60, nº 25 = 75, nº 26 = 96, nº 27 = 125, nº 28 = 156 e nº 29 = 186 dias.



3.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi relatada a morfologia, assim como a presença de 20E em sementes e plântulas de *H. serratifolius* avaliadas durante o desenvolvimento e crescimento inicial da espécie. As sementes de ipê amarelo eram de cor creme apresentando linha divisória quase negra e o tegumento membranáceo, sua germinação apresentou-se como fanocotiledonar epígea, onde observou-se epicótilo longo, herbáceo e verde e o hipocótilo muito curto, e levemente esverdeado. Os aspectos morfológicos das sementes do presente estudo estão de acordo com as descrições de Gentry (1992) e Duke (1969), quando afirmam que as sementes de *H. serratifolius* possuem forma linear, apresentam linha divisória quase negra e apresentam cotilédones creme, antes da semeadura, e depois de semeados ficam levemente verdes. Gentry (1992) também afirma que o embrião de sementes do gênero *Handroanthus*, é mais largo do que longo e que as sementes da espécie estudada são bi aladas, com alas hialinas e membranáceas. Lavareda (2008) verificou que a germinação de *H. serratifolius* é fanocotiledonar epígea, emergência reta e que a radícula rompe o tegumento abaixo da região hilar em

media oito dias após o intumescimento sendo sua aparência inicialmente arredondada, curta reta, branca e amarelada. Ferreira (2000) descreveu que a raiz axial e os cotilédones são reniformes, que mostraram ser semelhante à espécie *Tabebuia caraiba* também conhecida como Ipê amarelo.

Souza e Oliveira (2004) descreveram as plântulas de *Tabebuia avellanadae* Lor. ex Griseb outra espécie conhecida como Ipê amarelo como fanerocotiledonares epígeas apresentando cotilédones foliáceos e peciolados, com dois eófilos simples, porém a margem não é serreada, diferenciando-se de *H. serratifolius*.

Analisando a massa seca de sementes embebidas e não embebidas foi possível perceber que as sementes, mesmo estando dormentes, embebem ou reidratam quando colocadas em contato direto com a água ou quando expostas em ambiente com alta temperatura e umidade relativa (BEWLEY; BLACK, 1994). No entanto, os dados apresentados mostram que ocorreu variação dos valores de massa seca, indicando que vários compostos estavam sendo sintetizados e degradados simultaneamente. Sendo assim existe relação direta entre a velocidade de hidratação das sementes e a temperatura. De acordo com Carneiro e Braccini (1996), a elevação da temperatura aumenta a energia da água, provocando elevação da sua pressão de difusão. Paralelamente, as atividades metabólicas são também aumentadas, o que diminui o potencial interno, propiciando maior absorção de água. Por ser um processo físico, a hidratação ocorre mais rapidamente em temperaturas elevadas (NOBREGA; RODRIGUES, 1995).

Nesse estudo, os valores de massa seca em folhas, caules e raízes apresentaram-se crescentes, pois após o período de germinação das sementes o embrião quebra seu estado de dormência e pela mobilização das reservas armazenadas, a plântula começa o período de crescimento vegetativo, sendo possível a visualização da parte aérea do vegetal. Em seguida, as plantas respondem a uma combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo tamanho, temperatura e fotoperíodo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os teores crescentes de massa seca nas raízes estão de acordo, pois elas são adaptadas a crescer através do solo, onde absorvem água e nutrientes minerais. As células produzidas pelo meristema apical da raiz dividem-se, diferenciam-se e alongam-se, à medida que se distanciam do ápice, de modo muito semelhante às suas correspondentes no caule. Porém, ao contrário do caule, a região da raiz onde se formam ramificações é bem separada do ápice. As raízes laterais se formam somente após a completa extensão celular na zona de alongamento, isso explica por que os

valores de massa seca inicialmente, tanto em caule como em raízes, são muito próximos.

No início da coleta semanal, com aproximadamente 46 dias, não foi mais possível visualizar os cotilédones. Essa resposta é devido à capacidade que a planta tem em mobilizar inicialmente reservas em seus cotilédones, construindo sua forma rudimentar, posteriormente ocorre o desenvolvimento da parte aérea (caules e folhas), a plântula torna-se fotossinteticamente capaz, possibilitando o crescimento vegetativo subsequente. Dessa forma, os cotilédones são naturalmente descartados (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os teores de 20E em sementes, folhas, caules e raízes aumentaram durante o desenvolvimento e crescimento inicial, diferentemente dos cotilédones que se mostrou decrescente em *H. serratifolius*. De acordo com os resultados de Savchenko, (2001) utilizando sementes da esp *Lamium* spp espécies assim como o Ipê, cultivar perene, também detectaram a presença de fitoecdisteróides em todas as amostras. No entanto os níveis eram baixos na espécie *L. álbum*, *L. galeobdolon* e *L. purpureum*. Sementes de *L. maculatum* continham níveis moderados de 20E, em uma das amostras analisadas apresentou 0,1 mg. Um conjunto de 20 sementes de *Spinacia oleracea* L., conhecida como espinafre, foram analisadas individualmente o conteúdo de PEs, e a quantidade de 20E em média foi estimada em $14 \pm 1 \mu\text{g}$ por semente e a concentração média de $976 \pm 57 \mu\text{g}$ de 20E (BAKRIM, 2008). Resultados semelhantes já foram relatados anteriormente por Dinan, (1995).

Neste trabalho, com exceção dos eófilos, as demais folhas apresentaram níveis crescentes de 20E, resultado semelhante observado por Festucci-Buselli et al. (2008), que visualizou em folhas da espécie *P. glomerata* durante os primeiros cento e vinte dias o percentual de 20E reduziu de 0,5% para aproximadamente 0,2% e após esses quatro meses a porcentagem de 20E aumentou chegando a 0,4% aos duzentos e dez dias, no entanto revelou que ocorreu pouca variação na quantidade total de 20E. Em espinafre, 20E pode ser biossintetizado em folhas mais velhas e também translocados para as folhas onde pode ser acumulado (BAKRIM et al., 2008). Estudos com folhas jovens e mais velhas da espécie *L. álbum*, revelou que a presença de ecdisteróides foi mais elevada nas folhas jovens, sugerindo que esses resultados, nas partes vegetativas mais jovens podem ser mais vulneráveis ao ataque de insetos e por isso contém níveis mais altos de ecdisteróides, sendo assim, apoiando que os fitoecdisteróides atuam como um mecanismo de defesa contra a predação de insetos (SAVCHENKO, 2001). Este

padrão de distribuição é semelhante com estudos com *Chenopodium album* encontrado anteriormente (DINAN, 1992).

Estudo como o de Festucci-Buselli (2008), mostrou que de 120-210 dias de desenvolvimento de *P. glomerata* ocorreu um acúmulo de massa seca, porém a porcentagem de 20E inicialmente foi reduzida e mantiveram-se níveis constantes mostrando apenas uma pequena variação. Diferente com o Ipê amarelo que mostrou níveis crescentes tanto em valores de porcentagem de 20E quanto quantidade total de 20E.

A distribuição de 20E no corpo vegetal do ipê amarelo mostrou maior acúmulo do metabólito nas raízes resultados também observados em *P. glomerata* observados por Festucci-Buselli et al. (2008). Em estudos com *Spinacia oleracea* L. observou baixas concentrações em raízes e maiores concentrações em folhas (BAKRIM et al., 2008). Contudo pode-se perceber neste estudo que as concentrações de 20E nas raízes são diretamente proporcionais ao teor de massa seca.

Já nos cotilédones os teores do hormônio diminuíram com o tempo, pois eles tendem a ser degradados, sendo assim, sua energia armazenada é consumida para a produção de inúmeros compostos e os gráficos demonstraram que ocorre uma redução na quantidade de hormônio ao longo do desenvolvimento, e em determinado momento, todos os cotilédones já haviam sido degradados. Estudo como de Grebenok e Adler (1991), visualizaram em *Spinacia oleracea* que nas primeiras coletas da espécie os cotilédones apresentam maior biomassa, mas as concentrações de 20E em cotilédones foram mais baixas em relação às folhas, semelhante a este resultado, foi observado por Bakrim et al. (2008) onde os cotilédones de *Spinacia oleracea* L. apresentaram baixas concentrações de 20E enquanto que em folhas aumentou, demonstrando que o 20E é continuamente redistribuído se movendo para as outras regiões das plantas.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que 20E foi consistentemente detectado em todos os órgãos analisados, sendo acumulado em folhas caules e raízes; contudo, apenas nos eófilos ocorreu uma exceção, não sendo observados níveis detectáveis de 20E.

REFERÊNCIAS

- BARRIN, A.; MARILIA, A.; SAYAN, F.; LAFONT, R.; TAKVORIAN, N. Ecdysteroids in spruce (*Spizocya alberta* L.): Biosynthesis, transport and regulation of levels, *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 244-254, 2012.
- BOWLEY, J.D.; BLACK, M. Seed physiology of development and germination. 2nd. New York: Prentice Hall, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Manual para análise de sementes. Brasília, p. 399, 2009.
- CYRIL, W.S.; LUDWIG, S. Growth regulation and silk production in *Bombyx mori* L. from prothoracic ecdysteroids. In: Hoffmann, J.A. (Ed.). *Development in Entomology*, 7 (Progress in Ecdysozoan Research). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 271-297, 1980.
- DINAN, L. Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of the species of the *Chenopodiaceae*. *European Journal Entomology*, v. 92, p. 275-303, 1995.
- DINAN, L.; SAVCHENKO, T.; WHITING, E.; SARKER, S.D. Plant natural products as insect steroid receptor agonists and antagonists. *Pesticide Science*, v. 55, p. 331-335, 1999.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry*, v. 57, p. 315-339, 2001.
- DINAN, L.; LAFONT, R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *Journal Entomology*, v. 101, p. 1-5, 2006.
- DUKE, J.A. On the plant life cycle, systems and cytogenetics. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, v. 56, p. 135-161, 1969.
- DUKE, J.A.; POHILL, R.M. Seedling of Leguminosae. In: POHILL, R.M. & RAVEN, P.H., *Advances in Legume Systematics*. England, Royal Bot. Garden, New Richmond, Surrey, 29, 941-946, 1981.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.

FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo: *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, Maaus, v. 5, 2004.

FRANCISCO, C.; JOSEP, C. Insectal chemicals from *Ajuga plants*. **Phytochemistry** v.32, p.1361-1370, 1993.

GENTRY, A.H. An overview of neotropical phytogeographic patterns with an emphasis on Amazonia. **An. 1o Simpósio do Trópico Úmido**, 2, p.19-35, 1986.

GENTRY, A. H. **Flora Neotropica – Monograph 25 (II). Bignoniaceae – parte II (Tribe Tecomeae)**. New York: Published for Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Garden. 1992.

J. GORELICK-FELDMAN, D.; MACLEAN, N.; ILIC, A. POULEV, M.A.; LILA, D.; CHENG, I. RASKIN, Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells, **Journal Agricultural Food and Chemistry**, v.56, p. 3532-3537, 2008.

HUANG, Z.; ZHOU, F.C.; XU, D.; AFZAL, M.; BASHIR, M.H.; ALI, S.; FREED, S. Antifeed ant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against *Plutella xylostella*. **Pakistan Journal of Botany** v.40, p.1983-1992, 2008.

LAFONT, R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.35, p.3-20, 1997.

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **Journal of Insect Science**, v.3, p.1-30, 2003.

LAVAREDA, H. R.. Caracterização morfológica de fruto, semente, desenvolvimento pós-seminal e plântula, como subsidio a taxonomia. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural da Amazônia/ Museu Paraense Emílio Goeldi, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum v.1, p.368, 2008.

MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; ESPÍNOLA, E.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.L.A. Psychopharmacological asses sment of *Pfaffia glomerata* roots (Extract BNT-08) in Rodents. **Phytotherapy Research**, v.18, p.566-572, 2004.

MITTERMEIER, R. A. *et al.* Wilderness and Biodiversity Conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n.18, p. 10309-10313, 2003.

NETO, A.G.; DA SILVA FILHO, A.A.; COSTA, J.M.LC.; VINHOLIS, A.H.C.; SOUZA, G.H.B.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. **Phytomedicine**, v.11, p.662-665, 2004.

NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C.C.; VINHOLIS, A.H.C.; POSSEBOM L.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96. p.87-91, 2005.

NOBREGA, L.H.P.; RODRIGUES, T.J.P. Efeitos do estresse hídrico sobre a absorção de água durante a germinação de sementes e o estabelecimento de plântulas de soja. **Informativo ABRATES**, Pelotas v.5, n.1, p.51-8, 1995.

SLAMA, K.; LANFONT, R. Insect hormones-ecdysteroides: Their presence and actions in vertebrates. **European Journal Entomology**. v. 92, p. 355-377, 1995.

RHARRABE, K.; BOUAYAD, N.; SAYAH, F. Effects of ingested 20-hydroxyecdysone on development and midgut epithelial cells of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) **Pesticide Biochemistry and Physiology** v.93, p. 112-119, 2009.

SONSIM, A.C.S DE. **Bioprospecção de plantas produtoras do ecdisteróide 20-hidroxiecdisona**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

SOUZA, L. A. DE; OLIVEIRA, J. H. G. de. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanedae* Lor. ExGriseb e *T. chrysotricha* (Mart. Ex Dc.) Standl.(Bignoniaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá. v.26, n°2, p. 217-226, 2004.

SOUZA, G. L. F. M.; RIBEIRO, M. C. C.; CARDOSO, E. A.; PIRES, G. S.; SOUZA, P. A. Efeito da época de poda do sistema radicular no crescimento de mudas dealgarobeira. **Caatinga**, Mossoró, v.19, n.3, p.250-254, julho/setembro 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

SAVCHENKO, T.; BLACKFORD, M.; SATYAJIT, D.; DINAN, L. Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: identification and distribution within plants. **Biochemical Systematics Ecology**, v. 29, p. 891-900, 2001.