



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANA CAROLINA SONSIM DE OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS PRODUTORAS DO ECDISTERÓIDE
20-HIDROXIECDISONA**

**BELÉM
2012**



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

ANA CAROLINA SONSIM DE OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS PRODUTORAS DO ECDISTERÓIDE
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.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli

**BELÉM
2012**

Oliveira, Ana Carolina Sonsim de

Bioprospecção de plantas produtoras do ecdisteróide 20-hidroxiecdisona. / Ana Carolina Sonsim de Oliveira. Belém, 2012.

57 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

1. Ecdisteróide (ECD) 2. 20-hidroxiecdisona (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

ANA CAROLINA SONSIM DE OLIVEIRA

BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS PRODUTORAS DO ECDISTERÓIDE
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.

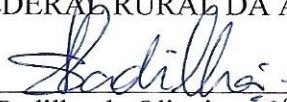
Aprovada em 13 de Fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dra. Gisele Barata da Silva – 1º Examinadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA


Prof. Dr. Wilson José de Mello e Silva Maia – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA


Dra. Maria do Socorro Padilha de Oliveira – 3º Examinadora
EMBRAPA/CPATU

DEDICATÓRIA

*“... Aos meus pais, Paulo Sergio e Maria
Luísa, ao meu noivo André Ricardo e minha irmã
Thaís, os principais incentivadores para a
realização deste trabalho...”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar todos os meus dias dando-me sabedoria e força para caminhar sem fraquejar mediando as pedras no caminho;

Aos meus pais, Paulo Sérgio e Maria Luísa, pelo amor incondicional, educação e apoio nas minhas escolhas;

Ao meu noivo, André Ricardo, pela sua compreensão, amor, apoio incondicional durante todos os momentos difíceis;

Ao programa de pós-graduação em Agronomia pela oportunidade para realização deste curso;

Ao meu orientador, Professor Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli, pela oportunidade, acessibilidade, competente orientação e paciência com as minhas imensas e infindáveis dúvidas;

Ao Professor Dr. Wagner Campos Otoni pela co-orientação e por me receber em seu laboratório na UFV;

Aos professores Dra. Maria Catarina M. Kasuya e Dr. Hilário Mantovani, do Departamento de Microbiologia, e a Profa. Dra. Nilda F. Soares, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela possibilidade de uso do HPLC em seus respectivos laboratórios;

Ao professor Dr. Hugo Alves Pinheiro pela co-orientação;

Aos membros da banca Gisele Barata da Silva, Wilson José de Mello e Silva Maia, Maria do Socorro Padilha de Oliveira e Paulo Roberto Silva Farias por dedicarem seu tempo em me avaliar;

Às amigas Hadrielle Karina, Thaíssa de Paula e Karen Luz pela amizade, companheirismo e pela grande capacidade de me fazerem sorrir sempre;

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

Obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

E - Ecdisona

ECD - Ecdisteróide

20E - 20-hidroxiecdisona

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

PE - Fitoecdisteróide

ZE - Zooecdisteróide

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Famílias, gêneros e espécies avaliadas para a potencial presença de 20-hidroxicdisona	33
Tabela 2. Famílias estudadas presentes no Ecdybase e os compostos produzidos por cada espécie	36
Tabela 3. Famílias de plantas estudadas presentes no Ecdybase e número de espécies produtores de ecdisteróides por família.....	40
Tabela 4. Famílias de plantas estudadas ausentes no Ecdybase.....	40

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Representação estrutural de ecdisona (A), 20-hidroxiectdisona (B) e 24 - epibrassinolídeo (C)..... 17
- Figura 2.** Estrutura dos ecdisteróides (ECDs) apresentando cadeia lateral C27, C28, e C29..... 18
- Figura 3.** Correlações entre o desenvolvimento e pulsos de 20-hidroxiectdisona em *Drosophila melanogaster*..... 20
- Figura 4.** Biossíntese de ecdisona e 20-hidroxiectdisona em espinafre..... 21

CAPÍTULO 01 - BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS PRODUTORAS DO ECDISTERÓIDE 20-HIDROXIECDISONA

- Figura 1.** Tempo de retenção (em minutos) do padrão de 20-hidroxiectdisona obtido por meio de HPLC..... 42
- Figura 2.** Detecção de 20-hidroxiectdisona em *Sida rhombifolia* L. realizada por meio de HPLC (Shimadzu-Sil 10 AF)..... 43
- Figura 3.** Detecção de 20-hidroxiectdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen realizada por meio de HPLC (Dionex Ultimate 3000)..... 44
- Figura 4.** Detecção de 20-hidroxiectdisona em *Amaranthus hybridus* var *patulus* realizada por meio de HPLC (Shimadzu-Sil 10 AF)..... 45
- Figura 5.** Detecção de 20-hidroxiectdisona em *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson. realizada por meio de HPLC (Dionex Ultimate 3000)..... 46
- Figura 6.** Detecção de 20-hidroxiectdisona em *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex D.) Standl.) realizada por meio da técnica de HPLC (Shimadzu-Sil 10 AF)..... 47
- Figura 7.** Quantidade de 20E em folhas, caules e raízes em *Sida rhombifolia*, *Pfaffia glomerata*, *Amaranthus hybridus* var *patalus*, *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia impetiginosa* acessada por meio de HPLC..... 48

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	13
REFERÊNCIAS.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 O QUE SÃO FITOECDISTERÓIDES.....	17
2.2 FUNÇÕES DOS ECDISTERÓIDES.....	18
2.3 BIOSÍNTESE DOS FITOECDISTERÓIDES.....	20
2.4 APLICABILIDADE BIOTECNOLÓGICA DOS FITOECDISTERÓIDES.....	21
2.5 BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS.....	22
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
3 CAPÍTULO 01 - BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS PRODUTORAS DO ECDISTERÓIDE 20-HIDROXIECDISONA.....	28
3.1 INTRODUÇÃO	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1 Local de execução do experimento.....	30
3.2.2 Levantamento e seleção das espécies presentes na Amazônia.....	30
3.2.3 Preparo do substrato e plantio.....	30
3.2.4 Desidratação do material.....	31
3.2.5 Obtenção do extrato metanólico.....	31
3.2.6 Determinação e quantificação de 20-hidroxiecdisona.....	31
3.3 RESULTADOS.....	32
3.3.1 Famílias avaliadas.....	32
3.3.2 Famílias avaliadas anteriormente para presença de fitoecdisteróides.....	35
3.3.3 Potencial presença de 20-hidroxiecdisona nas famílias avaliadas.....	41
3.3.4 Quantificação de 20-hidroxiecdisona em <i>Pfaffia glomerata</i> , <i>Sida rhombifolia</i> , <i>Amaranthus hybridus</i> var <i>patulus</i> , <i>Tabebuia serratifolia</i> e <i>Tabebuia impetiginosa</i>	48

RESUMO

Os ecdisteróides (ECDs), ecdisona (E) e 20-hidroxiecdisona (20E), são hormônios esteróis encontrados em artrópodes (zooecdisteróides, ZEs) e plantas (fitoecdisteróides, PEs). O PE 20E pode apresentar aplicabilidade agroquímica, biotecnológica, medicinal e farmacológica. Com o objetivo de se realizar a bioprospecção de plantas presentes na América do Sul que potencialmente sintetizam 20E, extratos metanólicos de folhas, caules e raízes de 104 espécies diferentes (representando 86 gêneros e 36 famílias) e dois controles positivos foram avaliados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados obtidos revelaram que o extrato metanólico de folhas, caules e raízes dos controles positivos e de três espécies avaliadas *i) Amaranthus hybridus* var *patalus* (Betol.) Thell (Amaranthaceae); *ii) Tabebuia serratifolia* (Vahl) G ex S. Moore (Bignoniaceae); e, *iii) T. impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae) apresentaram um pico com tempo de retenção equivalente ao do padrão de 20E, indicando que potencialmente sintetizam 20E. O teor de 20E em folhas, caules e raízes de *A. hybridus* var *patulus* foi respectivamente de 0,14, 0,10 e 0,08% (m/m). Na espécie *T. serratifolia*, o teor de 20E em folhas, caules e raízes foi respectivamente de 0,14, 0,68 e 0,60%. Em *T. impetiginosa*, o teor de 20E em folhas, caules e raízes foi respectivamente de 0,02, 0,11 e 0,19%. Análises posteriores (ex. HPLC, Espectrometria de Massas, Ressonância Nuclear Magnética) se fazem necessárias para se verificar a identidade dos fitoquímicos encontrados uma vez que este é o primeiro relato da potencial presença de 20E nestas três espécies.

Palavras-chave: Análise fitoquímica. Biodiversidade. Espécies Amazônicas, Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

ABSTRACT

The ecdysteroids (ECDs), ecdysone (E) and 20-hydroxyecdysone (20E), are sterol hormones found in arthropods (zooecdysteroids, ZES) and plants (phytoecdysteroids, PEs). The PE 20E may show agrochemical, biotechnological, medicinal and pharmaceutical applicability. In order to bioprospect South America plants that potentially synthesize 20E, methanol extracts of leaves, stems and roots of 104 different species (representing 86 genera and 36 families) and two positive controls were evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the methanol extract of leaves, stems and roots of the two positive controls and three assessed species *i)* *Amaranthus hybridus* var *patalus* (Betol.) Thell (Amaranthaceae); *ii)* *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G ex S. Moore) (Bignoniaceae); and, *iii)* *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae) showed a peak with the retention time equivalent to the standard (20E), indicating that these plants potentially synthesize 20E. The percentage of 20E in leaf, stem and root of *A. hybridus* var *patulus* was respectively 0.14, 0.10, 0.08% (w/w). In *T. serratifolia*, the 20E percentage in leaf, stem and root was respectively 0.14, 0.68 and 0.60%. In *T. impetiginosa*, the 20E percentage in leaf, stem and root was respectively 0.02, 0.11 and 0.19%. Further analyses (e.g. HPLC, Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance) are necessary to access the identity of these phytochemicals since it is the first report about the potential presence of 20E in these three species.

Keywords: Phytochemical analysis. Biodiversity. High performance liquid chromatography (HPLC). Amazonian species.

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Os fitoecdisteróides (PEs) são hormônios análogos de insetos que ocorrem em plantas. A descoberta de PEs em plantas ocorreu após uma análise de raios-X, levando a várias investigações com o intuito de se conhecer qual a finalidade destas moléculas no reino vegetal. Atualmente, PEs são descritos em menor escala em plantas, algas, cogumelos e alguns fungos (DINAN, 2001; SUN & YASUKAWA, 2008, DINAN et al., 2009) e representam o produto da biossíntese de terpenos e suas estruturas variam de acordo com as posições das hidroxilas presentes na estrutura básica dos esteroides (BATHORI & PÓNCRACZ, 2005).

A concentração de ecdisteróides em plantas é muito superior à encontrada em insetos (SVATOS & MACEK, 1994; DINAN, 1995). A natureza essencial dos zooecdisteróides (ZEs) em insetos e baixa incidência de PEs em plantas sugerem que os PEs podem agir como substâncias de defesa à herbivoria nas plantas que os produzem (DINAN, 2001; GOLOVATSKAYA, 2004; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

Dentre os ecdisteróides (ECDs) já caracterizados (LAFONT et al., 2012), 20-hidroxiecdisona (20E) é considerado o mais ativo, podendo apresentar aplicabilidade agroquímica, biotecnológica, farmacológica, medicinal e interferências sobre processos fisiológicos e morfológicos em plantas (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

Em plantas de espinafre, sabe-se que há maior biossíntese de 20E sob condições de estresse, como ataque de insetos causando danos mecânicos à planta ou mesmo mediante aplicação de metil jasmonato (SCHMELZ et al., 1998; SCHMELZ et al., 1999).

Em nematoides, a exposição a 20E causa imobilidade, redução da invasão, anormalidade no desenvolvimento e morte dos descendentes gerados (SORIANO et al., 2004). O PE 20E possui ação aceleradora em até 20 vezes sobre o estágio de muda larval podendo causar graves perturbações em seu desenvolvimento como deformação, esterilidade ou a morte das larvas (ZIBAREVA, 2009).

Em espécies vegetais a ocorrência foi relatada em *Paffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), mais conhecida como ginseng brasileiro (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b; DE-PARIS et al., 2000). Recentemente, foi determinado que

20E está presente em flores, folhas, caules e raízes de *P. glomerata*, sendo predominantemente acumulado em raízes (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b).

Atualmente, os problemas mais comuns advindos do uso indiscriminado de inseticidas organo-sintéticos são aumento da resistência de insetos, morte dos inimigos naturais, ressurgência 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).

Pouco se sabe sobre a ocorrência de 20E em plantas uma vez que somente 2% da flora mundial foi analisada para a presença de ECDs (DINAN, 2001). Considerando-se as aplicações de 20E (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a) e a grande biodiversidade encontrada na América do Sul foi realizado a bioprospecção de espécies presentes na América do Sul (e.g. Região Amazônica) que produzem 20E.

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.
- 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, p.37-53, 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. 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.

- GOLOVATSKAYA, I.F. Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.51, p.407-413, 2004.
- LAFONT, R.; HARMATHA, J.; MARION-POLLI, F.; DINAN, L.; WILSON, D. **The ecdysone handbook** <<http://ecdibase.org/>> Acessado em: 12 fev. 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.
- 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 of 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 of Chemistry Ecology**, v.25, p.1739-1757, 1999.
- SORIANO, I.R.; RILEY, I.T.; POTTER, M.J.; BOWERS, W.S. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemistry Ecology**, v.30, p.1885-1899, 2004.
- 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, 360 p., 2002.
- ZIBAREVA, L.N. Phytoecdysteroids of Caryophyllaceae Juss. **Contemporary Problems of Ecology**, v.16, p.753-764, 2009.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O QUE SÃO FITOECDISTERÓIDES?

Ecdisteróide (ECD) é um termo usado para se designar uma classe de hormônios esteroides envolvidos na muda de insetos e, em uma variedade de outros processos em artrópodes (LITWACK, 2005; SPINDLER et al., 2001). Os ECDs estão presentes em animais (zooecdisteróides, ZEs), plantas (fitoecdisteróides, PEs) e fungos (micoecdisteróides) os quais podem ser convertidos em hormônio ativo chamado 20-hidroxiedisona (20E), o qual atualmente é considerado o principal ECD biologicamente ativo em vários invertebrados (Figura 1). Em plantas, mais de 300 ECDs tem sido descritos até agora, e o número de variantes recém-detectados é de cerca de 10-20 por análogos e com uma expectativa de cerca de 1.000 compostos no total (CHAPMAN, 1988; DINAN, 2001a; DINAN et al., 2009). O ECD 20E é encontrado em concentrações variáveis em diversas espécies vegetais, dentre elas milho, espinafre e samambaia (DINAN, BOURNE & WHITING, 2001b; FILLIPOVA et al., 2003).

Os ecdisteróides pertencem a uma classe de esteróis (ciclopentano-perhidrofenantreno) que apresentam uma cadeia lateral no C-17 (Figura 1). A clivagem da cadeia lateral se dá nas posições C₁₉, C₂₁ e C₂₄ (Figura 2) (BÁTHORI & PÓNCRACZ, 2005; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

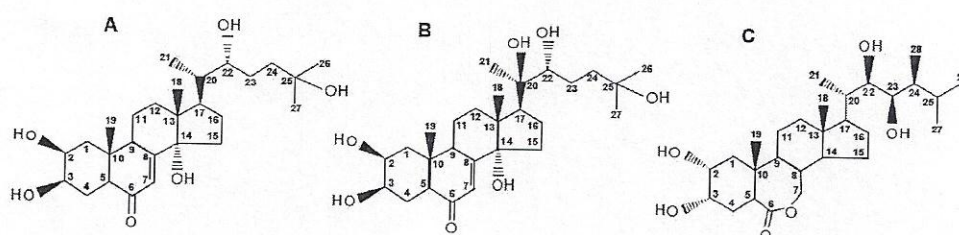


Figura 1. Representação estrutural de ecdisona (A), 20-hidroxiecdisona (B) e 24-epibrassinolídeo (C). Adaptado (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

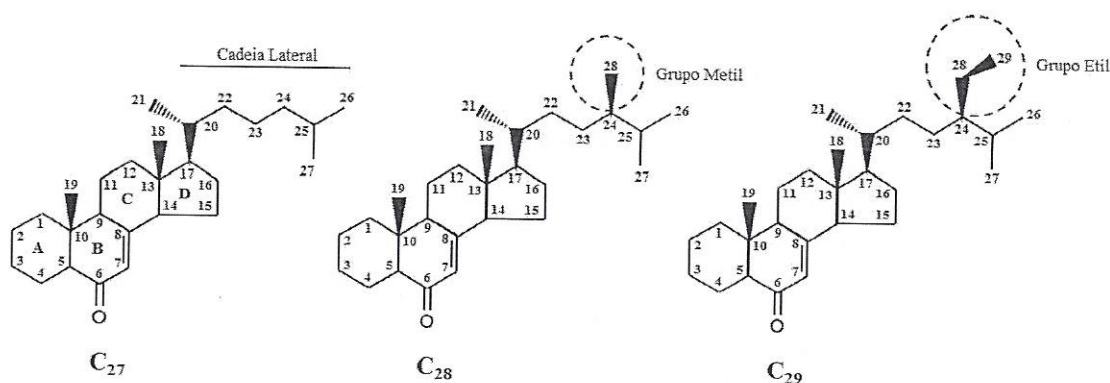


Figura 2. Estrutura dos ecdisteróides (ECDs) apresentando cadeia lateral C₂₇, C₂₈, e C₂₉. Adaptado (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

Em humanos, os efeitos dos ecdisteróides relatados são benéficos e uma grande variedade de artigos descreve tais efeitos como a redução da glicemia em pacientes diabéticos, a redução da colesterolemia, e também a prevenção da osteoporose. Tal efeito farmacológico em mamíferos está ligado ao fato de 20E estimular a síntese de proteínas nestes. O uso do PEs como produto medicinal é muito interessante uma vez que possuem baixa toxicidade para mamíferos, sendo a dose letal de 6 g/kg (LAFONT & DINAN, 2003; DINAN & LAFONT, 2006; GAO et al., 2008; SEIDLOVA-WUTTKE et al., 2010, KUMPUN et al., 2011).

2.2 FUNÇÕES DOS ECDISTERÓIDES

A função exata dos PEs em plantas ainda é desconhecida, porém cogitam-se três hipóteses (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), sendo a segunda hipótese a mais aceitável (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

As hipóteses *i* e *iii* são devidas ao fato de 20E afetar a cultura da alfafa durante a diferenciação de células somáticas (MACHACKOVA et al., 1995), onde diferentes concentrações de 20E agem sinergicamente com ácido indolil-3-acético (AIA) no alongamento do coleóptilo (GOLOVOTSKAYA, 2004).

O PE 20E foi detectado em raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae) (SHIOBARA et al., 1993), mais conhecida como ginseng brasileiro. Recentemente, foi determinado que 20E está presente em flores, folhas, caules e raízes de *P. glomerata*, sendo predominantemente acumulado em raízes (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b). Em plantas de espinafre, sabe-se que há maior biossíntese de 20E em condições de estresse como: ataque de insetos causando danos mecânicos a planta e aplicação de metil jasmonato (SCHMELZ et al., 1998; SCHMELZ et al., 1999).

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 crescimento e início da outra. Porém, para que isso aconteça, o inseto precisa de pulsos de 20E (Figura 3) (THUMMEL, 2001; GILBERT, 2001; GILBERT et al., 2001; GILBERT et al., 2004). Os pulsos de 20E controlam processos fisiológicos como muda, metamorfose, morte celular programada, síntese de cutícula, desenvolvimento embrionário e pupação, sendo indispensável para a conclusão do desenvolvimento em artrópodes. No entanto, pulsos inespecíficos de 20E podem levar o inseto à morte (THUMMEL, 2001; LAFONT & DINAN, 2003; MAKAKA et al., 2002; GILBERT, 2004; GOLOVASTKAYA, 2004; BATHORI & PÓNGRACZ, 2005).

Estudos comprovaram que os ecdisteróides possuem atividade biológica em nematoides (NELSON & RIDDLE, 1984). Assim, a exposição aos PEs desempenhou importante papel de defesa também contra os nematoides, uma vez que causou imobilidade, redução da invasão, anormalidade no desenvolvimento, morte e descendentes inférteis (SORIANO et al., 2004).

Em insetos, há uma série de estudos que fornecem evidências diretas de que os PEs (ex. 20E) são mais ativos (até 20 vezes) na muda de insetos, podendo causar graves perturbações no desenvolvimento como a deformação, esterilidade ou a morte das larvas (ZIBAREVA, 2009). Os PEs podem ser considerados aleloquímicos uma vez que têm ação em algumas espécies de invertebrados.

A natureza essencial dos ZEs (zooecdisteróides) em insetos e baixa incidência de PEs em plantas sugerem que os fitoecdisteróides podem agir como substâncias de defesa contra a herbivoria em plantas que os produzem (DINAN, 2001a; GOLOVATSKAYA, 2004; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a). Tais evidências

fazem com que a terceira hipótese seja a mais aceita (DINAN, 1995; DINAN, 2001a; GOLOVATSKAYA, 2004; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

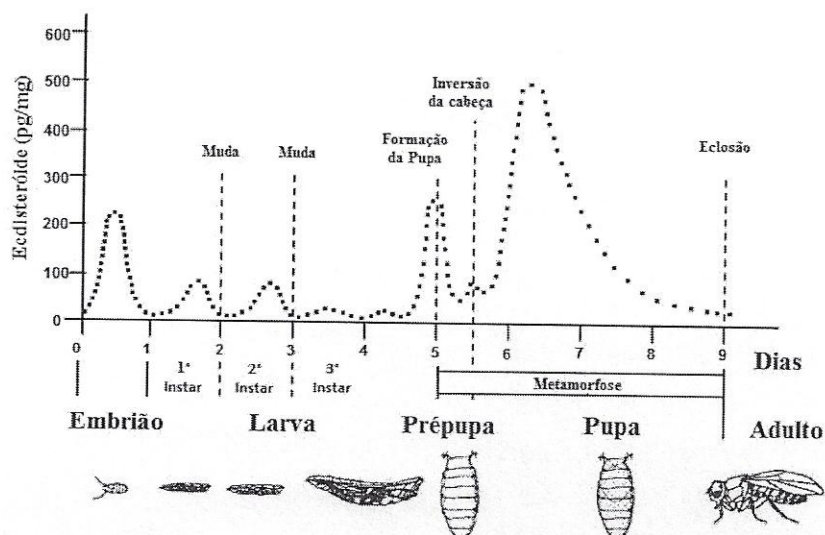


Figura 3. Correlações entre o desenvolvimento e pulsos de 20E em *Drosophila melanogaster*. Os processos de desenvolvimento (embriogênese, desenvolvimento larval e metamorfose) são sincronizados por pulsos de ECDs. As transições que ocorrem durante o desenvolvimento são marcadas por linhas tracejadas. Adaptado (THUMMEL, 2001).

2.3 BIOSÍNTESE DOS FITOECDISTERÓIDES

Os esteróis vegetais são triterpenos que incluem um grupo metil ou etil (GOODWIN, 1971). Algumas plantas contêm baixas quantidades de lanosterol (colesterol) e 7-dehidrocolesterol. 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-dehidrocolesterol e colesterol (SUZUKI & MURANAKA, 2007).

Em espinafre, lanosterol (PS) (Figura 4) pode ser o precursor direto do 20E, enquanto que em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), são necessários 24 genes que codificam 12 enzimas e são necessárias em 11 etapas para síntese cicloartenol e lanosterol a partir do acetil-CoA. A via biossintética precisa envolvida na produção de PEs é desconhecida (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a); apenas em alguns insetos algumas enzimas envolvidas na biossíntese de 20E são conhecidas (SUZUKI &

MURANAKA, 2007). Sabe-se que a conversão de esteroides em 20E, em insetos, envolve várias enzimas da classe dos citocromos P450 (GILBERT, 2004).

É necessário mais ênfase na elucidação da rota biossintética dos fitoecdisteróides diante do potencial desses compostos (DINAN, 2001a; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

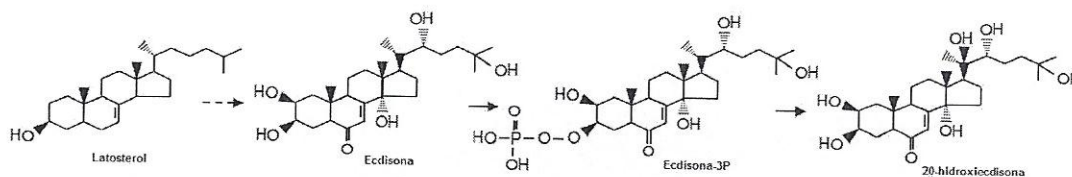


Figura 4. Biossíntese de ecdisona e 20-hidroiecdisona em espinafre. Adaptado (ADLER & GREBENOK, 1999).

2.4 APLICABILIDADE BIOTECNOLÓGICA DOS FITOECDISTERÓIDES

O ECD 20E pode apresentar aplicabilidade agroquímica, biotecnológica, farmacológica, medicinal e interferências sobre processos fisiológicos e morfológicos em plantas. Os ECDs apresentam algumas características que facilitam seu uso como indutores em sistemas gênicos, como: *i)* não se ligam em receptores de esteroides de vertebrados; *ii)* apresentam baixa toxidez em células de mamíferos; *iii)* fácil distribuição dentro das células; e, *iv)* são encontrados em grandes quantidades em plantas (LAFONT & DINAN, 2003; BATHORI & PÓNCRAZ, 2005; DINAN & LAFONT, 2006). Essas características apresentadas pelos ECDs possibilitam seu uso no controle de insetos sem o uso de agrotóxicos (DINAN & LAFONT, 2006; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a)

2.5 BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS

A bioprospecção pode ser definida como método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local (SANTOS, 2000). Há diversos projetos de bioprospecção com base no controle do acesso aos recursos genéticos, que variam em diversos aspectos, de acordo com a realidade, os costumes, as necessidades e as possibilidades locais. Os principais exemplos foram realizados na África e na América Latina e, podem ser divididos em três tipos: contratos nacionais, contratos com participação pouco relevante do governo e contratos mistos (GRANJA et al., 1999).

A bioprospecção tem sido usada em uma série de ações de pesquisa para os mais diversos fins como: agricultura, farmacologia, médica e indústria petrolífera. Dentre estas áreas, alguns exemplos de trabalhos que realizaram a bioprospecção nos últimos anos: Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (ABREU, 2005); Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro (ABREU et al., 2008); Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino (LUCON et al., 2009); Bioprospecção de microalgas produtoras de altos níveis de lipídeos para a produção sustentável de biocombustíveis (MUTANDA et al., 2011); Plantas medicinais com potencial de bioprospecção utilizados no semiárido do Nordeste do Brasil (CARTAXO et al., 2010); e, Bioprospecção de peptídeos antimicrobianos (PHILIP et al., 2008).

A bioprospecção pode ajudar a encontrar novos compostos (ex. ecdisteróides) e desta maneira contribuir para o desenvolvimento da biotecnologia, farmacologia e agricultura.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada à importância de 20E em insetos e plantas e sua ampla aplicabilidade, várias análises se fazem necessárias para se determinar *i)* a sua ocorrência e distribuição em plantas; *ii)* seu papel na interação planta-inseto; *iii)* os genes e as rotas envolvidas em sua biossíntese; e, *iv)* os mecanismos de transferência gênica entre espécies distintas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, G.F. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L). 2005. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- ABREU, G.F.; MARCIEL, V.T.; STADNIK, J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.78-82, 2008.
- ADLER, J.H.; GREBENOK, R.J. Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plants. **Crit. Rev. Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.253-264, 1999.
- BATHORI, M.; PONGRACZ, Z. Phytoecdysteroids - from isolation to their effects on humans. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p.153-172, 2005.
- CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, p.326-342, 2010.
- CHAPMAN, R.F. The insect structure and function. New York: American Elsevier Publishing Company, p. 132-141, 1998.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v.57, p.325-339, 2001a.
- DINAN, L.; BOURNE, P.; WHITING, P. Phytoecdysteroid profiles in seeds of *Sida* spp. (Malvaceae). **Phytochemistry Analysis**, v.12, p. 110-119, 2001b.
- 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.978-987, 2008a.

- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; VIEIRA, R.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p.305-311, 2008b.
- FILLIPOVA, V.N.; ZORINYANTS, S.E.; VOLONDINA, S.O.; SMOLENKAYA, I.N. Cell cultures of ecdysteroid-containing *Ajuga reptans* and *Serratula coronata* plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, p.501-508, 2003.
- GAO, L.; CAI, G.; SHI, X. β -Ecdysterone induces osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells and relieves osteoporosis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.2245-2249, 2008.
- 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.
- 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.
- GRANJA, A.F.; BARROS-PLATIAU, A.F.; VARELLA, M.D. Acesso aos recursos genéticos, transferência de tecnologia e bioprospecção. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v.42, 1999.
- KUMPUN, S.; GIRAUL, J.P.; DINAN, L.; BLAIS, C.; MARIA, A.; DAUPHIN-VILLEMANT, C.; YINGYONGNARONGKUL, B.; SUKSAMRARN, A.; LAFONT, R. The metabolism of 20-hydroxyecdysone in mice. **Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology**, v.126, p.1-9, 2011.
- 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.
- LITWACK, G. Insect hormones. **Vitamins & Hormones**, v.73, p.1-288, 2005.
- LUCON, C.M.M.; KOIKE, C.M.; ISHIKAWA, A.I.; PATRÍCIO, F.R.A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma spp.* para o controle de

- Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.225-232, 2009.
- 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.
- MUTANDA, T.; RAMESHA, D.; KARTHIKEYANB, S.; KUMARIA S.; ANANDRAJC, A.; BUX, F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v.102, p.57-70, 2011.
- PHILIP, K.; SINNIHA, S.K.; MUNIANDY, S. Bioprospecting for antimicrobial peptides. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.401-402, 2008.
- NELSON, F.K.; RIDDLE, D.L. Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. **Journal of Experimental Zoology**, v.231, p.45-56, 1984.
- RAMADAN, M.F.; ZAYED, R.; EL-SHAMAY, H. Screening of some solanaceae plants. **Food Chemistry**, v.103, p.885-890, 2007.
- SANTOS, A.S.R. Bioprospecção: considerações gerais. Jus Navigandi, Teresina, ano 5, n. 44, 1 ago. 2000. Disponível em: <<http://jus.com.br/revista/texto/1859>>. Acesso em: 01 de março de 2012.
- SCHAFFER, A.; BRONNER, R.; BENVENISTE, P.; SCHALLER, H. The ratio of campesterol to sitosterol which modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by sterol methyltransferase. **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.
- SEIDLOVA-WUTTKE, D.; EHRHARDT, C.; WUTTKE, W. Metabolic effects of 20-hydroxyecdysone in ovariectomized rats. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.119, p.121-126, 2010.
- SHIOBARA, Y.; INQUE, S.S.; KEATO, K. NISHIGUSHI, Y.; OISHI, Y. NISHIMITO, N.; OLIVEIRA, F.; AKSUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.A. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.36, p.1527-1530, 1993
- SORIANO, I.R.; RILEY, I.T.; POTTER, M.J.; BOWERS, W.S. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemistry Ecology**, v.30, p.1885-1899, 2004.
- 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
- SPINDLER, K.D.; PRZIBILLA, S.; SPINDLER-BARTH, M. Mounting hormones of arthropods: molecular mechanisms. **Zoology**, v.103, p.189-201, 2001.
- 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.
- ZIBAREVA, L.N. Phytoecdysteroids of Caryophyllaceae Juss. **Contemporary Problems of Ecology**, v.16, p.753-764, 2009.

3 CAPÍTULO 01 - BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS PRODUTORAS DO ECDISTERÓIDE 20-HIDROXIECDISONA

3.1 INTRODUÇÃO

Os ecdisteróides (ECDs), ecdisona (E) e 20-hidroxiecdisona (20E), são hormônios esteróides encontrados em insetos (ZEs) e plantas (PEs). Em vegetais atuam como metabólitos secundários e pertencem a classe dos esteroides possuindo uma cadeia lateral na posição C₁₇. O cromóforo 14 α -hidroxi-7-en-6-ona, presente na estrutura básica de todos os ECDs, é responsável pela absorção de luz ultravioleta (λ max a 242 nm) em metanol, permitindo a análise de 20E por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (DINAN, 2001; LAFONT & DINAN, 2003; BATHORI & PÓNGRACZ, 2005; DINAN et al., 2009).

Em insetos, 20E controla muitos processos fisiológicos como a muda e a metamorfose, morte celular programada, síntese de cutícula, desenvolvimento embrionário e pupação, sendo indispensável para a conclusão do desenvolvimento em artrópodes. No entanto, pulsos inespecíficos de 20E podem levar o inseto à morte. A conversão de esteróides em 20E, em insetos, envolve várias enzimas da classe dos citocromos P450, contudo os mamíferos são incapazes de sintetizar 20E (THUMMEL, 2001; LAFONT & DINAN, 2003; MAKAKA et al., 2002; GILBERT, 2004; BATHORI & PÓNGRACZ, 2005; DINAN & LAFONT, 2006).

Os PEs foram identificados em samambaias, gimnospermas e angiospermas, mas poucas espécies vegetais são produtoras, entretanto a concentração de ECDs em plantas é muito superior à encontrada em insetos podendo representar de 2 a 3% da massa seca da planta (SVATOS & MACEK, 1994; DINAN, 1998; DINAN et al., 2009).

A ocorrência de PEs foi examinada em apenas 2% da flora mundial, e nas espécies testadas apenas de 5-6% apresentaram PEs (DINAN, BOURNE & WHITING, 2001). Existem três hipóteses a respeito da atuação dos PEs em espécies vegetais: *i)* compostos fitohormonais (DINAN, 1998; GOLOVATSKAYA, 2004); *ii)* compostos

protetores contra insetos fitófagos não adaptados (LAFONT, 1997); e, *iii*) fonte de PEs requeridos para o crescimento e proliferação celular (MACHACKOVA, VAGNER & SLAMA, 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 contra a herbivoria nas plantas que o produzem. A possibilidade de que a natureza tenha selecionado os PEs como composto de defesa, por sua vez sugere que 20E possa ser utilizado em estratégias de proteção das culturas contra insetos fitófagos (DINAN, 1995; DINAN, BOURNE & WHITING, 2001; GOLOVATSKAYA, 2004; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a), diminuindo assim o uso de inseticidas.

Os PEs possuem várias características que facilitam seu uso como indutores em sistemas gênicos, como: *i*) não se ligam em receptores de esteróides de vertebrados; *ii*) apresentam baixa toxidez em células de mamíferos; *iii*) fácil distribuição dentro das células; e, *iv*) são encontrados em grandes quantidades em plantas (LAFONT & DINAN, 2003; BATHORI & PÓNCRACZ, 2005; DINAN & LAFONT, 2006).

No Brasil, a espécie *Paffia glomerata* (Amaranthaceae), mais conhecida como ginseng brasileiro é produtora de 20E e possui uso medicinal. Suas raízes são usadas na medicina popular para prevenir e combater uma série de doenças, tornando essa espécie de grande interesse, uma vez que 20E pode apresentar aplicabilidade biotecnológica, farmacológica e até mesmo um importante papel na planta (SHIOBARA et al., 1993; NETO et al., 2004; MARQUES et al., 2004; NETO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2006; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a).

Em plantas pouco se sabe sobre os ECDs, de modo que ainda não se esclareceu qual o papel fundamental dos PEs em plantas. A biossíntese, a regulação e a função precisa de 20E no ciclo de vida das plantas são desconhecidas (SLAMA, 1993; MACHACKOVA et al., 1995; DINAN, BOURNE & WHITING, 2001). Dada à importância dos PEs, é essencial analisar sua ocorrência e distribuição assim como entender suas funções bioquímicas e fisiológicas em plantas e seu papel na interação planta-inseto (FESTUCCI BUSELLI et al., 2008a; UHLIK et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi realizar a bioprospecção de plantas presentes na América do Sul (e.g. Região Amazônica) que potencialmente produzem o PE 20E por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de execução dos experimentos

O experimento foi realizado no Laboratório de Físico-Química, localizado no Centro de Tecnologia Agropecuária (CTA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e as análises cromatográficas (HPLC) foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos II, localizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2.2 Levantamento e seleção das espécies presentes na América do Sul

Foi feito um levantamento baseado em literatura de espécies de plantas presentes na América do Sul (ex. Região Amazônica) para se realizar a bioprospecção de plantas potencialmente produtoras do PE 20E. As plantas selecionadas foram coletadas na região Amazônica, Estado do Pará e estão organizadas de acordo com sua família, gênero e espécie (Tabela 1).

3.2.3 Preparo do substrato e plantio

As sementes das plantas selecionadas foram plantadas em sacos plásticos de dois litros contendo substrato constituído: solo:areia:esterco (4:1:1). Em cada saco plástico foram adicionados os macronutrientes: [N (6,40 g), P (9,78 g), K (5,31 g), Ca (6,41 g), Mg (1,15 g), Fe (0,07 g)] e micronutrientes: [B (14,44 mg), Mn (73,19 mg), Zn (26,08 mg), Mo (1,32 mg), Cu (0,08 mg), Co (0,08 mg)] que foram adicionados antes do plantio (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b). Para todas as espécies foram utilizadas três repetições. As plantas foram regadas diariamente. O experimento foi conduzido em condições de viveiro. As plantas foram mantidas em viveiro até que tivessem 30 cm de altura e cinco folhas adultas. Plantas que não germinaram ou mesmo não foram encontradas sementes para se efetuar o plantio realizou-se a coleta *in situ*.

3.2.4 Desidratação do material

As plantas obtidas via semente foram desidratadas quando passaram a apresentar pelo menos cinco folhas adultas. Em contraste, as plantas provenientes de coleta *in situ* foram desidratadas após a sua coleta em campo. Folhas, caules e raízes dessas plantas foram individualmente separados, fatiados e acondicionados em sacos de papel previamente identificados, os quais foram levados à estufa a 50 °C com ventilação forçada e constante até que a massa seca permanecesse constante (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b). Posteriormente, as amostras foram trituradas em moinho até a obtenção de um pó uniforme e colocadas em sacos de polietileno devidamente identificados com família, gênero, espécie, nome vulgar e a parte da planta em questão folhas, caules ou raízes. Os sacos de polietileno foram lacrados para evitar a entrada de umidade e armazenados.

3.2.5 Obtenção do extrato metanólico

Para obtenção do extrato metanólico foram pesados 100 mg de folhas, caules e raízes que foram individualmente adicionados a 10 mL de metanol e incubados a 25° C durante sete dias sob agitação diária. A solução resultante foi centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos. Após centrifugação foi recolhido o sobrenadante das amostras e colocado em tubos de 1,5 mL previamente identificados para posterior centrifugação a 5.000 rpm por 12 minutos novamente sendo recolhidos os sobrenadantes e armazenados em tubos identificados.

3.2.6 Determinação e quantificação de 20-hidroxicdisona

A determinação e quantificação de 20E presente no extrato metanólico foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b). A análise de 20E foi realizada em aparelho da marca Dionex modelo Ultimate 3000 equipado com detector UV DAD-3000RS e aparelho Shimadzu-Sil 10AF equipado com detector UV SPD-M10Avp ambos aparelhos fixados em 245

nm e com coluna: Luna C₁₈ (150 X 4,6 mm) e fluxo lento de 0,7 mL/minuto em solução de metanol:água (1:1) (v/v).

O volume de extrato metanólico injetado foi de 20 µL. Para cada amostra foi realizado uma leitura. Para as amostras que apresentaram o tempo de retenção equivalente ao tempo de retenção do padrão (20E) realizou-se uma segunda leitura para confirmar o resultado obtido. O tempo de leitura foi de 20 minutos por amostra. O padrão de 20E foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO) com 93% de pureza.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Famílias avaliadas

Para a determinação da ocorrência de 20-hidroxicdisona (20E) foram avaliados os extratos metanólicos de 104 espécies, até então não avaliadas para a presença de 20E, representando 86 gêneros e 36 famílias. As espécies avaliadas estão presentes na América do Sul e foram coletadas na região norte do Brasil (Tabela 1). Além destas espécies, duas outras espécies foram usadas como controles positivos uma vez que produzem 20E. Os indivíduos plantados via semente representam 77 espécies, representando espécies arbóreas, medicinal e frutíferas; já as espécies provenientes de coleta *in situ* perfazem um total de 27 plantas, as quais representam plantas daninhas. Duas espécies, soja e o feijão, usadas comumente e plantadas em grande escala foram também analisadas.

O número médio de indivíduos por família foi de aproximadamente 3% e a família com maior quantidade de espécies avaliadas foi a Asteraceae, com nove espécies e oito gêneros. Quatro subfamílias da família Fabacea também foram avaliadas, sendo representadas por Caesalpininoideae, Faboideae, Papilionoideae e Momisoideae (Tabela 1).

Tabela 1. Famílias, gêneros e espécies avaliadas para a potencial presença de 20-hidroxicedisona.

Família	Gênero	Espécie	Nome Vulgar
1. Amaranthaceae	1. <i>Alternanthera</i>	1. <i>A. tenella</i> (Colla)	Periquito*
	2. <i>Amaranthus</i>	2. <i>A. hybridus</i> var <i>patalus</i> (Betol.) Thell.	Caruru-roxo*
		3. <i>A. viridis</i> L.	Caruru*
2. Anacardiaceae	3. <i>Anacardium</i>	4. <i>A. giganteum</i> Hanc. ex Engl.	Cajuaçu
		5. <i>A. occidentale</i> L.	Caju
	4. <i>Poupartia</i>	6. <i>P. amazônica</i> Ducke	Cedro caiacaia/azedo
3. Annonaceae	5. <i>Spondias</i>	7. <i>S. mombim</i> L.	Taperebá
	6. <i>Annona</i>	8. <i>A. muricata</i> L.	Graviola
		9. <i>A. crassiflora</i> Mart	Articum-da-mata
4. Apiaceae	7. <i>Rullinia</i>	10. <i>R. mucosa</i> (Jacq.) Baill	Biribá
5. Apocynaceae	8. <i>Eryngium</i>	11. <i>E. foetidum</i> L.	Chicória*
	9. <i>Allamanda</i>	12. <i>A. cathartica</i> L.	Alamanda
	10. <i>Catharanthus</i>	13. <i>C. roseus</i> (L.) G. Don	Lavadeira
6. Areaceae	11. <i>Rauwolfia</i>	14. <i>R. paraensis</i> Ducke	Gogó-de-guariba
	12. <i>Attalea</i>	15. <i>A. maripa</i> (Aubl.) Mart.	Inajá
	13. <i>Euterpe</i>	16. <i>E. oleracea</i> Mart.	Açaí
	14. <i>Mauritia</i>	17. <i>M. flexuosa</i> L.	Buriti
	15. <i>Oneocarpus</i>	18. <i>O. bacaba</i> Mart.	Bacaba
		19. <i>O. mapora</i> Karsten	Bacabi
7. Araceae	16. <i>Pistia</i>	20. <i>P. stratiotes</i> L.	Alface-da-água*
8. Asteraceae	17. <i>Acmella</i>	21. <i>A. oleracea</i> (L.) R.K. Jansen	Jambu
	18. <i>Bidens</i>	22. <i>B. pilosa</i> L.	Picão-preto*
		23. <i>B. subalternans</i> DC.	Picão*
	19. <i>Chaptalia</i>	24. <i>C. nutans</i> (L.) Polak	Língua-de-vaca-miúda *
	20. <i>Eclipta</i>	25. <i>E. alba</i> (L.) Hassk.	Quebra-pedra*
	21. <i>Elephantopus</i>	26. <i>E. mollis</i> H. B. K	Língua-de-vaca*
	22. <i>Emilia</i>	27. <i>E. fosbergii</i> Nicolson	Falsa-serralha*
	23. <i>Melampodium</i>	28. <i>M. perfoliatum</i> (Cav.) Kunth	Botão-de-cachorro*
	24. <i>Praxelis</i>	29. <i>P. pauciflora</i> (Kunth) R.M.King & H. Rob	Botão-azul*
		30. <i>T. impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.	Ipê-rosa
9. Bignoniaceae	25. <i>Tabebuia</i>	31. <i>T. serratifolia</i> (Vahl) G. Nicholson	Ipê-amarelo
10. Bixaceae	26. <i>Bixa</i>	32. <i>B. orellana</i> L.	Urucum
11. Burseraceae	27. <i>Protium</i>	33. <i>P. sp.</i> (Engl.) Engl.	Breu-branco
12. Celastraceae	28. <i>Maytenus</i>	34. <i>M. ilicifolia</i> Mart. ex Reissek	Espinheira-santa
13. Chenopodiaceae	29. <i>Chenopodium</i>	35. <i>C. ambrosioides</i> L.	Erva-de-santa-maria
14. Convolvulaceae	30. <i>Ipomoea</i>	36. <i>I. nil</i> (L.)	Corda-de-viola
		37. <i>I. purpurea</i> Roth.	Corda-de-viola
		38. <i>P. insignis</i> Mart.	Bacuri
15. Clusiaceae	31. <i>Platonia</i>	39. <i>R. gardneriana</i> Pl.e Tr.	Bacuripari
	32. <i>Rheedia</i>	40. <i>V. guianensis</i> (Aubl.) Choisy	Lacre
	33. <i>Vismia</i>	41. <i>C. brevifolius</i> (Rottb.) Hassk.	Capim-de-uma-só-cabeça*
16. Cyperaceae	34. <i>Cyperus</i>	42. <i>C. esculentus</i> L.	Junquinho*
		43. <i>C. ferax</i> L.	Tirica
		44. <i>C. iria</i> L.	Tirica-do-brejo*
		45. <i>C. luzulae</i> (L.) Retz.	Cortadeira*
		46. <i>C. odoratus</i> L.	Cordeirinha*
		47. <i>D. ssp</i> L.	Cipó-fogo
17. Dilleniaceae	35. <i>Davilla</i>	48. <i>C. cajucara</i> Benth.	Sacaca
18. Euphorbiaceae	36. <i>Croton</i>	49. <i>C. hirta</i> (L.) Millsp	Burrinha-leiteira*
	37. <i>Chamaesyce</i>		

	38. <i>Euphorbia</i>	50. <i>E. prostrata</i> Ait.	Quebra-pedra*
	39. <i>Jatropha</i>	51. <i>J. urens</i> Müell.	Urtiga*
	40. <i>Hevea</i>	52. <i>H. brasiliensis</i> (Willd. ex A. Juss.) Müll	Seringueira
19. Lecythidaceae	41. <i>Bertholletia</i>	53. <i>B. excelsa</i> H.B.K.	Castanha-do-brasil
	42. <i>Lecythis</i>	54. <i>L. pisonis</i> Cambess.	Sapucaia
20. Fabaceae- Caesalpinioideae	43. <i>Apuleia</i>	55. <i>A. leiocarpa</i> (Vog.) Macbride	Amarelão
	44. <i>Cassia</i>	56. <i>C. tora</i> L.	Mata-pasto
	45. <i>Clitoria</i>	57. <i>C. fairchildiana</i> R. A. Howard	Palheteira
	46. <i>Copaifera</i>	58. <i>C. martii</i> Hayne	Copaíba verdadeira
	47. <i>Hymenaea</i>	59. <i>H. courbaril</i> L.	Jatobá
	48. <i>Schizolobium</i>	60. <i>S. amazonicum</i> Huber ex Ducke	Paricá
20. Fabaceae- Caesalpinioideae	49. <i>Sclerolobium</i>	61. <i>S. paniculatum</i> Vogel	Tachi-branco
	50. <i>Caesalpinia</i>	62. <i>C. echinata</i> Lam.	Pau-brasil
	51. <i>Vouacapoua</i>	63. <i>V. americana</i> Aubl.	Acapú
	52. <i>Cenostigma</i>	64. <i>C. tocantinum</i> Ducke	Pau-ferro
20. Fabaceae- Faboideae	53. <i>Glycine</i>	65. <i>G. max</i> L.	Soja
	54. <i>Phaseolus</i>	66. <i>P. vulgaris</i> L.	Feijão
20. Fabaceae- Papilionoideae	55. <i>Dalbergia</i>	67. <i>D. nigra</i> (Vell.) Fr. All. ex Benth.	Pau-preto
	56. <i>Dipteryx</i>	68. <i>D. odorata</i> (Aubl.) Willd	Cumarú
	57. <i>Dinizia</i>	69. <i>D. excelsa</i> Ducke	Angelim vermelho
	58. <i>Enterolobium</i>	70. <i>E. maximum</i> Ducke	Fava-tamboril
	59. <i>Pentaclethra</i>	71. <i>P. filamentosa</i> Benth.	Pracaxi
20. Fabaceae- Mimosoideae	60. <i>Inga</i>	72. <i>I. alba</i> (Sw.) Willd.	Ingá-xixica
	61. <i>Hymenolobium</i>	73. <i>H. petraeum</i> Ducke	Angelim-pedra
	62. <i>Mimosa</i>	74. <i>M. pudica</i> L.	Dormideira
	63. <i>Parkia</i>	75. <i>P. pendula</i> (Willd.) Benth. ex Walp.	Fava-de-bolota
	64. <i>Stryphnodendron</i>	76. <i>S. polystachyum</i> (Miq.) Klein	Fava-rosca
21. Lamiaceae	65. <i>Hyptis</i>	77. <i>S. barbadetiman</i> (Vell.) Mart.	Barbatimão
		78. <i>H. atrorubens</i> Poit.	Hotelã-do-brejo*
		79. <i>H. mutabilis</i> (A. Rich.) Briq.	Alfavação
22. Malpighiaceae	66. <i>Marsypianthes</i>	80. <i>M. chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze	Hortelã-do-campo*
23. Malvaceae	67. <i>Byrsonima</i>	81. <i>B. aff. laevigata</i> (Poir.) DC.	Muruci
	68. <i>Bombacopsis</i>	82. <i>B. glabra</i> (Pasq.)	Mamorana
	69. <i>Theobroma</i>	83. <i>T. grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum	Cupuaçu
		84. <i>T. speciosum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum	Cacau-do-mato
		85. <i>T. cacao</i> L.	Cacau-manso
24. Meliaceae	70. <i>Cabralea</i>	86. <i>C. canjerana</i> (Vell.) Mart.	Canjarana
	71. <i>Carapa</i>	87. <i>C. guianensis</i> Aubl.	Andiroba
	72. <i>Cedrela</i>	88. <i>C. odorata</i> L.	Cedro
	73. <i>Swietenia</i>	89. <i>S. macrophylla</i> King.	Mogno
25. Myristicaceae	74. <i>Virola</i>	90. <i>V. surinamensis</i> (Rol. ex Rottb.) Warb.	Virola
26. Myrtaceae	75. <i>Psidium</i>	91. <i>P. guajava</i> L.	Goiaba
	76. <i>Eugenia</i>	92. <i>E. stipitata</i> McVaugh	Araça-boi
27. Oxalidaceae	77. <i>Oxalis</i>	93. <i>O. regnellii atropurpurea</i> L.	Trevo-roxo
28. Passifloraceae	78. <i>Passiflora</i>	94. <i>P. edulis</i> Sims	Maracujá
29. Portulacaceae	79. <i>Talinum</i>	95. <i>T. esculentum</i> Jacq.	Cariru*
30. Polypodiaceae	80. <i>Pterodon</i>	96. <i>P. emarginatus</i> Vogel.	Sucupira
31. Rosaceae	81. <i>Sorbus</i>	97. <i>S. domestica</i> (L.) Spach.	Sorva
32. Rubiaceae	82. <i>Spermacoce</i>	98. <i>S. latifolia</i> Aubl.	Erva-quente
33. Sapindaceae	83. <i>Paullinia</i>	99. <i>P. cupana</i> Kunth.	Guaraná
34. Solanaceae	84. <i>Solanum</i>	100. <i>S. americanum</i> Mill.	Maria-pretinha*
		101. <i>S. lycocarpum</i> St. Hil.	Jurubebão*

35. Zingiberaceae	85. <i>Costus</i>	102. <i>S. paniculatum</i> L.	Jurubeba*
36. Heliconiaceae	86. <i>Heliconia</i>	103. <i>C. spicatus</i> (Jacq.) Sw.	Cana-de-macaco
		104. <i>H. psittacorum</i> L.	Helicônia

Legenda: * plantas provenientes de coleta *in situ*.

3.3.2 Famílias avaliadas anteriormente para presença de fitoecdisteróides

Destas 36 famílias avaliadas, sete famílias estão presentes no Ecdybase (LAFONT et al., 2012) e foram avaliadas anteriormente para presença de ECDs (Tabela 2 e 3) e são representadas pelas famílias Amaranthaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Lamiaceae, Malvaceae e Solanaceae. As famílias Convolvulaceae e Solanaceae possuem apenas duas espécies capazes de sintetizar PEs, as quais apresentam juntas oito PEs diferentes, contudo a Asteraceae e Lamiaceae são detentoras das maiores quantidades de espécies que podem produzir PEs, juntas apresentam um total de 152 compostos classificados como PEs. Em Asteraceae (LAFONT et al., 2012) foi catalogado 72 PEs em apenas nove espécies. Os PEs produzidos por estas famílias podem ser específicos de algumas espécies ou ainda comuns a várias outras espécies, como é caso da *P. glomerata* que produz os pfaffiaglicosídeos C, D e E que são PEs específicos desta planta em questão; mas que também sintetiza 20-hidroxiecdisona (20E), PE que está presente em outras espécies, a exemplo do espinafre.

As demais 29 famílias analisadas neste trabalho (Tabela 4) não estão presentes no Ecdybase, sendo avaliadas pela primeira vez para a presença do fitoecdisteróide 20E.

Tabela 2. Famílias estudadas presentes no Ecdybase e os compostos produzidos por cada espécie.

Família	Gênero	Espécie	Composto Presente
1. Amaranthaceae	1. <i>Pfaffia</i>	1. <i>P. iresinoides</i>	1. 20-Hidroxiecdisona 25-β-D-glicosídeo
			2. Podedcdisona B
	2. <i>Froelichia</i>	2. <i>P. glomerata</i>	3. Podedcdisona B 25-O-β-D-glicosídeo
			4. Polipodina B
			5. Pterosterona
		3. <i>F. florida</i>	6. Pterosterona 24-O-β-D-glicosídeo
			7. Fáfiaglicosídeo C
		4. <i>F. floridana</i>	8. Fáfiaglicosídeo D
			9. Fáfiaglicosídeo E
			10. 2-Dehidro-3-Epi-20-hidroxiecdisona
			11. 2,22-Dideoxiecdisona 25-O-β-D-glicopiranosídeo
			12. 2,22-Dideoxiecdisona 25-O-β-D-glicopiranosil-(1->2)-β-D-glicopiranosídeo
	3. <i>Achyranthes</i>	5. <i>A. fauriei</i>	13. (5α)-2,22-Dideoxiecdisona 25-O-β-D-glicopiranosil-(1->2)-β-D-glicopiranosídeo
			14. 2,22-Dideoxi-20-hidroxiecdisona 25-O-β-D-glicopiranosídeo
		6. <i>A. rubrofusca</i>	15. 2,22-Dideoxi-5β-hidroxiecdisona 25-O-β-D-glicopiranosídeo-(1->2)-β-D-glicopiranosídeo
			16. (5α)-20-Hidroxiecdisona (Epiecdisterona)
		7. <i>A. bidentata</i>	17. Inokosterona (Callinecdisona A)
			18. Rubrosterona
			19. Achirantesterona A
			20. Niuxixinesterona A
			21. Niuxixinesterona B
			22. Niuxixinesterona C
2. Asteraceae	4. <i>Cyathula</i>	8. <i>C. capitata</i>	23. 2,3,20,22,26-Pentahidroxi-14-metil-18-norcholesta-7,12-dien-6-one
			24. Amarasterona A e B
			25. Capitasterona
			26. Ciasterona
			27. 28-Epi-ciasterona
			28. Epiciasterona (cf.5-epi-ciasterona)
			29. 25-epi, 28-epi-ciasterona (cf.28-epi-isociasterona)
			30. Isociasterona (cf.25-epi-ciasterona)
	5. <i>Spinacia</i> 6. <i>Leuzea</i>	9. <i>S. oleracea</i> 10. <i>L. carthamoides</i>	31. Postesterona
			32. Preciasterona
			33. Sengosterona
			34. Ecdisona 3-fosfato
			35. Ajugasterona C
			36. Cartomoleusterona
			37. Cartomosterona
			38. Dacrihainansterona (5-deoxikaladasterona)
			39. 24(241)[Z]-Dehidroamarasterona B
			40. 24(241)-Dehidro-242-hidroximakisterona C
			41. 24(28)-Dehidromakisterona A
			42. 22-Desoxi-28-hidroximakisterona C

- | | | |
|---------------------|------------------------------|---|
| | | 43. 3-Epi-20-hidroxiectidisona |
| | | 44. 14-Epi-ponasterona A 22-glicosídeo |
| | | 45. 24-Hidroxi-24,28-dihidrocartamosterona |
| | | 46. 20-Hidroxiectidisona 2,3,20,22-Diacetonida |
| | | 47. 26-Hidroxiimakisterona C |
| | | 48. 1 β -Hidroxiimakisterona C |
| | | 49. 15-Hidroxiaponasterona A |
| | | 50. Inokosterona 20,22-acetonida |
| | | 51. Integristerona A |
| | | 52. Integristerona A 20,22-acetonida |
| | | 53. Isovitexirona |
| | | 54. Lesterona |
| | | 55. Leuzaesterona |
| | | 56. Makisterona A |
| | | 57. Makisterona C (Podectidisona A, Lemmasterona) |
| | | 58. Polipodina B |
| | | 59. Polipodina B 20,22-acetonida |
| | | 60. Poststerona |
| | | 61. Rapisterona D 20-acetato |
| | | 62. Rubrosterona |
| | | 63. Taxisterona |
| | | 64. Turkesterona |
| 7. <i>Serratula</i> | 11. <i>S. tinctoria</i> | 65. 22-Epi-20-hidroxiectidisona |
| | | 66. 3-Epi-postesterona |
| | | 67. 3-Epi-rubrosterona |
| | | 68. Gerardiasterona |
| | | 69. 20-Hidroxiectidisona 3,22-diacetato |
| | | 70. 20-Hidroxiectidisona 2,22-diacetato |
| | | 71. 5 β -Hidroxiirubrosterona |
| | | 72. 22-Oxo-20-hidroxiectidisona postesterona |
| | 12. <i>S. strangulata</i> | 73. 3-Dehidro-20-hidroxiectidisona |
| | | 74. 3-Epi-ectidisona |
| | | 75. (24R)-24-(2-hidroxiimetil)-20-hidroxiectidisona |
| | 13. <i>S. xeranthemoides</i> | 76. Integristerona A |
| | 14. <i>S. sogdiana</i> | 77. Sogdisterona |
| | | 78. Viticosterona E |
| | 15. <i>S. wolffii</i> | 79. Ajugasterona C 20,22-monoacetona |
| | | 80. 22-Dehidro-20-desoxi-ajugasterona C |
| | | 81. 22-Deoxi-20,21-dehidro-ectidisona |
| | | 82. 20,22-Dihidrotaxisterona |
| | | 83. 3-Epi-20-hidroxiectidisona |
| | | 84. 14-Epi-20-hidroxiectidisona |
| | | 85. Herkesterona |
| | | 86. 2,5-Hidroxiarcrihainansterona |
| | | 87. 1-Hidroxi-22-desoxi-20,21-dehidro-ectidisona |
| | | 88. 1-Hidroxi-20,22-didehidrotaxisterona |
| | | 89. 11 α -hidroxipostesterona |
| | | 90. 11 α -Hidroxiishidasterona |
| | | 91. 24-Metilenoshidasterona |
| | | (2 β ,3 α ,5 β ,14 β ,22R)-2,3,20,22,25-pentahidroxicolesterol-7-ene-6-one |
| | | 92. Serfurosterona A |
| | | 93. Serfurosterona B |

- | | | | |
|-----------------------|------------------------|--|---|
| | 8. <i>Cyathula</i> | 16. <i>C. officinalis</i> | 94. Stachisterona B 14,15-epóxido |
| | | | 95. Ciasterona 2,3-monoacetona |
| | | 17. <i>S. chinensis</i> | 96. 24-hidroxiciasterona |
| | | | 97. Isociasterona 2,3-monoacetona |
| | | 18. <i>I. calonyction</i> | 98. 20-Hidroxiacdisona-20,22-butilideno acetal |
| 3. Convolvulaceae | 9. <i>Ipomoea</i> | | 99. Clonisterona |
| | | | 100. Ecdisona |
| | | | 101. Kaladasterona |
| | | | 102. Muristerona A |
| | | | 103. Ecdisona |
| | | | 104. (20R)-1 α , 20-Dihidroxiacdisona |
| | 10. <i>Pharbitis</i> | 19. <i>P. purpurea</i> | 105. 22-Deoxi-20,21-dihidroxiacdisona |
| 4. Chenopodiaceae | 11. <i>Axyris</i> | 20. <i>A. amaranthoides</i> | 106. 2-Dehidropostesterona |
| | 12. <i>Rhagodia</i> | 21. <i>R. baccata</i> | 107. 24,25-Dehidroinokosterona |
| | 13. <i>Chenopodium</i> | 22. <i>C. album</i> | 108. 25,27-Dehidroinokosterona |
| | | 23. <i>C. quinoa</i> | 109. 5 β -Hidroxi-24(28)-dehidromakisterona A |
| | | | 110. Kancolosterona |
| 5. Lamiaceae | 14. <i>Vitex</i> | 24. <i>V. strickeri</i> | 111. Abutasterona |
| | | | 112. Ajugasterona C |
| | | | 113. Ajugasterona C 20,22-monoacetona |
| | | | 114. 11 α -Hidroxiacdisona |
| | | | 115. 20-Hidroxiacdisona 20,22-monoacetona |
| | | 25. <i>V. canescens</i> | 116. Canescesterona |
| | | | 117. 24-Epi-abutasterona |
| | | | 118. 24-Epi-makisterona A |
| | | | 119. 24-Metilshidasterona (Stachisterona D) |
| | | | 120. (24R)-11 α , 20,24-trihidroxiacdisona |
| | | | 121. 11 α , 20,26-Trihidroxiacdisona |
| | | | 122. Turkesterona |
| | | 26. <i>V. madiensis</i> | 123. Ajugasterona C |
| | | 27. <i>V. pinnata</i> | 124. Pinnasterona |
| | | 28. <i>V. glabrata</i> | 125. Turkesterona |
| | | 29. <i>V. megapotamica</i> | 126. Polipodina B |
| | | 30. <i>V. fisherii</i> | 127. Vitocosterona E |
| | | | 128. Vitexirona |
| | | 31. <i>V. scabra</i> | 129. 24-Epi-pinnasterona C |
| | | | 130. Scabrasterona |
| | | 32. <i>V. cymosa</i> | 131. 26-Hidroxipinnasterona |
| 15. <i>Eriophyton</i> | | 33. <i>E. wallchii</i> | 132. 28-Epi-ciasterona |
| 16. <i>Ajuga</i> | | 34. <i>A. reptans</i> var. <i>atropurpurea</i> | 133. Ciasterona 3-Acetato |
| | | | 134. 2-Dehidroajugasterona |
| | | | 135. 3-Dehidroajugalactona |
| | | | 136. 22-Dehidro-12-hidroxiciasterona |
| | | | 137. 22-Dehidro-12-hidroxi-29-norciasterona |
| | | | 138. 22-Dehidro-12-hidroxi-29-sengosterona |
| | | | 139. 22-Dehidro-12-hidroxi-sengosterona |
| | | | 140. 5,29-Dihidroxicapitasterona |
| | | | 141. 28-Epi-sengosterona |
| | | | 142. 20-Hidroxiacdisona 3-acetato |
| | | | 143. 24-Dehidrodrepciasterona |
| | | | 144. 23-Hidroxiciasterona |
| | | 35. <i>A. iva</i> | 145. 22-Oxociasterona |

		36. <i>A. reptans</i>	146. Ciasterona
			147. 20-Hidroxiecdisona 2-acetato
			148. 29-Norciasterona
			149. 29-Norciasterona 2-acetato
			150. 29-Nosengosterona
			151. Reptansterona
			152. Sengosterona
		37. <i>Ajuga</i>	153. Ajugasterona B'
			154. 3-Epi-ciasterona
			155. 3-Epi-ciasterona 22-acetato
		38. <i>A. decumbens</i>	156. Ajugalactona
			157. Ciasterona
			158. Decumbesterona A
		39. <i>A. japônica</i>	159. Ajugasterona C
		40. <i>A. remota</i>	160. Ajugasterona C
			161. Ciasterona
		41. <i>A. nipponensis</i>	162. Ajugasterona D
			163. Ciasterona
			164. Ajugacetalesterona A
			165. Ajugacetalesterona B
			166. 22-Dehidrociasterona 2-glicosídeo
		42. <i>A. incisa</i>	167. Ajugasterona B
			168. Ciasterona
		43. <i>A.</i>	169. Ciasterona 22-acetato
		<i>turkestanica</i>	170. Turkesterona
		44. <i>A. chia</i>	171. Ciasterona
		45. <i>A. taiwanensis</i>	172. Ajugalida E (cf. 2-Epi-ciasterona 22-acetato)
			173. Ajugacetalesterona C
		46. <i>A.</i>	174. Ajugacetalesterona D
		<i>macrosperma</i> var.	175. Brevifloraesterona
		<i>breviflora</i>	176. Brevifloraesterona
		47. <i>A. reptans</i> var.	177. 24-Dehidropreciasterona
		<i>reptans</i>	178. Reptanslactona A
			179. Reptanslactona B
			180. Sendresterona
6. Malvaceae	17. <i>Sida</i>	48. <i>S. cordifolia</i>	181. Sidasterona A
			182. Sidasterona B
		49. <i>S. rhombifolia</i>	183. 25-acetoxi-20-hidroxiecdisona 3-O-β-D-glicopiranosídeo
			184. Ecdisona 3-O-β-D-glicopiranosídeo
			185. Pterosterona 3-O-β-D-glicopiranosídeo
			186. Sidaesterona A
			187. Sidaesterona B
		50. <i>S. spinosa</i>	188. 20-Hidroxi-24-hidroximetilecdisona
			189. Sidasterona A
			190. Sidasterona B
7. Solanaceae	18. <i>Solanum</i>	51. <i>S.</i>	191. Carpesterol
		<i>xanthocarpum</i>	192. 14-Hidroxicarpesterol
	19. <i>Nierembergia</i>	52. <i>N.</i>	193. 7,8-Dihidroajugasterona C
		<i>hippomanica</i>	

Fonte: LAFONT et al., 2012

Tabela 3. Famílias de plantas estudadas presentes no Ecdybase e número de espécies produtores de ecdisteróides por família.

Família	Número de espécies produtoras de ECDs
1. Amaranthaceae	09
2. Asteraceae	09
3. Convolvulaceae	02
4. Chenopodiaceae	04
5. Lamiaceae	25
6. Malvaceae	03
7. Solanaceae	02

Fonte: LAFONT et al., 2012

Tabela 4. Famílias de plantas estudadas ausentes no Ecdybase.

Ausente no Ecdybase		
1. Anarcadiaceae	11. Clusiaceae	21. Myrtaceae
2. Annonaceae	12. Cyperaceae	22. Oxalidaceae
3. Apiaceae	13. Dilleniaceae	23. Passifloraceae
4. Apocynaceae	14. Euphorbiaceae	24. Polypodiaceae
5. Araceae	15. Lecythidaceae	25. Portulacaceae
6. Arecaceae	16. Fabaceae	26. Rosaceae
7. Bignoniaceae	17. Heliconiaceae	27. Rubiaceae
8. Bixaceae	18. Malpighiaceae	28. Sapindaceae
9. Burseraceae	19. Meliaceae	29. Zingiberaceae
10. Celastraceae	20. Myristicaceae	

Fonte: LAFONT et al., 2012

3.3.3 Potencial presença de 20-hidroxiecdisona nas famílias avaliadas

Para se realizar a bioprospecção de plantas presentes na América do Sul, especialmente na região Amazônica, que potencialmente sintetizam 20-hidroxiecdisona (20E), extratos metanólicos de folhas, caules e raízes de 104 espécies diferentes (representando 86 gêneros e 36 famílias) e dois controles positivos foram avaliados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O tempo de retenção do padrão de 20E e das amostras foi avaliado em dois equipamentos distintos. No equipamento Shimadzu-Sil 10AF o tempo de retenção do padrão de 20E foi de 6,08 minutos enquanto que no equipamento Dionex Ultimate 3000 o tempo de retenção do padrão de 20E foi de 3,92 e 4,53 minutos (Figura 1). Nas espécies *Sida rhombifolia* (JADHAV et al., 2007) e *Pfaffia glomerata* (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b), como previamente descrito na literatura foi detectado 20E em folhas, caules e raízes. Uma vez que a ocorrência de 20E já foi relatada nestas espécies, elas foram usadas como controles positivos para a detecção de 20E (Figuras 2 e 3).

Das 104 espécies avaliadas (representando 86 gêneros e 36 famílias), o extrato metanólico de folhas, caules e raízes de três espécies *A. hybridus* var *patulus* (Figura 4), *T. serratifolia* (Figura 5) e *T. impetiginosa* (Figura 6) apresentaram o tempo de retenção equivalente ao tempo de retenção do padrão de 20E (Figura 1), indicando que estas espécies potencialmente sintetizam 20E. Pequenas variações de pressão durante as análises geraram pequenas variações no tempo de retenção do padrão de 20E assim como no tempo de retenção de 20E das amostras.

As cinco espécies analisadas representam três famílias: Amaranthaceae, Bignoniaceae e Malvaceae. As espécies que foram usadas como controles positivos *Sida rhombifolia* (JADHAV et al., 2007) e *Pfaffia glomerata* (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b) representam respectivamente as famílias Malvaceae e Amaranthaceae. A espécie *A. hybridus* var *patalus* (Betol.) Thell (Figura 4) pertence à família Amaranthaceae enquanto que as espécies *T. serratifolia* (Vahl) G. Nicholson (Figura 5) e *T. impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) (Figura 6) pertencem à família Bignoniaceae.

As três espécies *A. hybridus* var *patulus* (Figura 4), *T. serratifolia* (Figura 5) e *T. impetiginosa* (Figura 6) não haviam sido relatadas anteriormente como potenciais produtoras de 20E. Assim, este é o primeiro relato da potencial ocorrência de 20E nestas espécies.

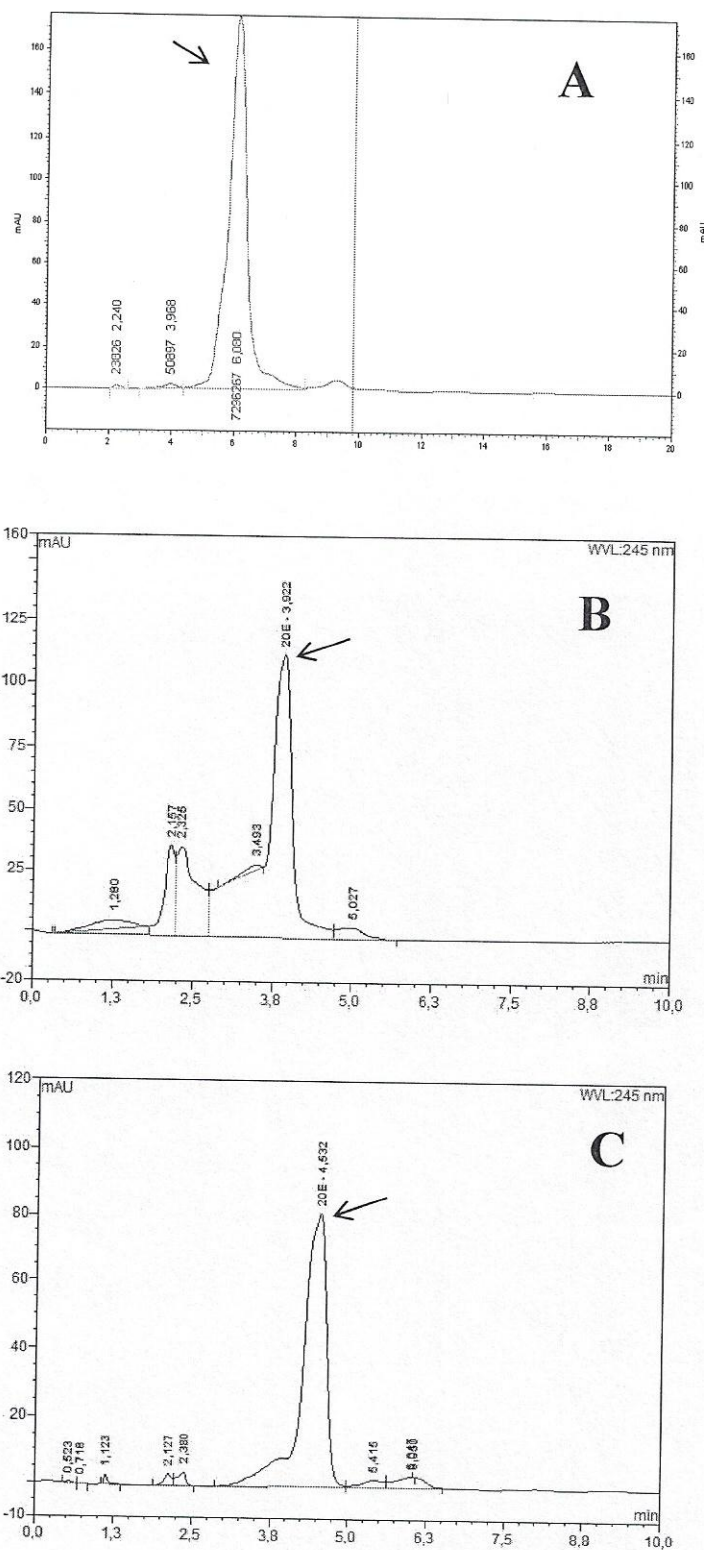


Figura 1. Tempo de retenção (em minutos) do padrão de 20-hidroxicodisona obtido por meio de HPLC. **A.** Equipamento Shimadzu-Sil 10 AF. **B e C.** Equipamento Dionex Ultimate 3000. O pico correspondente a 20E está indicado pela seta.

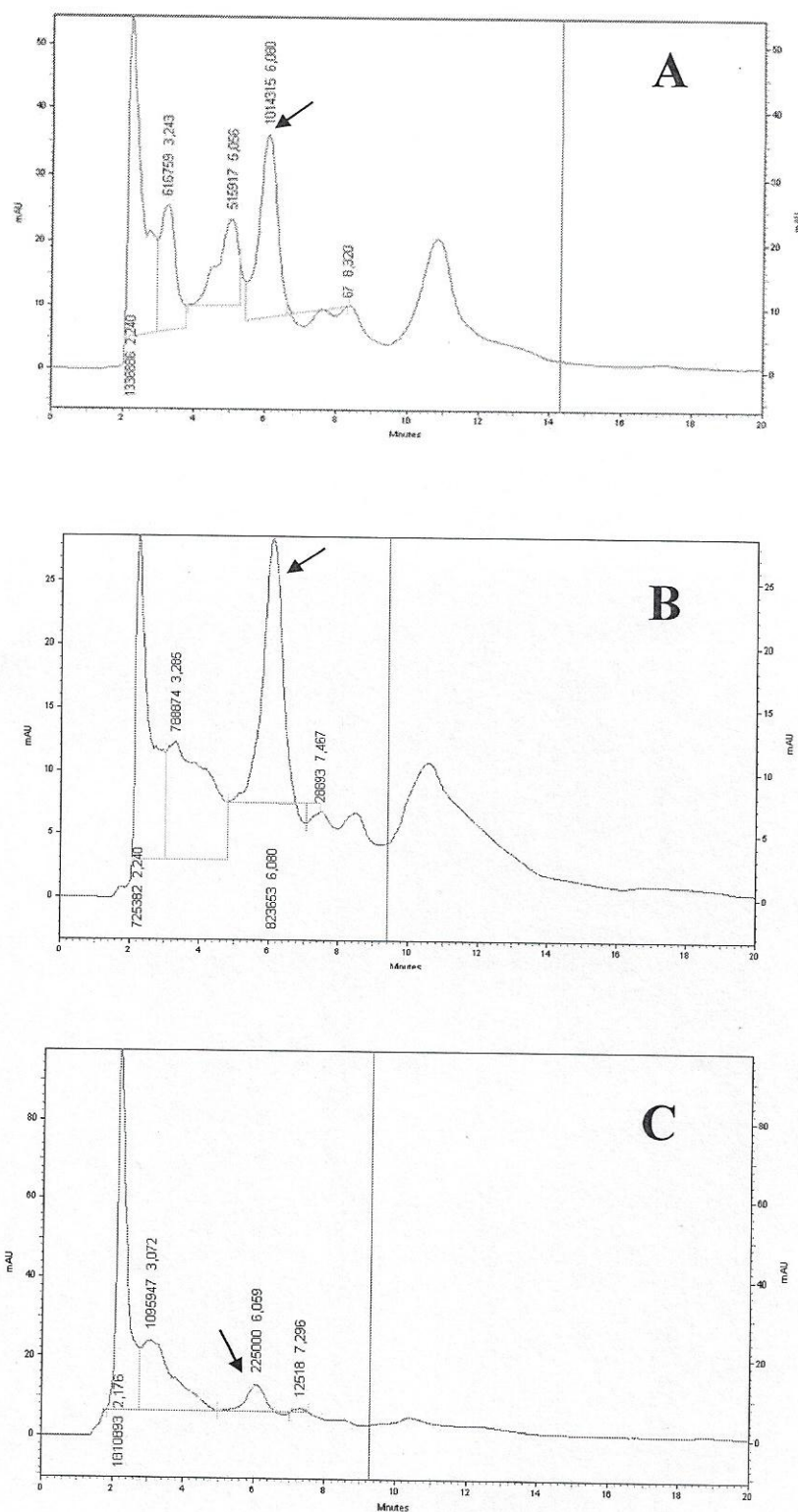


Figura 2. Detecção de 20-hidroxiecdisona em *Sida rhombifolia* L. realizada por meio de HPLC (Shimadzu-Sil 10 AF). *S. rhombifolia* foi usada como planta controle positivo para detecção de 20E. A. Folhas. B. Caule. C. Raiz. O pico potencialmente correspondente a 20E está indicado pela seta

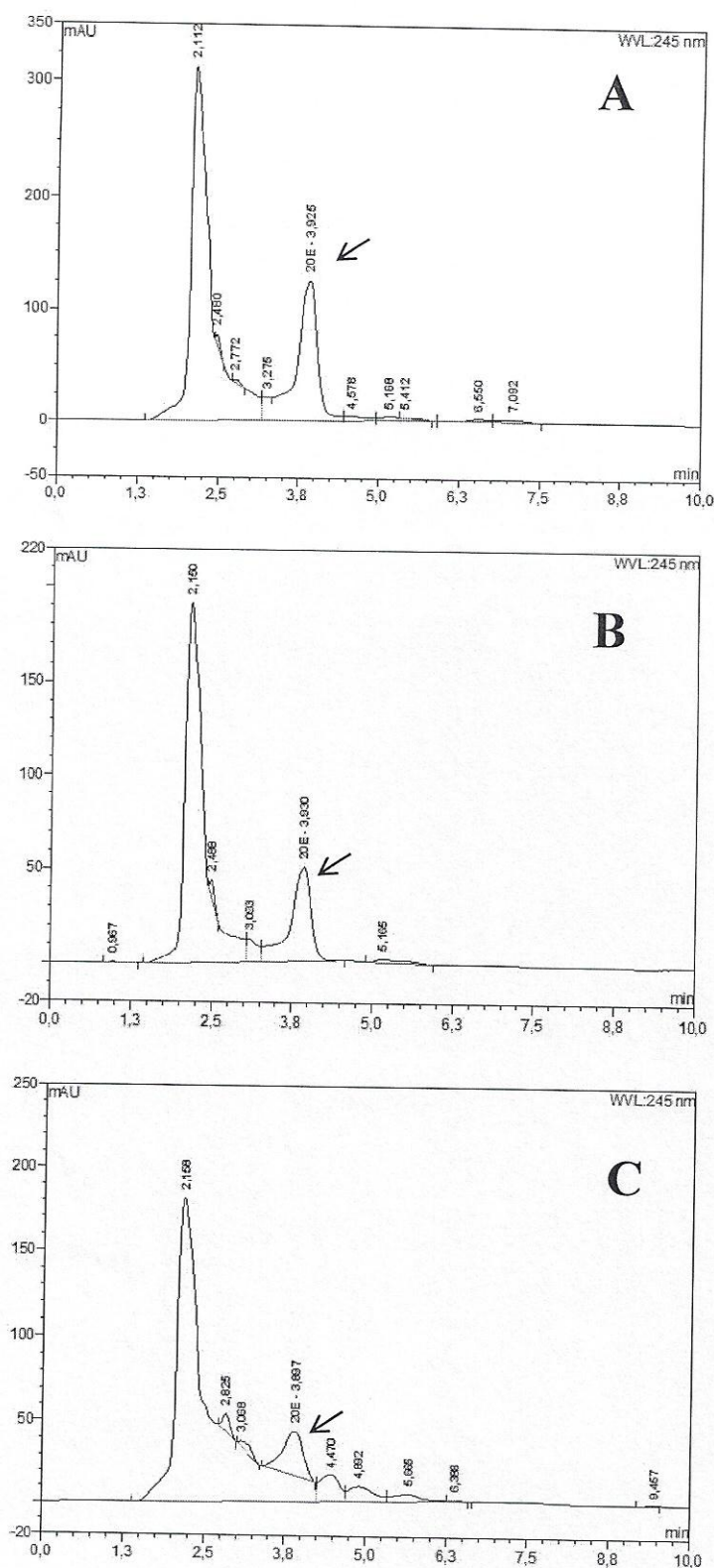


Figura 3. Detecção de 20-hidroxicedisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen realizada por meio de HPLC (Dionex Ultimate 3000). *P. glomerata* foi usada como controle positivo para a detecção de 20E. A. Folhas. B. Caule. C. Raiz. O pico potencialmente correspondente a 20E está indicado pela seta.

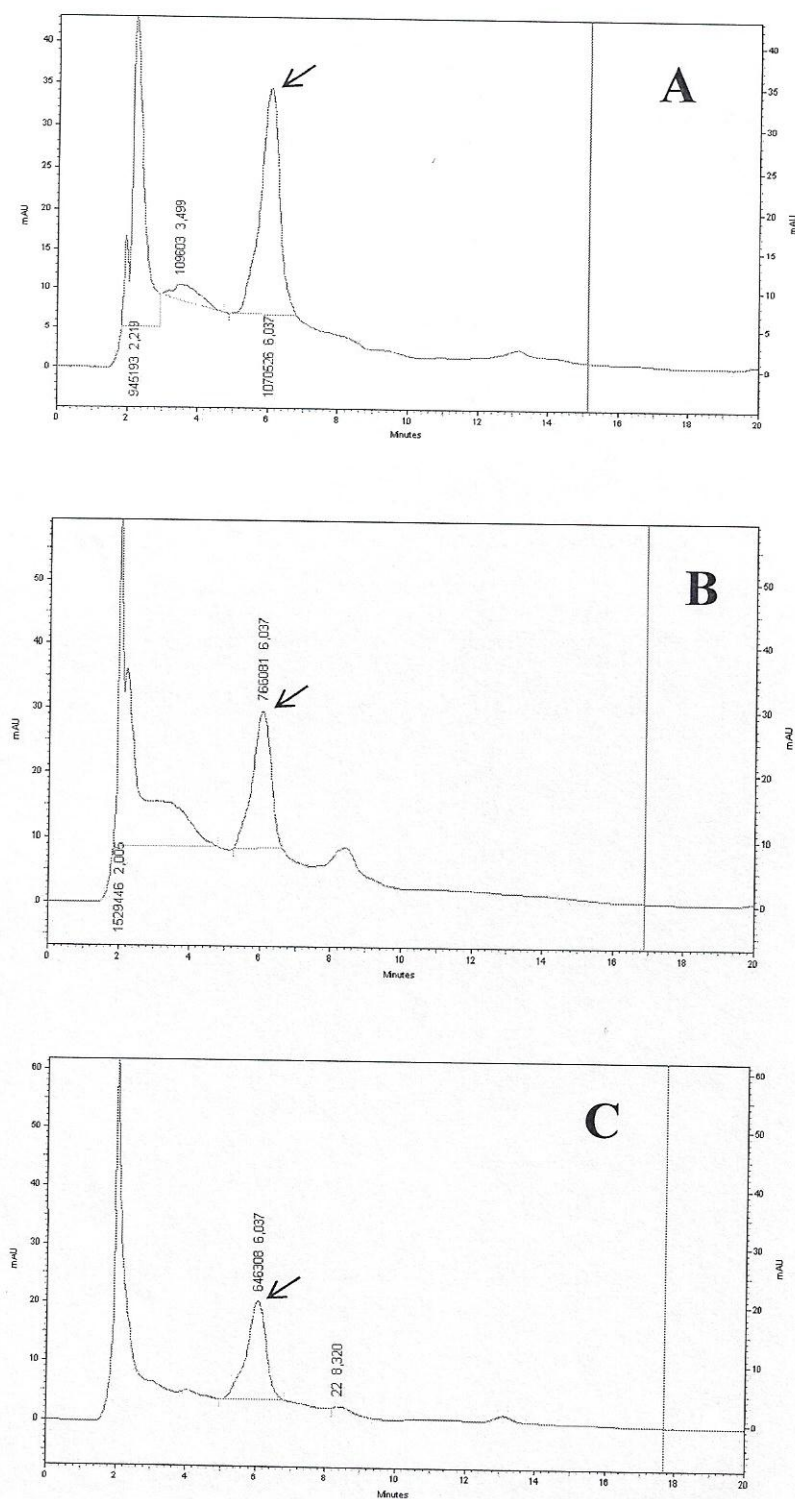


Figura 4. Detecção de 20-hidroxiciclidona em *Amaranthus hybridus* var *patulus* realizada por meio de HPLC (Shimadzu-Sil 10 AF). **A.** Folhas. **B.** Caule. **C.** Raízes. O pico potencialmente correspondente a 20E está indicado pela seta.

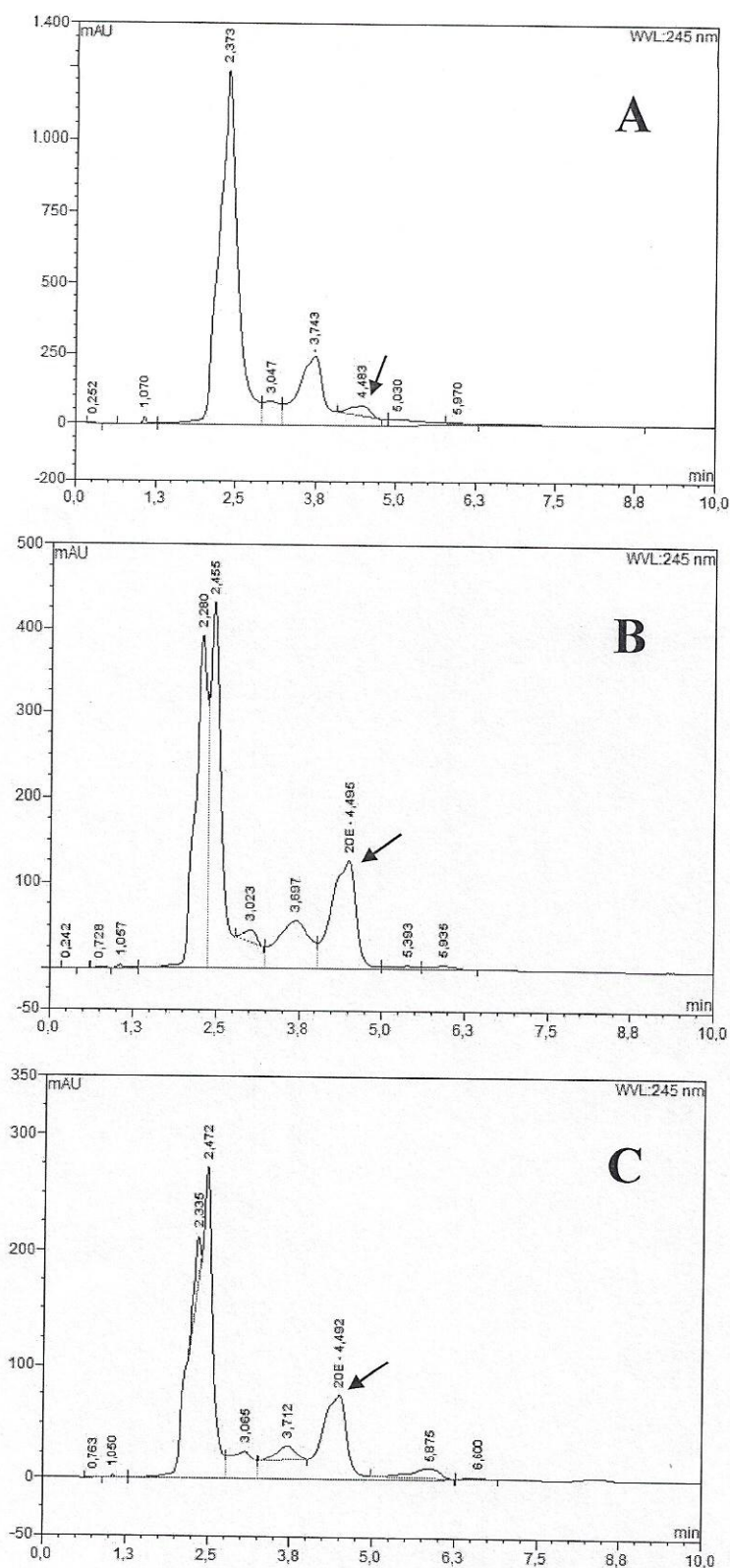


Figura 5. Detecção de 20-hidroxicedisona em *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson realizada por meio de HPLC (Dionex Ultimate 3000). **A.** Folhas. **B.** Caule. **C.** Raiz. O pico potencialmente correspondente a 20E está indicado pela seta.

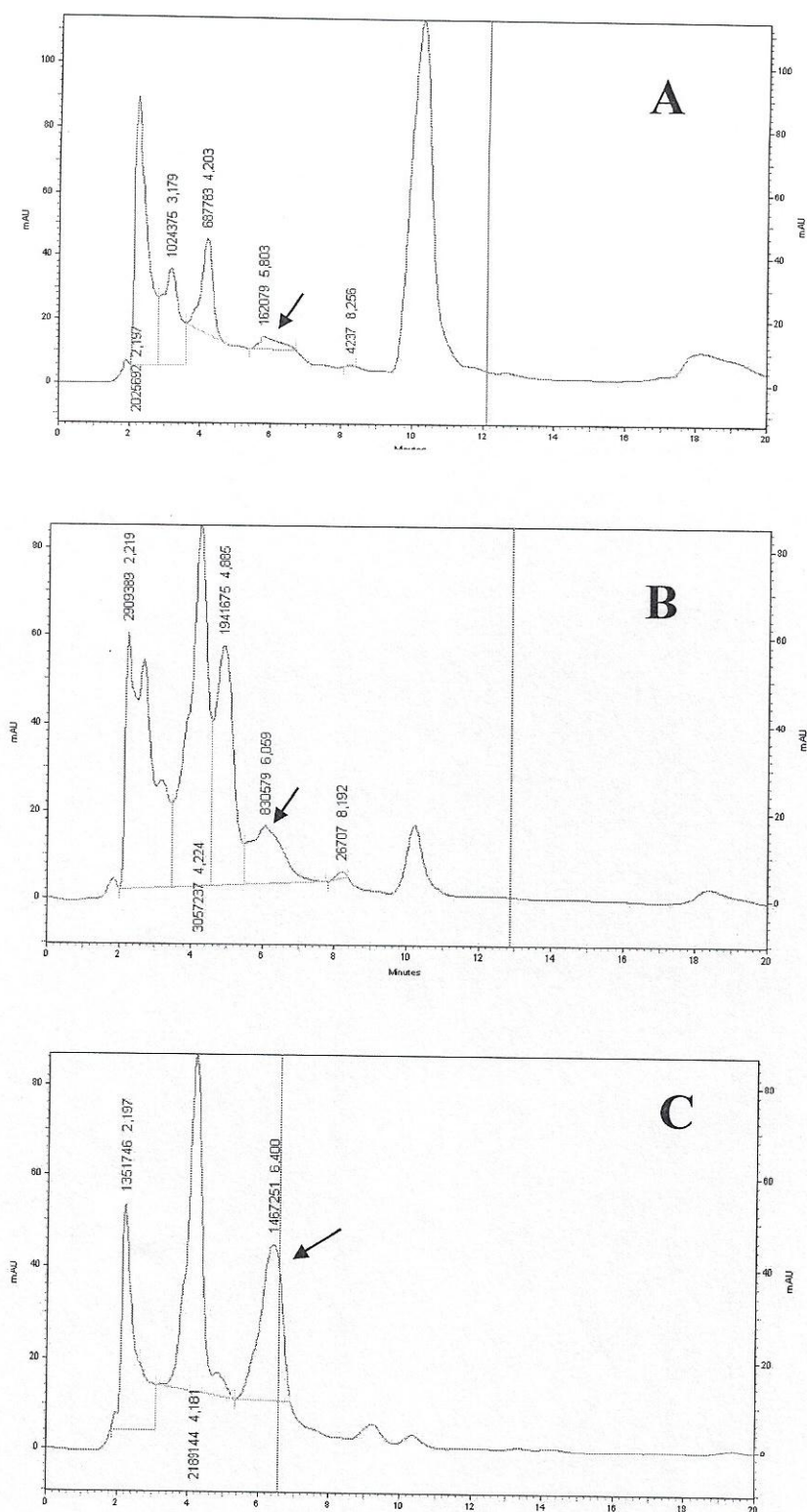


Figura 6. Detecção de 20-hidroxiecdisona em *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex D.) Standl.) realizada por meio da técnica de HPLC (Shimadzu-Sil 10 AF). **A.** Folhas. **B.** Caule. **C.** Raízes. O pico potencialmente correspondente a 20E está indicado pela seta.

2.3.4 Quantificação de 20-hidroxicdisona em *Pfaffia glomerata*, *Sida rhombifolia*, *Amaranthus hybridus* var *patulus*, *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia impetiginosa*

Para se quantificar 20-hidroxicdisona (20E), extratos metanólicos de folhas, caules e raízes das espécies selecionadas como controles positivos e das três espécies identificadas foram avaliados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os teores de 20E em porcentagem de massa por massa (m/m) nas plantas controles (*P. glomerata* e *S. rhombifolia*) e nas três espécies (*Amaranthus hybridus* var *patulus*, *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia impetiginosa*) em que 20E foi potencialmente detectado estão apresentados na Figura 7.

Na espécie *P. glomerata*, a porcentagem de 20E foi de 0,63, 0,24 e 0,13% respectivamente em folha, caule e raiz. Na espécie *S. rhombifolia*, a porcentagem de 20E foi de 0,13, 0,11 e 0,03% respectivamente em folha, caule e raiz. Na espécie *A. hybridus* var *patulus*, a porcentagem de 20E foi de 0,14, 0,10 e 0,08% respectivamente em folha, caule e raiz. Na espécie *T. serratifolia*, a porcentagem de 20E foi de 0,14, 0,68 e 0,60% respectivamente em folha, caule e raiz enquanto que na espécie *T. impetiginosa*, a porcentagem de 20E foi de 0,02, 0,11 e 0,19% respectivamente em folha, caule e raiz.

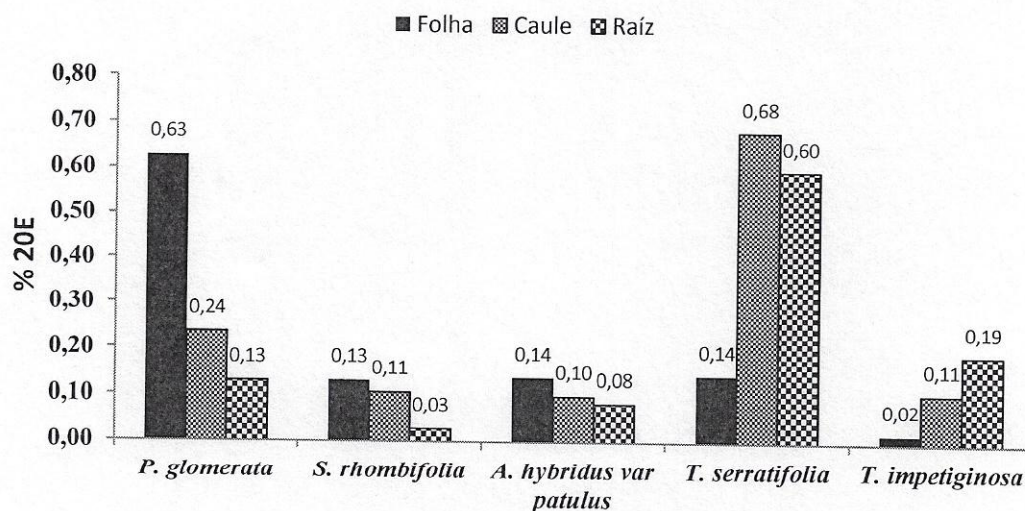


Figura 7. Quantidade de 20E em folhas, caules e raízes em *Sida rhombifolia*, *Pfaffia glomerata*, *Amaranthus hybridus* var *patalus*, *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia impetiginosa* acessada por meio de HPLC.

3.4 DISCUSSÃO

A ocorrência de fitoecdisteróides (PEs) em plantas está relacionada com a sua posição filogenética (DINAN, 2001) e sugere-se que a maioria das plantas mantém a capacidade genética para produzir ECDs, mas que a acumulação é suprimida na maioria das espécies (DINAN et al., 2009). Até o ano 2012 os PEs foram encontrados em 176 espécies vegetais pertencentes a 28 famílias e 66 gêneros (BALTAEV, 2000, ECDYBASE, 2012), sendo relatados nas famílias *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Caryophyllaceae*, *Malvaceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae* e *Solanaceae* (SHIOBARA et al., 1993; DINAN et al., 2001; DINAN, BOURNE & WHITING, 2001; JADHAV et al., 2007; SIMON et al., 2007; LING et al., 2008).

Foram feitas pesquisas com 200 espécies de *Quenopodiáceas* (DINAN et al., 1998), 128 espécies de *Solanáceas* (SAVCHENKO et al., 2000), 110 espécies de *Cariofiláceas* (ZIBAREVA et al., 2003), 470 espécies da família *Compositae* e mais 2.454 selecionados aleatoriamente amostras de sementes (DINAN et al., 2009). As espécies avaliadas neste trabalho perfazem um total de 104 espécies (Tabela 1), todas presentes na América do Sul que estão presentes na região Amazônica. A ocorrência de 20E foi relatada anteriormente apenas para as espécies *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen e *S. rhombifolia* L., (SHIOBARA et al., 1993, DE-PARIS et al., 2000; DINAN, BOURNE & WHITING, 2001; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b; JADHAV et al., 2007; KAMADA et al., 2009). Neste trabalho, 36 famílias, 86 gêneros e 104 espécies foram avaliadas para a potencial ocorrência de 20E. Somente as famílias *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Convolvulaceae*, *Chenopodiaceae*, *Lamiaceae*, *Malvaceae* e *Solanaceae* (Tabela 3) (LAFONT et al., 2012) foram avaliadas anteriormente para o PE 20E, de modo que 29 novas famílias foram estudadas pela primeira vez, representando um total de 104 novas espécies.

Os gêneros *Vitx* e *Ajuga* (*Lamiaceae*) são responsáveis pela maior quantidade de espécie produtoras destes metabólitos secundários (LAFONT et al., 2012). Em *Caryophyllaceae*, foram encontrados mais de 120 espécies de *Silene* produtoras de ECDs, os quais, em sua maioria são 20E, polipodina B, ecdisona e viticosterona (ZIBAREVA, 2009).

Estes resultados sugerem que outros PEs, além de 20E, podem ser produzidos por estas plantas e até mesmo PEs ainda desconhecidos, uma vez que a cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada apenas para a presença de 20E. Por exemplo, a família Asteraceae foi a que obteve maior número de espécies e gêneros avaliados para 20E, considerando que essa família é catalogada no Ecdybase (LAFONT et al., 2012) com nove espécies produtoras do PE 20E (Tabela 2). As espécies testadas neste trabalho poderiam posteriormente ser testadas para os ecdisteróides ecdisona e polipodina B por serem de grande interesse biotecnológico como o 20E.

O PE 20E foi previamente detectado em folhas, caules e raízes de *S. rhombiofolia* (JADHAV et al., 2007) (Figura 2) e em *P. glomerata* (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008b) (Figura 3), usadas neste trabalho como controles positivos, demonstrando que estas espécies podem ser usadas com sucesso como controles positivos para o PE 20E. Nas plantas analisadas neste experimento, além dos controles positivos, as espécies que foram descobertas como potenciais produtoras do PE 20E foram: *A. hybridus* var *patulus* (Amaranthaceae) (Figura 4), *T. serratifolia* (Bignoniaceae) (Figura 5) e *T. impetiginosa* (Bignoniaceae) (Figura 6), o que mostra que uma série de espécies, até então não estudadas, podem produzir PEs (ex. 20E), evidenciando assim o potencial biotecnológico destas espécies.

Os teores de 20E encontradas nas espécies: *A. hybridus* var *patulus*, *T. impetiginosa* e *T. serratifolia* são mostradas na Figura 7. Na espécie *T. serratifolia* o teor encontrado no caule foi superior à encontrada nas espécies controles, representando uma porcentagem de 0,68% (m/m). Por outro lado, *A. hybridus* var *patulus* apresentou teores de 20E em folha, caule e raiz respectivamente de 0,14, 0,10 e 0,08% (m/m), os quais foram próximos aos do controle de *S. rhombiofolia*, que apresentou teores de 20E em folha, caule e raiz respectivamente de 0,13, 0,11 e 0,03% (m/m). Na raiz de *T. serratifolia* foi encontrado um teor de 0,60% (m/m), sendo muito superior aos encontrados nos controles *P. glomerata* e *S. rhombiofolia*.

A determinação da ocorrência de 20E em espécies presentes na região norte do Brasil (região Amazônica) é de grande importância uma vez que a função precisa e a biossíntese de 20E (ainda desconhecidas), podem ser estudadas em diferentes espécies presentes em uma mesma região. Essas informações são importantes para se estudar as potenciais relações ecológicas mediadas por 20E uma vez que esse composto pode proteger as plantas de insetos fitófagos. Além disso, o entendimento da biossíntese de

20E pode permitir a geração de estratégias que visam aumentar seu teor em plantas que o produzem, ou ainda, produzir 20E em espécies de interesse agrônomo, visando ao controle de insetos.

3.5 CONCLUSÕES

As espécies *Sida rhombifolia* L. e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen podem ser usadas como controles positivos para a detecção de 20-hidroxicdisona.

Nas espécies *Amaranthus hybridus* var *patalus* (Betol.) Thell, *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson e *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) foram detectados picos que apresentaram tempo de retenção equivalente ao padrão de 20E, indicando que elas potencialmente sintetizam 20E. Contudo, análises posteriores (ex. HPLC, Espectrometria de Massas e Ressonância Nuclear Magnética) se fazem necessárias para se verificar a identidade dos compostos.

REFERÊNCIAS

- BALTAEV, U.A. Phytoecdysteroids: structure, sources, and biosynthesis in plants. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.26, p.799-831, 2000.
- BAKRIM, A.; MARIA, A.; SAYAH, F.; LAFONT, R.; TAKVORIAN, N. Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): Biosynthesis, transport and regulation of levels, **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, p.844-854, 2008.
- BATHORI, M.; PONGRACZ, Z. Phytoecdysteroids-from isolation to their effects on humans. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p.153-172, 2005.
- DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUECEDO, 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. Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of the species of the Chenopodiaceae. **European Journal Entomology**, v.92, p.295-300, 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.; BOURNE, P.; WHITING, P. Phytoecdysteroid profiles in seeds of *Sida spp.* (Malvaceae). **Phytochemistry Analysis**, v.12, p.110-119, 2001.
- DINAN, L.; LAFONT, R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. **Journal of 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.978-987, 2008a.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; VIEIRA, R.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p.305-311, 2008b.

GILBERT, L.I. *Halloween* genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Cell Endocrinology**, v.215, p.1-10, 2004.

GOLOVATSKAYA, I.F. Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.51, p.407-413, 2004.

JADHAV, A.N.; RUMALLA, S.C.; AVULA, B.; KHAN, I.A. HPTLC Method for determination of 20-hydroxyecdysone in *Sida rhombifolia* L. and dietary supplements. **Chromatographia**, v.66, p.797-799, 2007.

KAMADA, T.; PICOLI, E.A.T.; VIEIRA, R.F.; BARBOSA, L.C.A.; CRUZ, C.D.; OTONI, W.C. Variação de caracteres morfológicos e fisiológicos de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e correlação com a produção de β -ecdisona. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.247-256, 2009.

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

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

LAFONT, R.; HARMATHA, J.; MARION-POLLI, F.; DINAN, L.; WILSON, D. **The ecdysone handbook** <<http://ecdybase.org/>> Acessado em: 12 fev. 2012.

LING, T.; ZHENGZHU, Z.; XIA, T.; LING, W.; WAN, X. Phytoecdysteroids and other constituents from the roots of *Klaseopsis chinensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, p.49-51, 2008.

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.

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

NETO, A.G.; DA SILVA FILHO, A.A.; COSTA, J.M.L.C.; 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.

SIMON, A.; TÓTH, G.; LIKTOR-BUSA, E.; KELE, Z.; TAKÁCS, M.; GERGELY, A.; BÁTHORI, M. Three new steroids from the roots of *Serratula wolffii*. **Steroids**, v.72, p.751-755, 2007.

SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; GERMADE, A.; DINAN, L. Ecdysteroid agonist and antagonist activities in species of the Solanaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, p.403-419, 2000.

SEIDLOVA-WUTTKE, D.; EHRHARDT, C.; WUTTKE, W. Metabolic effects of 20-hydroxyecdysone in ovariectomized rats. **Journal Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.119, p.121-126, 2010.

SHIOBARA, Y.; INQUE, S.S.; KEATO, K. NISHIGUSHI, Y.; OISHI, Y. NISHIMITO, N.; OLIVEIRA, F.; AKSUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.A. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.36, p.1527-1530, 1993.

SLAMA, K. Ecdysteroids: insect hormones, plant defensive factors, or human medicine? **Phytoparasitica**, v.21, p.3-8, 1993.

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.

TEIXEIRA, C.G.L.; PICCOLI, A.; COSTA, P.; SOARES, L.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Involvement of the nitric oxide/soluble guanylate cyclase pathway in the anti-oedematogenic action of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen in mice. **Journal Pharmacology**, v.58, p.667-675, 2006.

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.

ZIBEREVA, L.; VOLODIN, V.; SAATOV, Z.; SAVCHENKO, T.; WITHING, P.; LAFONT, R.; DINAN, L. Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae. **Phytochemistry**, v.64, p.499-517, 2003.

ZIBAREVA, L.N. Phytoecdysteroids of Caryophyllaceae Juss. **Contemporary Problems of Ecology**, v.16, p.753-764, 2009.